



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN EL
DESARROLLO DEL TUBO NEURAL DEL RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

L.B.M. Pilar Sarah Acevo Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Susana Castro Obregón

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Sandra Cabrera Benítez,
Facultad de Ciencias, UNAM

Dra. Diana María Escalante Alcalde,
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2017



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.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio AL-104 del Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Doctora Susana Castro Obregón. Durante la realización de este trabajo se contó con la beca CONACyT 63065, así como con el apoyo económico del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) y de la Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa (CONACyT) para presentar el trabajo en congresos nacionales. El trabajo experimental fue financiado por los proyectos PAPIIT-IN206015, CONACyT CB2013-220515 y *Estímulos para Investigaciones Médicas “Miguel Alemán” para la Investigación en Salud 2015*.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo: técnico de la Dra. Beatriz Aguilar Maldonado y la Dra. Teresa Montiel Montes; para el manejo de animales de laboratorio la M.V.Z. Claudia Rivera Cerecedo de la Unidad del Bioterio; la Dra. Yazmín Ramiro Cortés, la Dra. Ruth Rincón Heredia y el Ing. Marco Antonio García Aguilera de la Unidad de Imagenología, en la obtención de imágenes; para procesar las muestras la Dra. Teresa Guadalupe Cortes Flores de la Unidad de Histología; el Ing. Manuel Ortínez Benavides de la Unidad del Taller de Mantenimiento Electrónico, Eléctrico y Mecánico en el mantenimiento de equipo; y de M. en C. Ana María Escalante e Ing. Francisco Pérez Eugenio de la Unidad de Cómputo.

The concept of an embryo is a staggering one, and forming an embryo is the hardest thing you will ever do. To become an embryo you had to build yourself from a single cell. You had to respire before you had lungs, digest before you had a gut, build bones when you were pulpy, and form orderly arrays of neurons before you knew how to think. One of the critical differences between you and a machine is that a machine is never required to function until after is built. Every animal has to function even as it builds itself.

Scott Gilbert.

Agradecimientos

A la Dra. Susana Castro Obregón, por dejarme formar parte de este equipo, por su inagotable paciencia y apoyo para la realización del proyecto.

Al comité tutor, Dra. Sandra Cabrera Benítez y Dra. Diana Escalante Alcalde, que en cada reunión que tuvimos aportaron soluciones y conocimiento valioso para enriquecer este trabajo.

A la Dra. Rosa Navarro y los doctores Fernando López Casillas, Julio Morán, Enrique Salas, y Mario Zurita por las observaciones hechas a esta tesis.

Al coordinador, secretaria y asistentes de procesos del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas que llevan a cabo una función excelente.

A los miembros “del AL-103”, en especial al Biól. Alejandro Fábregas Tejeda por ser mi mentor en los saberes de la embriología.

A los distinguidos integrantes y estudiantes del laboratorio AL-104: Bety, Jorge, Señora Tere Constantino, Zai, Abirám, Alex, Elisa, Gabriel, Daniel y Miguel; por la ayuda en el laboratorio, por compartir su conocimiento, por las charlas y las sobremesas.

A mis padres, Juan y Rocío, por apoyarme incondicionalmente, por creer en mí, por enseñarme las cosas más valiosas de la vida y por siempre brindarme lo mejor. A mis hermanos Carlos y Chio, por siempre estar a mi lado, por cuidarme y consentirme. A mi hermosa, linda y gran familia (Abue,tí@s, prim@s, sobrin@s). Los amo.

A mis amig@s: Alán, Angie, Bere, Cesarín, Cris, Cristian, Daniel, Denisha, Gabriel, Jean, Joce, Karenzuka, Lau, Luish y Miri; porque, ya sea de cerca o de lejos me han escuchado, terapeado y mal o bien aconsejado. Por aguantarme y reírse *conmigo*, por su cariño, por la diversión y la compañía, y por los cafés y/o bebidas antiestrés compartidas.

A J. Daniel por su comprensión, por quererme y alentarme.

ABREVIATURAS

APAF1	apoptosis protease-activating factor-1	MT-MMP	membrane-type MMP
AER	apical ectodermal ridge	mTOR	mechanistic target of rapamycin
AMBRA1	activating molecule in beclin1-regulated autophagy	mTORC1	mTOR complex I
Ambra1	gen de AMBRA1	MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
ATG	proteína relacionado con la autofagia	MVBs	multivesicular bodies
Atg	autophagy-related genes	NA	naranja de acridina
BECN1	beclina1	p62/SQSTM1	sequestosome I
Becn1	gen de BECN1	PBS	buffer fosfato salino
BMP	bone morphogenetic protein	PE	fosfatidil etanolamina
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridine	PFA	paraformaldehído
BSA	bovine serum albumin	Pi3kc3	gen de PI3K-III
CASP	cysteine-aspartic acid protease	PI3K-III/VPS34	phosphatidylinositol- 3-kinase class III
CCN	células de la cresta neural	PMA	forbol-12-miristato-13-acetato
CQ	cloroquina	Rab	Ras-related protein
DAC-FC	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína	RNA	ácido ribonucleico
DNA	ácido desoxirribonucleico	RNAi	RNA de interferencia
DTN	defectos del tubo neural	RNAm	RNA mensajero
ERO	especies reactivas de oxígeno	SASP	senescence-associated secretory phenotype
ESCRT-III	endosomal sorting complexes required for transport -III	SA-βGal	senescence-associated β-galactosidase
FGF	fibroblast growth factor	SNAP	synaptosomal-associated protein
FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD	SNARE	SNAP soluble NSF attachment protein receptor
FIP200	gen de FIP200	SNC	sistema nervioso central
GABARAP	gen de GABARAP	Spautin1	specific and potent autophagy inhibitor-1
GFP-LC3	proteína verde fluorescente acoplada a LC3	TA	temperatura ambiente
H3K9m3	Histona H3 trimetilada en Lys9	TEM	transición epitelio-mesenquima
HMGB1	high mobility group box 1 protein	TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
IL	interleucina	TN	tubo neural
LAMP-2A	lysosome-associated membrane protein 2A	ULK	Unc-51-like kinase
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3	Ulk	gen de ULK
LC3	gen de LC3	USP	ubiquitin-specific protease
MEC	matriz extracelular	VAMP	vesicle associated membrane proteins
MMP	matrix metalloproteinases	vWF	Von Willebrand factor

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Desarrollo temprano del sistema embrionario	2
Autofagia	4
Monitoreo de la autofagia	8
Autofagia y desarrollo en vertebrados	10
Senescencia celular programada	13
Metaloproteinasas de la matriz.....	14
Función de metaloproteinasas de la matriz en el desarrollo	15
HIPÓTESIS.....	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
Objetivos particulares.....	16
ESQUEMA DE TRABAJO	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN.....	43
PERSPECTIVAS	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

RESUMEN

En el desarrollo de los vertebrados en la etapa de gastrulación se establecen tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. En esta etapa células del mesodermo forman la notocorda que envía señales inductoras al ectodermo, que se halla por encima de ella, para iniciar la neurulación con la formación de la placa neural.

La placa neural sufre cambios morfológicos, su flexión en un punto de articulación medial da lugar a los pliegues neurales, que a su vez se flexionan en su porción dorso lateral provocando que sus puntas queden frente a frente y se fusionen, formando así el tubo neural. Este proceso involucra la remodelación de la matriz extracelular.

Fallas en la neurulación resultan en defectos del tubo neural, y se encuentran entre las malformaciones congénitas más comunes. La etiología de estas anomalías es complicada y multifactorial, componentes tanto ambientales como genéticos han sido involucrados. Entre los modelos murinos que presentan este tipos de defectos se halla la mutación homocigótica de *Ambra1^{gt/gt}*, proteína que participa en las primeras etapas de la vía autofágica.

La autofagia es un proceso catabólico lisosomal evolutivamente conservado que permite eliminar proteínas de vida media larga y organelos dañados, reciclar componentes de macromoléculas durante el ayuno, promover la muerte celular programada tipo II, y mediar la secreción y tráfico de proteínas a la membrana plasmática. En algunos casos la autofagia contribuye al establecimiento de la senescencia celular, que es un estado en el que las células ya no se dividen y secretan moléculas, como metaloproteinasas, para modificar el microambiente. La senescencia se asoció originalmente a la supresión tumoral y al envejecimiento, pero recientemente se observó que también ocurre en el desarrollo embrionario y contribuye a la morfogénesis.

En este trabajo planteamos la hipótesis de que la autofagia media la secreción de moléculas remodeladoras de la matriz extracelular por células senescentes, para la formación del tubo neural en el embrión de ratón.

Los resultados obtenidos demuestran que efectivamente en células que se encuentran a lo largo de la línea de fusión del tubo neural hay un incremento de la autofagia. Se descubrió que las metaloproteinasas de la matriz (MMP)-3, -2 y -9 tienen distintos patrones de distribución y abundancia en los pliegues neurales y en el tubo neural ya formado, sugiriendo funciones específicas de cada metaloproteinasa. Sin embargo, en esa etapa de desarrollo (E8.5) no se detectaron células senescentes en la línea de fusión del tubo neural, por lo que la senescencia programada no contribuye en este estadio. En cambio, la autofagia sí resultó necesaria para el correcto desarrollo, ya que el uso de un inhibidor de autofagia (Spautin I) en cultivo extra-uterino de embriones retrasó el cierre del tubo neural e inhibió el giro axial del embrión. Será interesante estudiar si la secreción de las MMP-3, -2 y -9 depende de la autofagia, y si su función es necesaria para el correcto desarrollo del tubo neural.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo temprano del sistema nervioso

El desarrollo de los vertebrados desde la fertilización al nacimiento puede clasificarse en varias etapas: división del cigoto a células indiferenciadas de la blástula (blastulación), formación de la gástrula (gastrulación), diferenciación y reorganización de células progenitoras en tejidos y órganos (organogénesis), y crecimiento completo de los órganos (Cecconi 2008). A lo largo de estas etapas las células deben proliferar, migrar, morir o diferenciarse, permitiendo la transformación del embrión en un organismo adulto (Di Bartolomeo 2010).

Durante la gastrulación se establecen tres capas germinales y a partir de ellas se forman los diferentes tipos celulares que constituirán todos los órganos y tejidos del embrión:

- Endodermo: es la capa más interna, produce el epitelio del tubo digestivo y órganos asociados (incluyendo los pulmones).
- Mesodermo: capa situada entre el ectodermo y el endodermo, genera el corazón, la sangre, los riñones, las gónadas, los músculos y el tejido conectivo.
- Ectodermo: es la capa externa del embrión, constituye la epidermis y forma el cerebro y el sistema nervioso.

Después de la formación de la gástrula ocurre un evento crucial que genera el primordio del sistema nervioso central: el cierre del tubo neural (Ray 2012). En la porción dorso medial del embrión, por encima de la notocorda, el neuroectodermo se engrosa en un epitelio columnar dando lugar a la placa neural (Figura 1a). Cambios morfológicos conducen a la flexión de la placa neural en un punto de articulación medial (Figura 1b), dividiéndola en dos regiones bilateralmente simétricas. Las regiones laterales se elevan, creando paredes cóncavas que constituyen los pliegues neurales (Figura 1c) y formando el surco neural a lo largo del eje rostro caudal del embrión. A continuación una segunda flexión en la región dorso lateral de los pliegues neurales (Figura 1d) provoca que sus puntas queden frente a frente en la línea medial y se fusionen (Figura 1e) formando el tubo neural (TN). Al mismo tiempo las células de la cresta neural comienzan a migrar y el TN se separa del ectodermo no neural (Figura 1f).

Las células de la cresta neural (CCNs) se separan del epitelio por un proceso conocido como deslaminación e involucra la transición epitelio-mesénquima (TEM), desencadenada por las señales Wnt, FGF y BMP. Además factores transcripcionales como Snail2 o miembros de la familia Sox influyen en la adquisición de este fenotipo migratorio. De gran importancia para la migración de estas células es la degradación de la matriz extracelular, la metaloproteinasa de la matriz (MMP)-2 se expresa de manera temprana en la deslaminación de las CCNs. Dado que los destinos de las CCNs son numerosos las

mutaciones en los genes de las CCNs se relacionan con múltiples fenotipos como vitíligo y defectos craniofaciales (Acloque 2009).

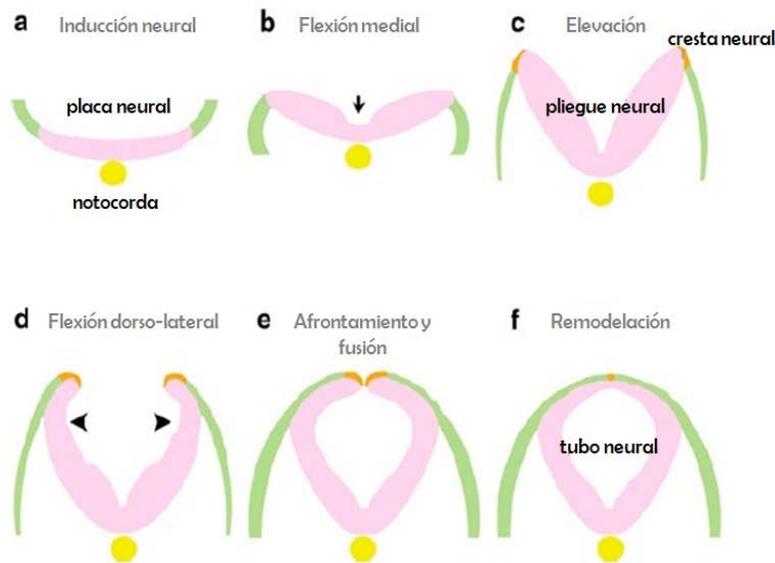


Figura 1. Formación del tubo neural. (a) En la porción dorsal del embrión, la notocorda (amarillo) envía señales al ectodermo que se encuentra por encima de ella, induciendo la formación de la placa neural (rosa). (b) La placa neural se flexiona en un punto medial y (c) la elevación de las regiones laterales constituyen los pliegues neurales. (d) Una segunda flexión en la porción dorso-lateral provoca que (e) las puntas de los pliegues se afronten y fusionen formando el tubo neural. (f) Durante la remodelación las células de la cresta neural (naranja) migran y el ectodermo no neural (verde) se separa del tubo neural.

Modificado de Yamaguchi 2013.

que ocurre en las zonas que corresponden al cerebro y la mayor parte de la espina dorsal, la neurulación secundaria ocurre en las secciones que en un futuro se convertirá en la espina de las regiones caudal y sacra. En el ratón la neurulación primaria termina el día E10 (Figura 2a). En comparación, en el embrión humano la flexión de la placa neural comienza alrededor de los días 17-18 después de la fertilización y eventos análogos al cierre1 y cierre3 en el ratón han sido descritos (Figura 2b). La neurulación primaria se completa en los días 26-28 post fertilización (Greene 2009).

Fallas en la neurulación resultan en defectos del tubo neural (DTN)(Green 2009). Varias anomalías del sistema nervioso central (SNC) incluidas exoencefalia, anencefalia y espina bífida se encuentran entre las malformaciones congénitas más comunes (Harris 2007; Greene 2009; Massa 2009). Otro DTN más severo y con menor incidencia es la craneorraquisqui (Harris 2007; Greene 2009).

La etiología de los DTN es complicada y multifactorial, componentes tanto ambientales como genéticos han sido involucrados (Cecconi 2008). Los más de 190

En mamíferos, el cierre del tubo neural es un proceso discontinuo que inicia en varios puntos discretos a lo largo del eje rostro caudal. En el ratón el cierre inicial de los pliegues neurales (cierre1) comienza en la región romboencéflica-cervical, en el día embrionario (E)8, progresa en dirección rostral para formar el tubo neural del futuro cerebro y en dirección caudal para la médula espinal (Figura 2a). Otros sitios en la región del prosencéfalo/mesencéfalo y en la región rostral del prosencéfalo en el día E9 se comienza a cerrar (cierre 2 y 3 respectivamente). La neurulación primaria es la

ratones genéticamente mutados y cepas que muestran DTN han contribuido en gran medida para identificar vías de señalización y procesos celulares involucrados en la patogénesis de los DTN (Harris 2007). Sin embargo, el determinar la(s) causa(s) de los DTN es complicado porque el proceso subyacente, la neurulación, es complejo y aún no es bien comprendido. Como se describió con anterioridad, la neurulación es un proceso de múltiples pasos que involucra grandes cambios morfológicos coordinados en una ventana de tiempo muy precisa. Procesos celulares relacionados con el metabolismo, polaridad, adhesión, proliferación y muerte han sido descritos (Ceconi 2008). Recientemente se ha propuesto una relación entre el desarrollo del sistema nervioso central y la autofagia. La autofagia actúa como un mecanismo crucial para remodelar la célula y por tal motivo ha sido reconocida como un proceso clave en el desarrollo de los vertebrados (Ceconi 2008; Di Bartolomeo 2010).

Autofagia

La autofagia es un proceso principalmente catabólico lisosomal evolutivamente conservado que permite eliminar proteínas de vida media larga y organelos dañados, reciclar componentes de macromoléculas durante el ayuno y promover la muerte celular programada tipo II (Clarke P. 1990; Shintani T. 2004). Otra función recientemente reportada es su papel en la secreción y tráfico de proteínas a la membrana plasmática (Deretic 2012).

Existen tres distintos tipos de autofagia que se distinguen por el mecanismo por el cual llega el material al lisosoma: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. En la primera el complejo transmembranal que contiene a la proteína LAMP-2A actúa como un receptor para proteínas que contienen la secuencia KFERQ donde la proteína Hsc70 y cochaperonas se unen. En esta forma de autofagia proteínas mal plegadas son entregadas al lumen del lisosoma a través de un complejo multimérico de translocación. En la microautofagia pequeños componentes del citoplasma son engullidos a través de invaginaciones de la membrana lisosomal. En el tercer tipo de autofagia, la macroautofagia (que de aquí en adelante se mencionara simplemente como autofagia), una membrana de aislamiento secuestra pequeñas porciones de citoplasma con material soluble y organelos, para formar el autofagosoma, el cual se fusiona con el lisosoma para convertirse en un autolisosoma (Mizushima 2011).

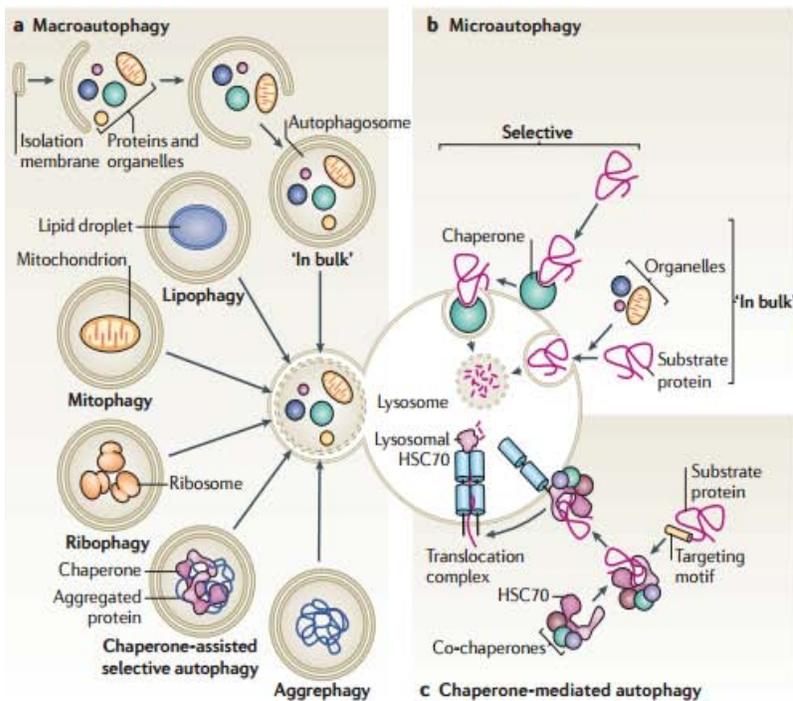


Figura 3. Distintos tipos de autofagia: la macroautofagia (a) es el tipo de autofagia más estudiado, el cargo a ser degradado alcanza al lisosoma tras ser engullido por una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma. En la, microautofagia (b) la membrana lisosomal se invagina y pequeños componentes citoplasmáticos son engullidos y en la autofagia mediada por chaperonas (c) complejos receptores (LAMP-2A) median el ingreso de proteínas, con motivos específicos unidas a chaperonas (Hsc70) y cochaperonas, al lisosoma.

Tomado de Cuervo 2011.

autofágicos. Actualmente se han descrito diversas proteínas con esta función, que permiten la autofagia selectiva de complejos protéicos, agregados u organelos particulares. De acuerdo al material engullido para su degradación se le da un nombre específico, por ejemplo la mitofagia (mitocondria), la ribofagia (ribosoma), la reticulofagia (retículo), ferrofagia (ferritina cargada de hierro), la xenofagia (microorganismos), lipofagia (gotas lipídicas), etcétera (Cuervo 2011; Khaminets 2016)

El proceso autofágico consta de varias etapas: inducción, reconocimiento y selección del cargo, formación del autofagosoma, fusión del lisosoma con el autofagosoma y la degradación del cargo seguido de la liberación de los productos resultantes al citosol o al exterior, aunque esto se conoce poco. Varias proteínas relacionadas con la autofagia (ATG, por sus siglas en inglés) están involucradas en las primeras etapas (He 2009).

La inducción de la autofagia es un mecanismo crucial para que los organismos se adapten al estrés y respondan a señales extracelulares. En condiciones normales el nivel basal de autofagia es bajo pero varios estímulos pueden desencadenar la activación de la

En un principio se pensó que este proceso carecía de especificidad. Sin embargo, hoy en día se sabe que la eliminación de proteínas ubiquitinadas o proteínas propensas a agregarse es un proceso selectivo. La proteína p62/sequestosoma 1 (SQSTM1) mediante un dominio de asociación interactúa con proteínas poli- o mono-ubiquitinadas y sirve como un puente para unir las con la maquinaria autofágica, ya que también cuenta con un dominio de unión a la proteína autofágica LC3 (dominio LIR) (Mizushima 2011). A este tipo de moléculas adaptadoras se les conoce como receptores

vía autofágica como la deficiencia de nutrientes, hormonas, hipoxia, estrés oxidativo, infección por patógenos, la radiación, etc. (Yang 2010).

El regulador negativo de la autofagia que más se ha estudiado es la cinasa serina/treonina blanco de la rapamicina (mTOR). De acuerdo a distintas proteínas que interactúan con mTOR se puede formar el complejo 1 (mTORC1) o el complejo 2 (mTORC2). mTORC1 integra señales provenientes de factores de crecimiento, estrés, estado energético, oxígeno y aminoácidos y a su vez controla procesos de gran importancia como la síntesis de lípidos y proteínas, y la autofagia (Laplante 2012). Bajo condiciones ricas en nutrientes mTORC1 fosforila componentes del complejo cinasa tipo UNC-51 (ULK)-1/2: ULK1/ULK2 y ATG13, inactivándolos. Cuando mTORC1 se inhibe, por ejemplo en la deficiencia de nutrientes o en presencia de rapamicina, la autofagia se induce. ULK1/2 es defosforilada, se activa, se autofosforila y también fosforila a ATG13 y FIP200, en residuos distintos a los que mTORC1 lo hace, provocando cambios conformacionales en el complejo que inducen la autofagia (He 2009) (Figura 4a).

La nucleación de la vesícula involucra a la fosfatidilinositol 3 cinasa de clase III (PI3K-III), también conocida como VPS34, la cual forma un complejo con su proteína reguladora p150 (también conocida como Vps15), BECN1 (homólogo de ATG6 de levaduras) y ATG14L (Mehrpour 2010; Yang 2010) (Figura 4b).

La actividad del complejo VPS34 es regulada positivamente por la proteína 1 reguladora de autofagia/BECN1 (AMBRA1) (Fimia 2007), permitiendo el reclutamiento de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina esenciales para la formación del autofagosoma (Mehrpour 2010). En el primero, ATG12 es activada por ATG7 y conjugada con ATG5 por acción de ATG10. El conjugado ATG12:ATG5 interactúa con ATG16L, el cual se oligomeriza para formar un complejo multimérico (Figura 4c) (Yang 2010). En el segundo sistema la proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (LC3) es procesada por la proteasa ATG4 en su extremo C-terminal formando LC3-I citosólico con un residuo de glicina expuesto, el cual, en respuesta a estímulos autofágicos, se conjuga con fosfatidiletanolamina (PE) en una reacción mediada por ATG7, ATG3 y el complejo ATG12-ATG5:ATG16L (Figura 4d). La forma lipidada es conocida como LC3-II y se recluta en la vesícula que va rodeando el material a engullir. Los fosfolípidos para la elongación de ésta vesícula pueden proceder de diversos organelos como el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, la membrana externa de la mitocondria o la membrana plasmática (Mari 2011). Cuando las puntas que guían la elongación convergen, se fusionan creando una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma; entonces el complejo ATG12-ATG5:ATG16L se separa y el LC3-II asociado con la membrana del lado citosólico se corta regenerando LC3-I, el cual es reciclado. El LC3-II que se halla en la membrana interna es la única proteína similar a las ATG que permanece unida al autofagosoma maduro (Figura 4e), y posteriormente es degradada en el autolisosoma (Yang 2010; Mizushima 2011)(Figura 4f).

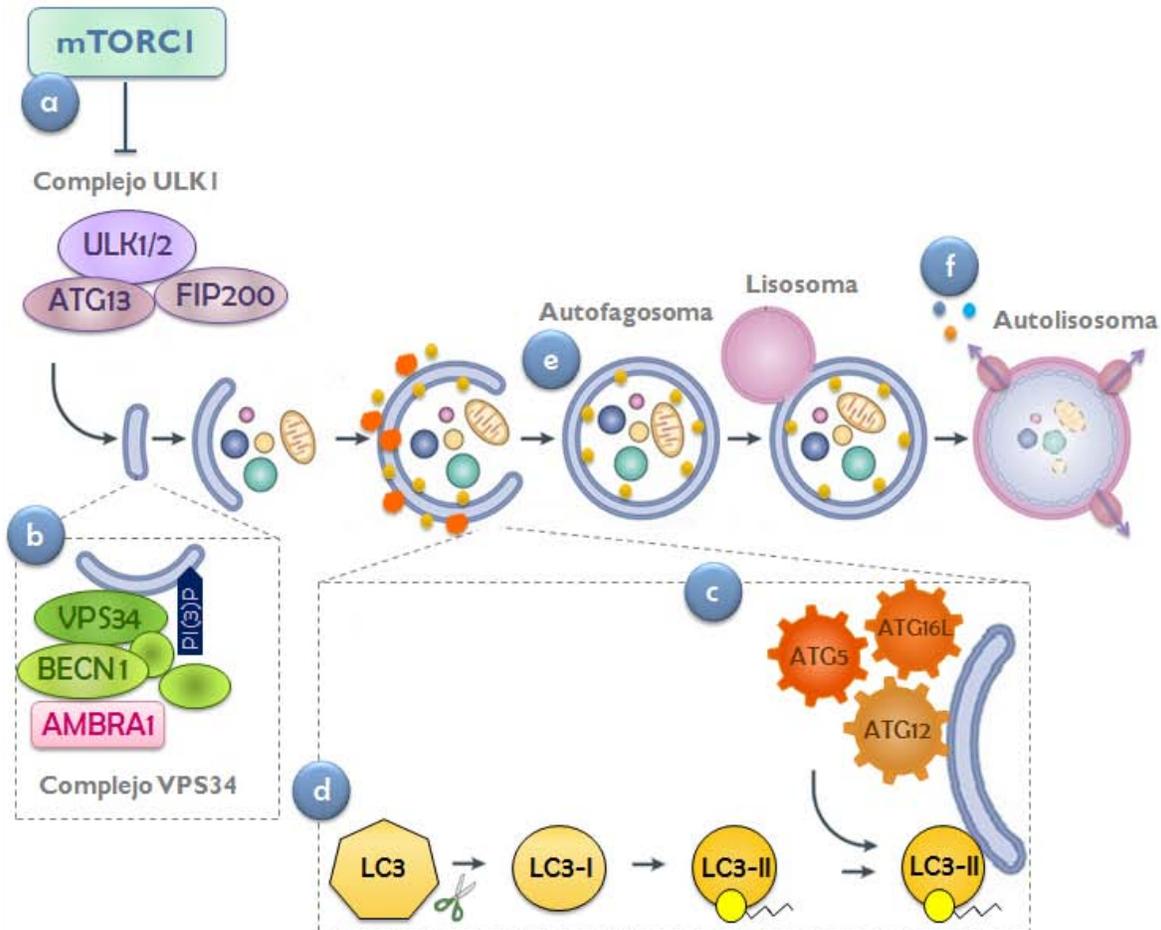


Figura 4. Vía autofágica. mTORC1 inhibe al complejo que inicia la formación del autofosoma (ULK1/2-ATG13-FIP200) cuando censa un nivel celular adecuado de aminoácidos. Cuando mTORC1 se inactiva, con rapamicina o estímulos que inducen la autofagia, (a) ULK1/2 se defosforila y activa el complejo ULK1/2-ATG13-FIP200 que regula positivamente al (b) complejo encargado de la nucleación de la vesícula: VPS34(PI3K-III)-p150-BECN1-ATG14L. El complejo VPS34 produce PI(3)P, lo que permite el reclutamiento de las proteínas encargadas de la elongación de la vesícula: (c) el complejo ATG12-ATG5-ATG16L y (d) la proteína LC3-PE(también conocida como LC3-II). Los (e) autofosomas maduros se fusionan con los lisosomas, formando (f) autolisosoma; donde la membrana interna del autofosoma es degradada junto con su contenido.

Modificado de Mariño 2014.

Los autofosomas maduros pueden fusionarse con cuerpos multivesiculares (MVBs) o con endosomas tempranos o tardíos, previo a hacerlo con los lisosomas. El término anfisomas es usado para designar esta fusión. Las GTPasas Rab11 y Rab7, el complejo de clasificación endosomal III requerido para el transporte (ESCTR III), y receptor de la proteína unida a NSF soluble (SNARE), proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP)3 y VAMP7, son necesarias para la formación tanto de anfisomas como de autolisosomas (Mehrpour 2010).

En los autolisosomas las hidrolasas ácidas, incluidas catepsinas, lipasas y enzimas glucolíticas, degradan el contenido autolisosomal. El paso final de la autofagia es la reintegración de las moléculas degradadas o metabolitos al citosol mediante permeasas (Mehrpour 2010) (Figura 4f), o bien su secreción fuera de la célula.

Monitoreo de la autofagia

Como se mencionó anteriormente, la proteína LC3-II es la única proteína de las ATGs que permanece asociada con el autofagosoma maduro y por lo tanto es ampliamente utilizada para monitorear la autofagia, pues su abundancia y localización se relaciona con el número de autofagosomas (Figura 5). Dependiendo del diseño experimental, esta proteína puede detectarse mediante distintas técnicas.

En la inmunoelectrotransferencia se puede distinguir LC3-II de LC3-I porque la adición de PE cambia su movilidad electroforética, migrando LC3-II más rápido. Aunado a esto, es posible determinar la abundancia de p62/SQSTM1 como un indicador del flujo de la autofagia, ya que esta proteína une sustratos ubiquitinados a LC3-II y se degrada junto con el cargo engullido por el autofagosoma. Cuando hay una inhibición del flujo de la autofagia, por ejemplo cuando no se fusionan los autofagosomas con los lisosomas, se acumula p62/SQSTM1, por lo que su abundancia refleja una interrupción del flujo autofágico (Klionsky 2016).

Por microscopia de fluorescencia se puede determinar la localización intracelular de LC3-II por inmunodetección o cuando se halla fusionada a proteínas fluorescentes. Este método es de gran utilidad en estudios *in vivo*, para lo cual se requiere de organismos transgénicos que la expresen (Klionsky 2016). Mizushima y colaboradores desarrollaron una línea de ratones transgénicos que expresan GFP-LC3 bajo el control de un promotor artificial que permite una expresión ubicua (llamado CAG, se describe en la sección de MATERIAL Y MÉTODOS) (Mizushima 2004). Este modelo murino es ampliamente utilizado.

Los autofagosomas también se pueden observar por microscopia electrónica como estructuras con dos membranas paralelas entre las que se encuentra una hendidura brillante; pueden contener porciones de citoplasma u organelos que lucen morfológicamente intactos, si no se tiene la certeza de que lo observado sean autofagosomas también puede emplearse inmuno-electro microscopia con partículas de oro para detectar LC3-II (Klionsky 2016).

Colorantes que se acumulan en vesículas ácidas a menudo se usan para detectar la presencia de autolisosomas o lisosomas (Figura 5), claro está que no se puede considerar como exclusivos para reconocer solo estas vesículas. Ejemplos de estos colorantes son naranja de acridina y LysoTracker.

La naranja de acridina se acumula en organelos ácidos como lisosomas, autolisosomas, anisomas, vesículas endocíticas, vesículas secretorias e incluso en porciones de la red *Trans* del Golgi (Jiang 2009). Aunque la tinción con naranja de acridina es un método utilizado en el análisis de la autofagia, deben realizarse métodos complementarios que precisen la presencia de vacuolas autofágicas (Jiang 2009). Por ello, también es útil el empleo de LysoTracker, un fluoróforo unido a una base débil que se acumula en la membrana organelos ácidos, como los lisosomas y autolisosomas.

Para identificar autofagosomas específicamente se puede emplear el colorante CytoID® que pierde la fluorescencia a pH ácido, lo que lo hace incapaz de detectar autolisosomas, lisosomas y demás vesículas ácidas.

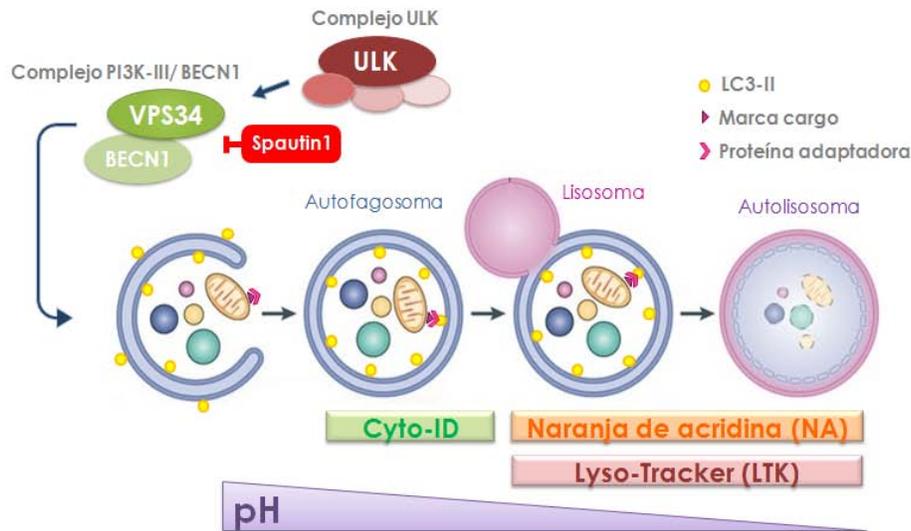


Figura 5. Monitoreo de la autofagia. Para evaluar la actividad autofágica dentro de una célula existen varios métodos complementarios que consisten en analizar: la acumulación de colorantes en vesículas dependiendo del pH (Cyto-ID, NA y LTK); la presencia de proteínas autofágicas (LC3-II y BECN1) y el monitoreo del flujo autofágico empleando inhibidores (Spautin1) e inductores. Ver texto para descripción detallada.

Modificado de Mariño 2014.

La autofagia es un proceso dinámico que involucra distintas etapas, por lo que es de gran utilidad el uso de inhibidores e inductores para su estudio. Los inhibidores más ampliamente utilizados actúan a dos distintos niveles, evitando: la formación del autofagosoma o la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Klionsky 2016). El mecanismo mediante el cual actúan los primeros consiste en inhibir a la PI3K de la clase III, pero es importante considerar que los fármacos actuales también inhiben a la clase I de estas cinasas, por lo que también modifican otros procesos en los que estas enzimas están involucradas. Los segundos funcionan aumentando el pH lisosomal, ya que son bases débiles o bloqueadoras de la ATPasa vacuolar, que al mismo tiempo podrían modificar la acidificación de otros organelos, como los endosomas o de vesículas secretorias.

Recientemente ha sido descrito un nuevo inhibidor capaz de impedir la inducción de la autofagia: Spautin1 (por las siglas en inglés de “inhibidor específico y potente de autofagia 1”; Figura 5). El mecanismo consiste en que Spautin1 inhibe a dos peptidasas ubiquitin-específicas (USP)10 y USPI3, las cuales regulan la desubiquitinación de BECN1 y VPS34, por lo tanto la marca de ubiquitina permanece en ellas, lo que conduce a su degradación por el proteosoma (Liu 2011). Aunque se reporta a Spautin1 como un inhibidor específico, hay que considerar que podría inducir la degradación de cualquier proteína que también sea sustrato de USP10 y USPI3, como p53, y otras proteínas blanco que aún se desconozcan.

Si bien el uso de inhibidores farmacológicos es útil, hay que tener en cuenta que hasta el momento no existe uno específico para la vía autofágica. Una opción adicional es analizar mutantes con pérdida de función de ATGs específicas o bien atenuar la expresión de genes *Atgs* claves en el proceso autofágico mediante ácido ribonucleico (RNA) de interferencia (RNAi) (Klionsky 2016).

La deficiencia de nutrientes durante cortos períodos de tiempo o el inhibir la cinasa mTOR con rapamicina se encuentran dentro de los estímulos inductores más empleados. Recientemente también se ha reportado que la trehalosa puede inducir la autofagia a través de la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Mardones 2016).

Autofagia y desarrollo en vertebrados

El desarrollo y la diferenciación son procesos que a menudo son acompañados por un remodelamiento tisular y celular drástico, donde se requiere una gran degradación. La autofagia podría estar participando en la eliminación del material pre-existente y contribuyendo con material para la creación de nuevos componentes (Mizushima 2011).

La renovación celular más dramática ocurre justo después de la fertilización, donde proteínas y RNA mensajeros (RNAm) maternos son degradados mientras las nuevas proteínas codificadas por el genoma del cigoto comienzan a ser sintetizadas, acompañadas de un remodelamiento de los organelos celulares. En mamíferos, la fertilización induce una autofagia masiva que es esencial para el desarrollo en la etapa de pre-implantación (Di Bartolomeo 2010; Mizushima 2011). Antes de la implantación la disponibilidad de nutrientes podría estar limitada para los embriones y por lo tanto la autofagia podría funcionar como el sistema principal que proporciona los metabolitos necesarios para producir nutrientes (Di Bartolomeo 2010; Mizushima 2011). El período perinatal es otra etapa crítica, pues se presenta una severa restricción de nutrientes. Ratones *Atg5^{-/-}* sobreviven a la embriogénesis, se piensa que con el *Atg5* del oocito es suficiente para la inducción de la autofagia, sin embargo mueren poco después de nacer ya que no son capaces de alimentarse (Kuma 2004). En estudios posteriores se demostró que la autofagia y la proteína ATG5 son esenciales para etapas del desarrollo muy tempranas, pues cuando fertilizaron células deficientes de *Atg5* con esperma *Atg5⁻* el desarrollo embrionario se detiene en el estadio de 8 células (Tsukamoto 2008). Durante la formación del blastocelo se requiere que las células muriendo secreten lisofosfatidilcolina, que sirve como una señal para que las células fagocíticas las eliminen (Qu 2007). La autofagia es necesaria para la secreción de este fosfolípido y en cuerpos embrionarios deficientes de los genes pro-autofágicos *Atg5* y *Becn1* las células muertas se acumulan (Qu 2007). La carencia de la proteína BECN1 provoca un retraso que resulta letal en el día embrionario (E) 7.5 (Yue 2003).

El correcto desarrollo del SNC depende de una maquinaria autofágica intacta. Los genes *Atg5* y *Atg7* son necesarios para la función motora y su deficiencia en ratones causa

la acumulación progresiva y letal de proteínas ubiquitinadas; en el día E15.5 se presentan signos de neurodegeneración (revisado en Di Bartolomeno 2010). A esta misma edad embriones de ratón deficientes de LAMP-1/LAMP-2 mueren y exhiben predominantemente anomalías craneofaciales (Ceconi 2008).

La relación más directa entre la autofagia y el neurodesarrollo de los mamíferos se logró junto con la identificación de la proteína AMBRA1 (activating molecule in BECLIN1-regulated autophagy), que induce autofagia al interactuar con BECN1 y favorecer la activación del complejo PI3K-III. Hasta el momento AMBRA1 es una proteína exclusiva de vertebrados (Antonoli 2015).

Con la técnica de *gene trap*, que consiste en interrumpir un gen con la inserción de un gen reportero que cada bajo la regulación del promotor del gen interrumpido, se logró identificar el patrón de expresión de *Ambra1*, el cual varía a lo largo del tiempo. En la etapa E8.5 es predominante en el neuroepitelio; para el día E11.5 se expresa en la parte más ventral de la médula espinal, vesículas encefálicas, retina neural, los ganglios de la raíz dorsal y los miembros. Además esta técnica genera un transcrito trunco, no funcional, de la proteína interrumpida, generando mutantes con pérdida de función. La mutación homocigótica de *Ambra1^{gt/gt}* provoca DTNs en la mayoría de los embriones, como exoencefalia y/o espina bífida entre los días E10-E14.5. se presenta un incremento de la proliferación celular en el día E8.5, que causa un engrosamiento del neuroepitelio en el diencefalo y un alargamiento de la espina dorsal. A partir de E9.5 la proliferación es comparable con embriones silvestres, pero se observa una apoptosis excesiva en regiones particulares del sistema nervioso central; la letalidad ocurre en el estadio E16.5 (Fimia 2007).

En ausencia de AMBRA1 los niveles de LC3-II y GFP-LC3 disminuyen en el neuroepitelio, lo que indica un nivel de autofagia basal disminuido. Estas mismas células presentan una fuerte señal de proteínas ubiquitinadas, lo que corrobora un deterioro de la vía autofágica (Fimia 2007). Estos datos sugieren que la autofagia inducida por AMBRA1 es necesaria para el control de la proliferación celular y supervivencia durante el desarrollo del sistema nervioso central.

Cabe resaltar que los modelos deficientes de *Becn1* o *Ambra1* muestran distintos fenotipos, a pesar de que ambos formen parte del mismo complejo de inducción. Esto podría deberse a que en comparación con la expresión de *Ambra1* restringida al neuroectodermo, *Becn1* es un factor más ubicuo durante las primeras etapas de la embriogénesis. Si bien en el ratón mutante en *Ambra1* la autofagia está disminuida (Fimia 2007), cabe la posibilidad de que los defectos en el cerrado del tubo neural se deban a una función adicional que AMBRA1 pudiera tener. Por lo tanto, es necesario demostrar que la inhibición de la autofagia causa defectos en el tubo neural.

En estudios previos se reportó que durante el desarrollo embrionario en tejidos que se fusionan, como el estornón y el paladar, existe un incremento de muerte celular (identificada con naranja de acridina). Éstas células también presentaron un aumento de

especies reactivas de oxígeno (ERO) y precipitación de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), que puede ser indicativo tanto de muerte celular como de aumento de ERO. El aumento de ERO se verificó por la oxidación de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DAC-FC) (Salas-Vidal E. 1998). Si bien en el trabajo original de Salas-Vidal *et. al.* se interpretó la tinción de naranja de acridina como indicativo de muerte celular, con el descubrimiento de la autofagia en los últimos años, se ha descrito que la tinción con naranja de acridina es útil para identificar células con un aumento en la autofagia (Jiang 2009).

Durante la neurulación hay gran presencia de células muertas en los pliegues neurales durante y después del cierre. En estudios ultraestructurales se atribuyó a la apoptosis este proceso por sus rasgos característicos. Pero cabe la posibilidad que la autofagia contribuya al cierre del tubo neural, ya que existe una interacción molecular entre autofagia y apoptosis (Cecconi 2008; Mehrpour 2010; Yang 2010). Inclusive, los fenotipos en ratones deficientes de apoptosis o autofagia lucen similares (Cecconi 2008).

Massa y colaboradores estudiaron el papel de la apoptosis en el cierre del tubo neural en ratones mutantes para las proteínas CASP-3 y APAF-1. En ambos casos notaron que la apoptosis no es requerida en los cierres de la región del prosencéfalo y a lo largo de la región espinal. Confirmaron experimentalmente que para el completo cierre del tubo neural no es esencial la muerte celular promovida por apoptosis, o al menos la mediada por CASP-3 (podría ser la promovida por CASP -6 o -7) (Massa 2009). Es posible que otros mecanismos de muerte estén participando o que no se requiere de la muerte celular para el cierre del tubo neural en estas regiones.

La autofagia contribuye a la muerte celular programada en algunas circunstancias, por ejemplo durante la degeneración del intestino en la metamorfosis de *Drosophila* (Berry 2007). Aunque hasta el momento no exista evidencia experimental de que suceda muerte celular programada por autofagia en el desarrollo de mamíferos tal vez la autofagia podría contribuir en la muerte celular programada independiente de la maquinaria apoptótica. Se ha demostrado que las ERO inducen la autofagia en diversos modelos (Lee 2012) y también participan en la inducción de la muerte celular durante el desarrollo (Salas-Vidal 1998). Tal vez, las ERO que se detectaron en la línea de fusión del paladar y del esternón podrían estar estimulando la autofagia, y a su vez la muerte celular programada por autofagia.

Adicionalmente la autofagia podría participar en la fusión de tejidos promoviendo la renovación celular durante la diferenciación o alterando la progresión del ciclo celular (Cecconi 2008). O bien, considerando que la autofagia puede en ocasiones contribuir a la secreción de moléculas, podría de esta forma participar en la morfogénesis del tubo neural sin necesariamente promover la muerte celular. En cualquier caso, resulta interesante demostrar que efectivamente aumenta la autofagia en las células que se encuentran en la línea de fusión de tejidos, como sugiere la abundante tinción con naranja de acridina en esas zonas (Salas-Vidal 1998).

De particular interés resulta la participación de la autofagia durante la senescencia celular, porque se describió que el proceso de senescencia ocurre también durante el desarrollo embrionario en diversas estructuras, incluyendo zonas donde ocurre fusión de tejidos: a lo largo de la línea de fusión del tubo neural y del esternón (Muñoz-Espín 2013; Storer 2013).

Senescencia celular programada

La senescencia celular ha sido descrita como un arresto estable del ciclo celular en respuesta a múltiples tipos de daño (Muñoz-Espín 2013; Storer 2013; Muñoz-Espín 2014), por lo que clásicamente se le ha relacionado con condiciones patológicas. Sin embargo, también se han hallado células senescentes en condiciones fisiológicas, durante el desarrollo embrionario de diversas estructuras (Muñoz-Espín 2013; Storer 2013). Éste tipo de senescencia se ha denominado *senescencia celular programada* (Muñoz-Espín 2013).

Experimentalmente las células senescentes se distinguen por presentar la combinación de varios marcadores (Muñoz-Espín 2014):

- Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal): la enzima β -galactosidasa se encuentra en el lisosoma y se encarga de degradar galactósidos en monoscáridos. El incremento de la actividad de esta enzima puede detectarse mediante un ensayo que se realiza a pH subóptimo. En células senescentes se ha denominado actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal) a este incremento.
- Detención del ciclo celular: ausencia de marcadores proliferativos (Ki67 o incorporación de BrdU) y expresión de inhibidores del ciclo celular (p53, p16 y p21).
- Focos nucleares de heterocromatina constitutiva (H3K9me3).
- Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP por sus siglas en inglés): las células senescentes modifican el microambiente circundante mediante la secreción de factores de crecimiento, citocinas/quimiocinas, ERO y proteínas remodeladoras de la matriz extracelular (MEC) como las metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Davalos 2010; Storer 2013).

En los reportes de senescencia celular programada las células fueron positivas a SA- β -gal, y expresaron el inhibidor del ciclo celular p21 (Muñoz-Espín 2013; Storer 2013). La ausencia de marcadores del daño al DNA y el hecho de que de que embriones deficientes en p21 mostrarán desarrollo inadecuado (Muñoz-Espín 2013; Storer 2013), sugiere que la senescencia celular programada es un proceso fisiológico y necesario para el correcto desarrollo embrionario. Podría mediar la remodelación de numerosas estructuras durante el desarrollo embrionario a través de su fenotipo secretor.

En células con senescencia inducida por el oncogen *Ras* la autofagia contribuye a la secreción del SASP, al provocar una reorganización en el sistema endomembranoso (Narita 2011).

Además, recientemente se describió que la autofagia regula la secreción de ciertas moléculas, independientemente de la senescencia. Por ejemplo la proteína Acb1 en levaduras (Duran 2010; Manjithaya 2010), e interleucina (IL)-1 β , IL-18, la proteína BI del grupo de alta movilidad (HMGB1) (Dupont 2011) y el factor von Willebrand (Torisu 2013) en células de mamífero.

Como se ha mencionado con anterioridad, el cierre del tubo neural requiere de una intrincada coordinación de varios procesos celulares que involucran eventos tanto intracelulares como extracelulares. Se ha comprobado que las metaloproteínas de la matriz (MMP) tienen un papel fundamental en la migración, proliferación y apoptosis en eventos fisiológicos (Vu 2000; Van Hove 2012).

Integrando la información anterior, es posible que la autofagia contribuya a la secreción de MMPs, ya sea por si sola o contribuyendo al establecimiento del fenotipo senescente durante la formación del tubo neural.

Metaloproteinasas de la matriz

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) son una familia de proteínas cuyos miembros comparten dominios funcionales comunes y mecanismos de activación. Son endopeptidasas dependientes de Ca⁺² y Zn⁺² que actúan a pH neutro (Vu 2000). De acuerdo a la especificidad de sustrato y organización de dominios se clasifican en (Monson-Orran 2012):

- **Colagenasas:** MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-18.
- **Gelatinasas:** MMP-2, MMP-9.
- **Estromelisin:** MMP-3, MMP-10.
- **MMP asociadas a membrana:** MMP-14(MTI-MMP), MMP-15, MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17, MMP-24, MMP-25.
- **Matrilisinas:** MMP-7, MMP-26, MMP-11

Se sintetizan como proenzimas que pueden ser secretadas al medio extracelular (MMP) o permanecer unidas a la membrana celular (MT-MMP) y se activan cuando el propéptido del extremo amino terminal es removido. Dado que son capaces de degradar la mayoría de los componentes de la MEC, se encuentran bajo la regulación de los miembros de la familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP) (Vu 2000).

Aunque su principal función es remodelar la MEC, también son requeridas para la migración celular; para modificar el microambiente extracelular y el comportamiento

celular; y para modular la actividad de moléculas biológicamente activas liberándolas de su almacenamiento o de sus inhibidores (Vu 2000).

Función de metaloproteinasas de la matriz en el desarrollo

Para el desarrollo de la placenta es necesario que las células del trofoblasto migren e invadan el tejido materno. Estas células expresan altos niveles de MMP-9 y su inhibición por la sobreexpresión de TIMP-1 o inhibidores químicos de MMPs generan deciduas de menor tamaño, desplazamiento mesometrial y orientación incorrecta del embrión, evidenciando que las MMPs participan la implantación (Vu 2000).

La formación de los huesos requiere una activa remodelación de matrices especializadas (cartílago y hueso), así como un conjunto de actividades coordinadas de varios tipos celulares (condrocitos, células endoteliales, condroclastos, osteoblastos, osteoclastos, entre otras). Se ha implicado a MMP-9 y MTI-MMP en el desarrollo del hueso, ya que en ratones con la MMP-9 inactivada los cartílagos se hallan hipertrofiados, las placas esqueléticas sobrecrecidas y se impide la invasión vascular en los cartílagos. La deficiencia de MTI-MMP también provoca problemas esqueléticos pero distintos a los provocados por la MMP-9. La ausencia de esta metaloproteinasa unida a membrana provoca defectos craneofaciales, osteopenia, artritis y fibrosis de tejidos blandos (Vu 2000).

Las MMPs también influyen en la organización celular. Por ejemplo, cuando los adipocitos son cultivados secretan MMP-2 y forman conjuntos multicelulares; si se inhibe la actividad de MMP-2 se pierde la migración celular y la organización estructural de estos conjuntos multicelulares. Otro ejemplo ocurre durante la morfogénesis tubular y su ramificación durante la angiogénesis y el desarrollo de varias estructuras epiteliales. En un sistema *in vitro* se impide la formación tubular de células HUVEC, cultivadas en matrigel o geles de colágeno, al inhibir la actividad de las MMPs. Relacionado con los epitelios la sobreexpresión de MMP-3 induce la transición epitelio-mesénquima en células epiteliales mamarias (Vu 2000).

Tomando en conjunto estas observaciones, en este trabajo proponemos que la autofagia contribuye a la fusión de tejidos, regulando la secreción de moléculas que permiten remodelar el tejido, como las metaloproteinasas que se han descrito en el SASP. Estudiaremos la fusión del tubo neural como modelo para probar esta hipótesis.

HIPÓTESIS

La autofagia y la senescencia participan en el proceso del cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario, promoviendo la secreción de moléculas que remodelen la matriz extracelular.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que existen células con mayor autofagia o con fenotipo senescente en la línea de fusión del tubo neural que podrían secretar metaloproteinasas de la matriz.

Objetivos particulares

1) *Determinar si efectivamente existen células con mayor autofagia a lo largo de la línea de fusión del tubo neural.*

Metas específicas:

- a) Obtener embriones en las etapas E8.5 para observar el proceso de fusión del tubo neural.
- b) Determinar si a lo largo de la línea de fusión del tubo neural se observan células que se tiñan con naranja de acridina, pues solo se ha observado en la línea de fusión del paladar y del esternón.
- c) Verificar que el patrón de tinción que se encuentre con naranja de acridina (NA) refleja vesículas ácidas, al comparar la tinción de lisosomas con LysoTracker.
- d) Determinar la presencia de autofagosomas con el colorante específico Cyto-ID[®] y analizar la distribución de GFP-LC3 en un ratón transgénico que la expresa constitutivamente.
- e) Detectar por inmunofluorescencia la presencia de BECN1, proteína activadora de la vía autofágica.

2) *Determinar la presencia de células senescentes en la línea de fusión del tubo neural.*

Metas específicas:

- a) Realizar ensayo de actividad SA- β gal en embriones enteros en etapa E8.5.
- b) En caso de encontrar células SA- β gal positivas, corroborar la presencia de células senescentes identificando el aumento de la expresión de p21 en la línea de fusión del tubo neural.
- c) En caso de haber encontrado células senescentes, comparar el patrón de tinción (SA- β gal) e inmunomarcaje (p21) adquirido con el obtenido por los colorantes NA, LysoTracker y Cyto-ID.

3) *Determinar la presencia de metaloproteínas de la matriz en la línea de fusión del tubo neural.*

Metas específicas:

a) Detectar por inmunofluorescencias la presencia de MMP-3,-2 y -9 a lo largo de la línea de fusión del tubo neural.

4) *Establecer las condiciones para el desarrollo extra-uterino de embriones de E8.5 que permita estudiar el cerrado el tubo neural mientras se manipula la autofagia.*

Metas específicas:

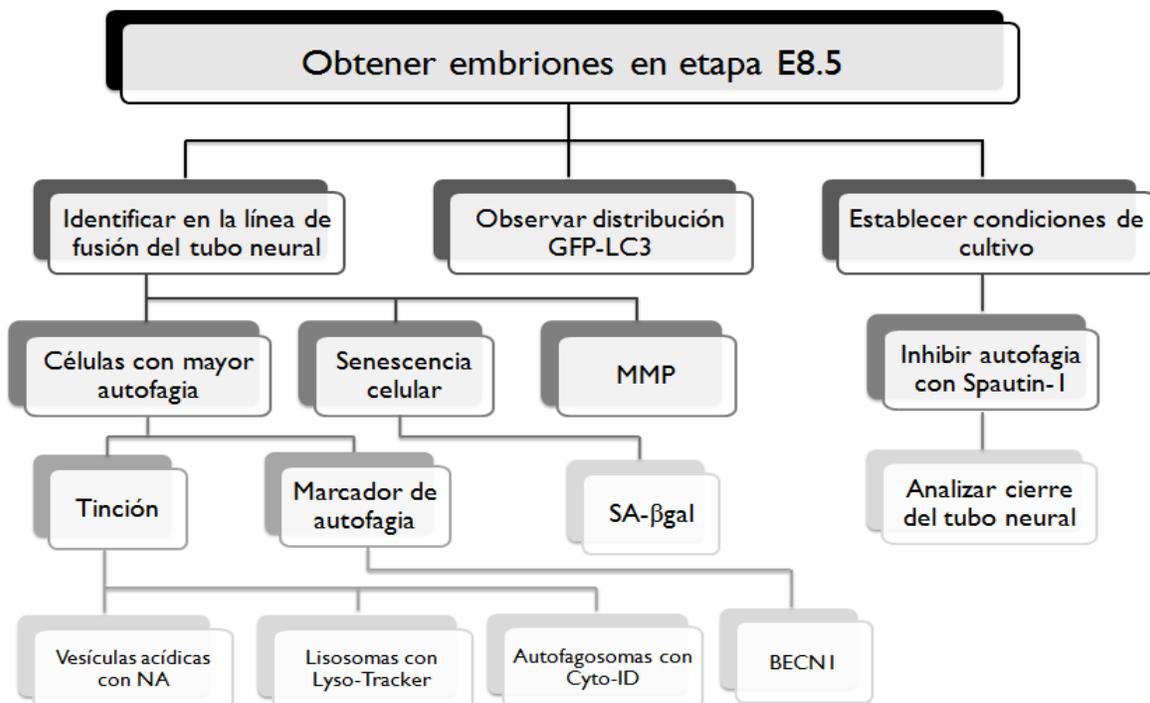
a) Optimizar las condiciones de cultivo de embriones de E8.5-E9.5 para que se mantengan viables durante 12-24 horas.

5) *Determinar si la inhibición de la autofagia altera el cerrado del tubo neural.*

Metas específicas:

a) Comparar el desarrollo de embriones cultivados en presencia o ausencia del inhibidor de autofagia Spautin-I.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales se manipularon de acuerdo a la recomendación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Fisiología (Protocolo CICUAL-SCO-51-15IN). Se utilizaron ratones CDI o bien transgénicos GFP-LC3 (RIKEN #BRC00806) con fondo genético C57BL/6N. El gen que codifica para la proteína fusionada GFP-LC3 se encuentra bajo el control del *promotor* CAG, conformado por el enhancer inmediato-temprano de citomegalovirus (CMVie) fusionado con el promotor de la β -actina de pollo (CAG) (Mizushima 2004), por lo que se expresa de manera ubicua.

Aislamiento de embriones

PBS 10x

Para 100 ml:

- 8g de Na Cl
- 0.2g KCl
- 1.15g Na_2HPO_4
- 0.24g KH_2PO_4

Preparación:

1. En matraz de 100 ml agregar los solutos con 80 ml de agua Milli-Q.
2. Agitar.
3. Ajustar pH 7.4 con NaOH.
4. Aforar a 100 ml y esterilizar en autoclave.

Mantener a temperatura ambiente (TA), almacenar por no más de tres meses.

PBS IX

Para 45 ml:

- PBS 10x
- Agua grado cultivo

Preparación:

1. En campana de cultivo agregar 40.5 ml de agua grado cultivo en tubo estéril.
2. Agregar 4.5 ml de PBS 10x.

Mantener a TA, almacenar por no más de tres meses.

PBS IX + Ca^{+2}

Para 45 ml:

- Agua Milli-Q
- CaCl_2 90 mM
- PBS 1x

Preparación:

1. Pesar 9.982 mg de CaCl_2 y disolver en 1ml de agua Milli-Q. (Solución stock de CaCl_2 90 mM).
2. Tomar 450 μl de Solución stock CaCl_2 y diluirlos en 45 ml de PBS 1x. Mantener a TA, almacenar por no más de tres meses.

Medio de cultivo L-15 suplementado

Para 45 ml:

- Medio de cultivo Leibovitz's L-15 (Gibco #11415064)
- Suero bovino fetal (SBF) desactivado

Preparación:

1. Alicuotar 42.75 ml de medio L-15 en tubos estériles.
2. Agregar 2.25 ml de SBF a cada tubo y mezclar.

Mantener a 4°C.

Procedimiento

De acuerdo al Protocolo 2 publicado en el libro *Manipulating the mouse embryo* (Nagy 2003):

1. Ratones hembra gestantes de la cepa CDI se sacrifican por dislocación cervical.
2. Abrir la cavidad abdominal haciendo una incisión en la piel en la línea media con tijeras quirúrgicas.
3. Tirar de los bordes resultantes en la dirección opuesta a la abertura y exponer el peritoneo.
4. Con pinzas de punta curva levantar el peritoneo, hacer incisión con tijeras y continuar hasta abrirlo por completo, evitando cortar órganos.
5. Retirar las vísceras con las pinzas y localizar los dos cuernos del útero, los oviductos y los ovarios, cortar a la mitad de los oviductos y el ligamento que une al útero con el piso pélvico.
6. Retirar la mayor parte de mesometrio y tejido graso que sea posible.
7. Cortar el útero de tal manera que los embriones se liberen uno a uno y colocarlos en una placa de cultivo de 35 mm con medio L-15 suplementado a temperatura ambiente. Colocar la placa de cultivo sobre hielo, mantenerlos así hasta finalizar la extracción.
8. En el microscopio estereoscópico retirar el útero que envuelve la decidua donde se halla el embrión.
9. Retirar la decidua.
10. Remover cuidadosamente el saco vitelino y el amnios.

Tinción de embriones para detectar autofagosomas y vesículas ácidas

Soluciones

Solución de trabajo naranja de acridina (NA) para detectar vesículas ácidas

- Solución stock 1 mg/ml Naranja de Acridina (Sigma Aldrich #A6014) en PBS.
 - PBS IX +Ca⁺²
- Preparación:
1. Por cada 1 ml de PBS IX+Ca⁺² agregar 2 µl de la solución stock de Naranja de Acridina y mezclar

Solución de trabajo LysoTracker para detectar lisosomas

- Solución stock 1mM de LysoTracker (Molecular Probes # L7528)
 - PBS IX +Ca⁺²
- Preparación:
1. Por cada 1 ml de PBS IX +Ca⁺² agregar 1 µl de solución stock de LysoTracker y mezclar.

Solución de trabajo Cyto-ID[®] para detectar autofagosomas

- Del Kit Cyto-ID[®] (ENZO #51031-K200): Buffer de ensayo IX, colorante nuclear Hoechst 33342 y reactivo de detección verde Cyto-ID
- Preparación:
1. Agregar 1 µl del colorante nuclear y 1 µl del reactivo de detección Cyto-ID por cada 1 ml de buffer de ensayo IX.

Procedimiento

1. Colocar 500 µl de cada una de las soluciones de trabajo en cada pozo de una placa de 4 pozos (Nunc #179830) y a continuación los embriones.
2. Incubar los embriones a 37°C durante 15 minutos para naranja de acridina y LysoTracker, 30 minutos para Cyto-ID.
3. Realizar dos lavados con PBS IX +Ca⁺², para los embriones incubados con naranja de acridina o LysoTracker, o con buffer de ensayo IX, para los embriones incubados con Cyto-ID, durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Colocar los embriones en posición correcta sobre un porta objetos y a continuación colocar un cubreobjetos con silicón en las esquinas para poder visualizar al embrión.

Microscopios empleados: microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-u, microscopio de epifluorescencia Nikon eclipse Ti-u, microscopio confocal Zeiss LSM710.

Ensayo de β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal)

Soluciones y reactivos

Solución de trabajo formaldehído al 2%, glutaraldehído 0.2% en PBS

- Formaldehído al 37%
- Glutaraldehído al 50%
- PBS

Preparación:

A 500 μ l de PBS agregar 27 μ l de formaldehído al 37% y 0.2 μ l de glutaraldehído al 50%, mezclar.

X-gal en dimetilformamida

- X-gal
- Dimetilformamida (DMTH)

Preparación:

Disolver 0.5 mg de X-gal en 25 μ l de DMTH. Preparar esta solución el mismo día del ensayo. Mezclar los componentes y mantenerla a -20°C , protegida de la luz hasta su uso.

Solución fosfato de sodio (0.2 M)

- Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)
- Agua Milli-Q

Preparación:

Disolver el 28.4 g de Na_2HPO_4 en 10ml de Agua Milli-Q.

Solución ácido cítrico (0.1 M)

- Ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$)
- Agua Milli-Q

Preparación:

Disolver 210 mg de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de Agua Milli-Q.

Buffer ácido cítrico/ fosfato de sodio (0.2 M)

- Solución 0.1M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$
- Solución 0.2M Na_2HPO_4

Preparación:

Mezclar 3.68 ml de la solución 0.1M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$ con 6.31 ml de la solución 0.2M Na_2HPO_4 y ajustar pH a 6.0

Ferricianuro de potasio (100 mM)

- Ferricianuro de Potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)
- Agua Milli-Q

Preparación:

Disolver 32.926 mg de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 1ml Agua Milli-Q.

Ferrocianuro de potasio (100 mM)

- Ferrocianuro de Potasio
($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)
- Agua Milli-Q

Preparación:

Disolver 42.242 mg de $K_4Fe(CN)_6$ en 1 ml de Agua Milli-Q.

Cloruro de sodio (5 M)

- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Agua Milli-Q

Preparación:

Disolver 4.383 g de NaCl en 15 ml de agua Milli-Q. Ajustar pH a 6.

Cloruro de magnesio (1 M)

- Cloruro de Magnesio 6-Hidrato
($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
- Agua Milli-Q

Preparación:

Disolver 203.30 mg en 1 ml de agua Milli-Q.

Procedimiento:

1. Aislar embriones de la etapa deseada.
2. Lavar dos veces con PBS a temperatura ambiente (TA), 5 minutos.
3. Fijar 3 minutos a TA con 2% formaldehído/0.2% glutaraldehído.
4. Lavar dos veces con PBS.
5. Incubar a 37°C con la solución de tinción al menos 16 horas.

Para 500 μ l de solución agregar:

X-gal/DMTH	25 μ l
Buffer ácido cítrico/fosfato de sodio 0.2 M	100 μ l
100 mM Ferrocianuro de potasio	25 μ l
100 mM Ferricianuro de potasio	25 μ l
5 M Cloruro de sodio	15 μ l
1 M Cloruro de magnesio	1 μ l
Agua Milli-Q	310 μ l

6. Retirar solución de tinción y lavar dos veces con PBS.

Microscopio empleado: Nikon SMZ 800 con cámara Nikon coolpix 4300.

Immunofluorescencia en secciones de embrión

Soluciones

PBS 1x

Paraformaldehído al 4% en PBS (PFA 4%)

- 10 g de paraformaldehído
- 250 ml PBS 1X pH 7.4

Preparación:

Disolver los 10 g de paraformaldehído en 200 ml de PBS 1X a 60 °C. Agregar volumen restante. Hacer alícuotas de 2ml, congelar.

Solución sacarosa al 10%, 20% y 30%

- Sacarosa
- Agua Milli-Q

Preparación:

En un volumen de 30 ml de agua Milli-Q agregar 3, 6 o 9 g de sacarosa, para obtener soluciones al 10%, 20% y 30% respectivamente.

Solución de permeabilización (Tritón 0.3% / PBS)

- PBS 1x
- Tritón x-100

Preparación:

Para 1 ml de solución agregar 3 µl de Tritón x-100 en 1ml de PBS 1x. Vortexear hasta disolver el Tritón (400 µl por laminilla).

Solución de bloqueo (BSA 3% / PBS)

- PBS 1x
- Albúmina sérica bovina (BSA)

Preparación:

Agregar 30 mg de BSA en 1ml de PBS 1x. Vortexear hasta disolver (400 µl por laminilla).

Solución de anticuerpos (BSA 1% / Tritón 0.1% / PBS)

- PBS 1x
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Tritón x-100

Preparación:

Agregar 10 mg de BSA, 1µl de Tritón x-100 en 1 ml de PBS 1x. Vortexear hasta disolver (200 µl por laminilla).

Procedimiento

Obtención de cortes de tejido congelado.

1. Aislar embriones de la etapa deseada.
2. Fijar los embriones en PFA 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA), 500ul en placa de 4 pozos.
3. Lavar con PBS 1x, 5 minutos, dos veces a TA.
4. Deshidratar a los embriones a través de diluciones seriales crecientes 10%, 20% y 30% de sacarosa a 4°C en frascos de vidrio, durante 24 horas en 8 ml de solución.
5. En un molde de silicón agregar una gota de Tissue-Tek O.C.T Compound (Sakura Finetek #4583), colocar el embrión lo más “seco” posible y agregar otra gota de Tissue-tek. Orientar al embrión en la posición adecuada y hacer un esquema para mejorar la localización de la muestra en la matriz solidificada. Colocar el molde sobre hielo seco hasta que el bloque se congele. Mantener bloques congelados a -80°C.
6. Media hora antes de comenzar a obtener los cortes, poner los bloques que se van a cortar a -20°C. Obtener cortes de 12 µm en el crióstato. Las laminillas con los cortes obtenidos deben ser mantenidas a 4°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia

7. Utilizar un plumón hidrofóbico para limitar el área donde se encuentra el tejido. Lavar durante 10 minutos con PBS los cortes.
8. Retirar el PBS y permeabilizar con *solución de permeabilización* durante 15 min a TA.
9. Bloquear con *solución de bloqueo* durante una hora a TA.
10. Incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. En la Tabla I se indican las diluciones de los anticuerpos utilizados.
11. Lavar con PBS 1x tres veces, en agitación suave, a TA durante 5 minutos.
12. Incubar con anticuerpo secundario diluido 1:500 en *solución de anticuerpos* a TA, en oscuridad durante una hora. En la tabla I se indican los anticuerpos utilizados.
13. Lavar una vez con PBS 1x durante 5 minutos a TA en oscuridad.
14. Incubar con el colorante de DNA Hoechst 1:1000 (Hoechst Stock Kit Cyto-ID/ PBS) durante 15 minutos a TA en oscuridad.
15. Lavas dos veces con PBS 1x, durante 5 minutos, a TA en oscuridad.
16. Retirar la mayor cantidad posible de PBS, agregar medio de montaje VECTASHIELD Antifaded Mounting Medium (Vector #H-1000) y colocar un cubre objetos, sellar con barniz de uñas y guardar las laminillas protegiéndolas de la luz y a 4°C.

Microscopios empleados: Leica TCS SP5 u Olympus FV1000.

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario
α -Tubulina (Cell signaling #11H10)	1:100	A488 Rabbit (Life Tech-MolProbes #A11034)
N-cadherina (Santa Cruz #sc-7939)	1:100	A594 Rabbit (Life Tech-MolProbes #A11037)
AMBRA1 (Cell signaling #12250)	1:50	A594 Rabbit (Life Tech-MolProbes #A11037)
BECN1 (Santa Cruz #sc-11427)	1:100	A594 Rabbit (Life Tech-MolProbes A11037)
MMP-3 (Santa Cruz #sc-6839)	1:50	A488 Goat (Life Tech-MolProbes #A11059)
MMP-2 (Santa Cruz #sc-8835)	1:50	A488 Goat (Life Tech-MolProbes #A11059)
MMP-9 (Santa Cruz #sc-6840)	1:50	A488 Goat (Life Tech-MolProbes #A11059)

Tabla 1 Anticuerpos empleados en inmunofluorescencias en secciones de embrión

Cultivo de embriones en botellas gaseadas en rotación

Todas las soluciones y materiales empleados deben mantenerse a 37°C y en esterilidad.

Medio de cultivo de embriones 50/50 (Gray 2011)

- Medio DMEM F12 (Gibco #10565018)
 - Suero de rata
 - Filtro 0.45 μ
- Preparación:
1. Mezclar volúmenes similares de DMEM F12 y suero de rata (1 ml por embrión).
 2. Filtrar y mantener a 4°C hasta su uso.

Medio de cultivo libre de suero (Kalaskar 2014)

- Medio DMEM KnockOut(KO) (Gibco #10829018)
 - Sustituto de suero KnockOut (KRS; Gibco # 10828028)
 - Suplemento N-2 (Gibco # 1750248)
 - Albúmina sérica bovina (BSA; Sigma Aldrich #A7906)
 - Mix Penicilina, Estreptomina y Anfotericina B 100x (Gibco #15240062)
- Filtro 0.22 μ
- Preparación:
1. Para 8 ml de medio de cultivo libre de suero pesar 160 mg de BSA, agregarlos a un tubo con 7.2 ml de medio DMEM KO y disolver.
 2. Agregar 800 μ l de KSR, 80 μ l de suplemento N-2 y 80 μ l de Mix Penicilina, Estreptomina y Anfotericina B.
 3. Filtrar y mantener a 4°C hasta su uso.

Procedimiento:

1. Sacrificar a la ratona por dislocación cervical, extraer útero y lavarlo en PBS 1x en caja de cultivo de 35 mm.
2. Cortar el cérvix para separar los dos cuernos uterinos, y colocarlos en dos cajas de cultivo de 35 mm con medio DMEM F12. Solo la caja con los embriones a aislar mantenerla fuera de incubadora a 37°C.
3. Realizar aislamiento de embriones en medio DMEM F12 dejando íntegro el saco vitelino y el cono ectoplacentario (CEP), retirar la membrana de Reichert. Los embriones aislados deben mantenerse en medio de cultivo de embriones (50/50 o libre de suero) a 37°C.
4. Colocar los embriones en las botellas con medio de cultivo (50/50 o libre de suero), gaseadas previamente por al menos una hora con la mezcla 20%O₂ 5%CO₂ 75% N₂ y a 37°C dentro de la incubadora de embriones (BTC Engineering 001). Cubrir la entrada de luz en la incubadora.
5. Comenzar con tratamiento de SpautinI [10 µM] después de dos horas de haber colocado a los embriones en las botellas de cultivo.
6. A los tiempos deseados retirar los embriones del cultivo para obtener fotos y vídeos en el microscopio estereoscópico Nikon SMZ 800 con cámara Nikon coolpix 4300.

RESULTADOS

A) Existen células con mayor autofagia en la línea de fusión del tubo neural.

Para observar el proceso de fusión del tubo neural se obtuvieron embriones en las etapas E8.5 – E9.5. En la Figura 6 se muestran imágenes representativas de los pliegues y el tubo neural de embriones en etapa E8.5. Es posible observar en la parte más anterior del embrión (Figura 6A) los pliegues neurales, y las somitas flanqueando el tubo neural, así como puntos donde los pliegues se hallan afrontados y fusionados (Figura 6B).

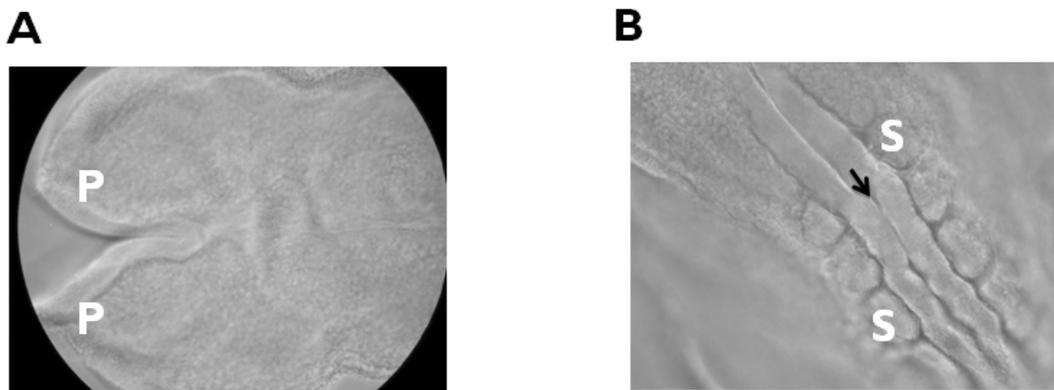


Figura 6. Fusión de los pliegues neurales y formación del tubo neural. Microscopía de campo claro de embriones de ratón en etapa E8.5. A, en la parte anterior del embrión se observan pliegues neurales (P); B, se observan las somitas (S) a los costados del tubo neural (indicado con flecha).

Para buscar células potencialmente autofágicas, embriones de E8.5-9.5 fueron teñidos con naranja de acridina (NA), pues este colorante detecta vesículas ácidas, como los autolisosomas. Cuando se observaron en el microscopio de epifluorescencia fue posible apreciar señal en el borde de los pliegues neurales como se muestra en la (Figura 7A-C), y en otras estructuras como el primordio del corazón (Figura 7A) y remanentes de tejido extraembrionario (Figura 7C). Esta señal también resultó constante en pliegues ya fusionados que dan lugar al tubo neural (Figura 7C). En embriones más desarrollados, esta señal se pierde en la parte media, pero se re-localiza hacia la parte más caudal (Figura 7D), donde continua la formación del tubo neural. Estos resultados indican que células que contienen un mayor número de vesículas ácidas, como lo son los autolisosomas, se hallan en la línea de fusión del tubo neural. Para corroborar la localización de las células con abundancia de vesículas ácidas, se observaron los embriones teñidos con NA en un microscopio de dos fotones que permite obtener imágenes de distintos planos sin dañar tanto la muestra como el microscopio de epifluorescencia. Se confirmó la presencia de focos de células teñidas con NA en los pliegues y en la fusión de estos (Figura 8A-C). Estos resultados indican que a lo largo de la línea de fusión del tubo neural efectivamente hay células que tienen abundancia de vesículas ácidas, que podrían tratarse de autolisosomas.

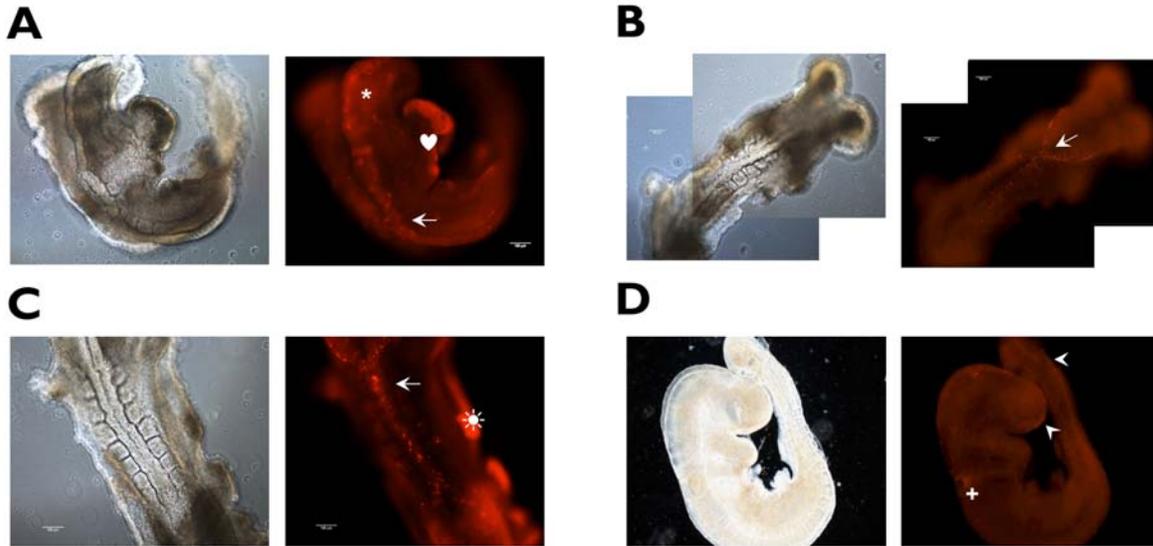


Figura 7. Se observaron por microscopía de epifluorescencia células con mayor número de vesículas acídicas, teñidas con naranja de acridina, en pliegues neurales y en la línea de fusión del tubo neural en embriones en etapa E8.5-9.5. Se muestran vesículas acídicas en los bordes de los pliegues neurales (A, asterisco) y en la línea de fusión del tubo neural (A-C, flecha). También es apreciable un señal intensa en el primordio del corazón (♥) y remanentes de tejido extraembrionario (*). Nótese que el patrón de la señal cambia conforme el embrión se va desarrollando. En el embrión de 28 somitas la señal se observa en la región más caudal y más rostral (D, cabeza de flecha) Además la periferia del pozo óptico (+) también presenta un incremento de señal. Barra de escala: 100 μ m.

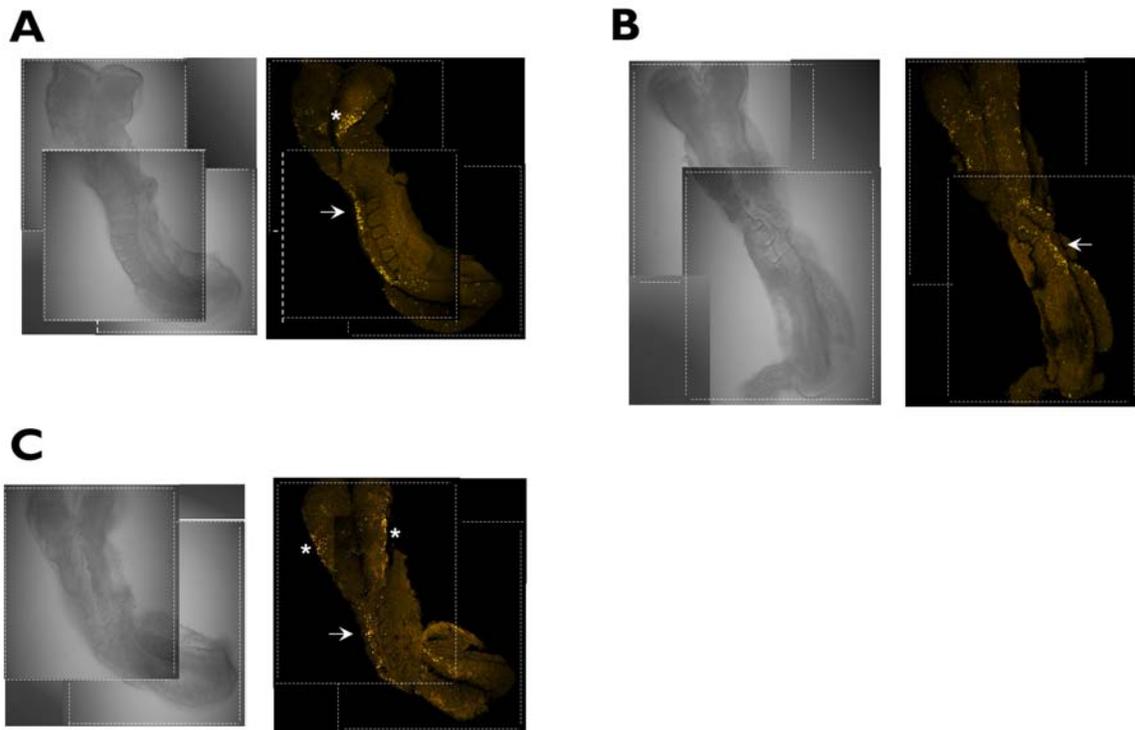


Figura 8 (página anterior). Se confirmó por microscopía de dos fotones la presencia de células con mayor número de vesículas acídicas, teñidas con naranja de acridina, en la línea de fusión del tubo neural en embriones de etapa E8.5. La señal emitida por el colorante puede observarse en la línea de fusión del tubo neural (**A-C**, flecha) y en los bordes de los pliegues (**A** y **C**, asterisco). Barra de escala: 100 μ m.

Cuando las células tienen mayor actividad autofágica aumenta el número de autolisosomas, los cuales se pueden detectar con LysoTracker. Si bien este colorante no distingue autolisosomas de lisosomas, permite corroborar la presencia de vesículas acídicas. Cuando se tiñeron embriones con LysoTracker, se observó nuevamente una clara señal a lo largo de la línea de fusión del tubo neural (Figura 9).

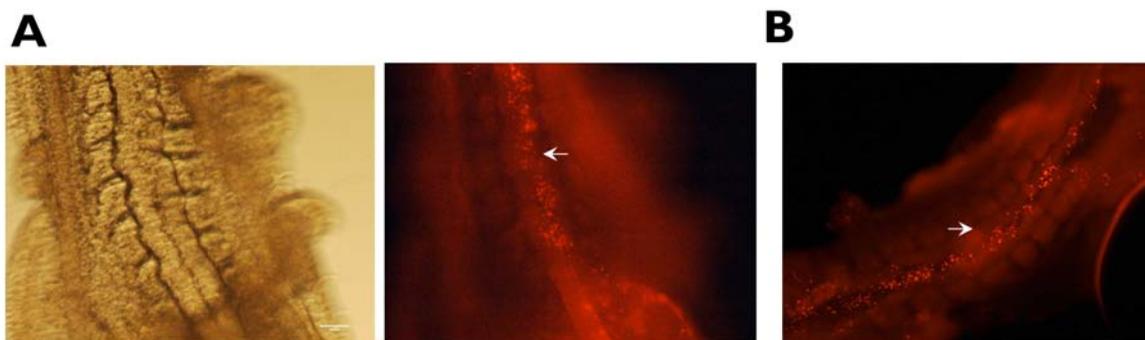


Figura 9. Se observaron células con mayor número de lisosomas o autolisosomas a lo largo de la línea de fusión del tubo neural. Microscopía de fluorescencia muestra que en embriones de ratón etapa E8.5 se encuentra células con mayor tinción con LysoTracker, colorante que se acumula en lisosomas y autolisosomas, lo largo del tubo neural (**A**, campo claro y fluorescencia; **B**, fluorescencia); pueden observarse a las somitas (S). Barra de escala: 100 μ m.

Hasta ahora los patrones de tinción que se observaron tanto con la naranja de acridina como con el LysoTracker sugieren que las abundantes vesículas acídicas observadas en la línea de fusión del tubo neural sean posiblemente autolisosomas. Para determinar que la acumulación de autolisosomas en la línea de fusión del tubo neural se debía al aumento de la autofagia en dichas células, se detectó la abundancia de autofagosomas utilizando el colorante Cyto-ID[®], que a diferencia de los anteriores, reconoce exclusivamente autofagosomas. El colorante Cyto-ID deja de fluorescer a pH ácido, por lo que no detecta vesículas acídicas como lisosomas o autolisosomas.

Como se esperaba, en la línea de fusión y en los pliegues neurales fue posible reconocer autofagosomas teñidos con el colorante Cyto-ID (Figura 10). Además una vista ventral permite apreciar señal positiva en el prosencéfalo (Figura 10E). Vale la pena resaltar que no se había reportado el uso de Cyto-ID en embriones ni órganos completos. Aquí se muestra que el Cyto-ID puede ser utilizado para detectar autofagosomas en embriones completos de esta etapa.

El resultado se corroboró observando embriones teñidos de la misma manera en microscopio de dos fotones. El resultado fue reproducible, presencia de autofagosomas en la línea de fusión y en los pliegues neurales (Figura 11). Similar a lo observado con la tinción de naranja de acridina, en embriones con desarrollo más avanzado la señal se pierde en la parte media, donde la fusión del tubo neural ya se ha llevado a cabo, y se relocaliza en la región romboencefálica/cervical de un embrión en etapa E9.5 (Figura 11 D).

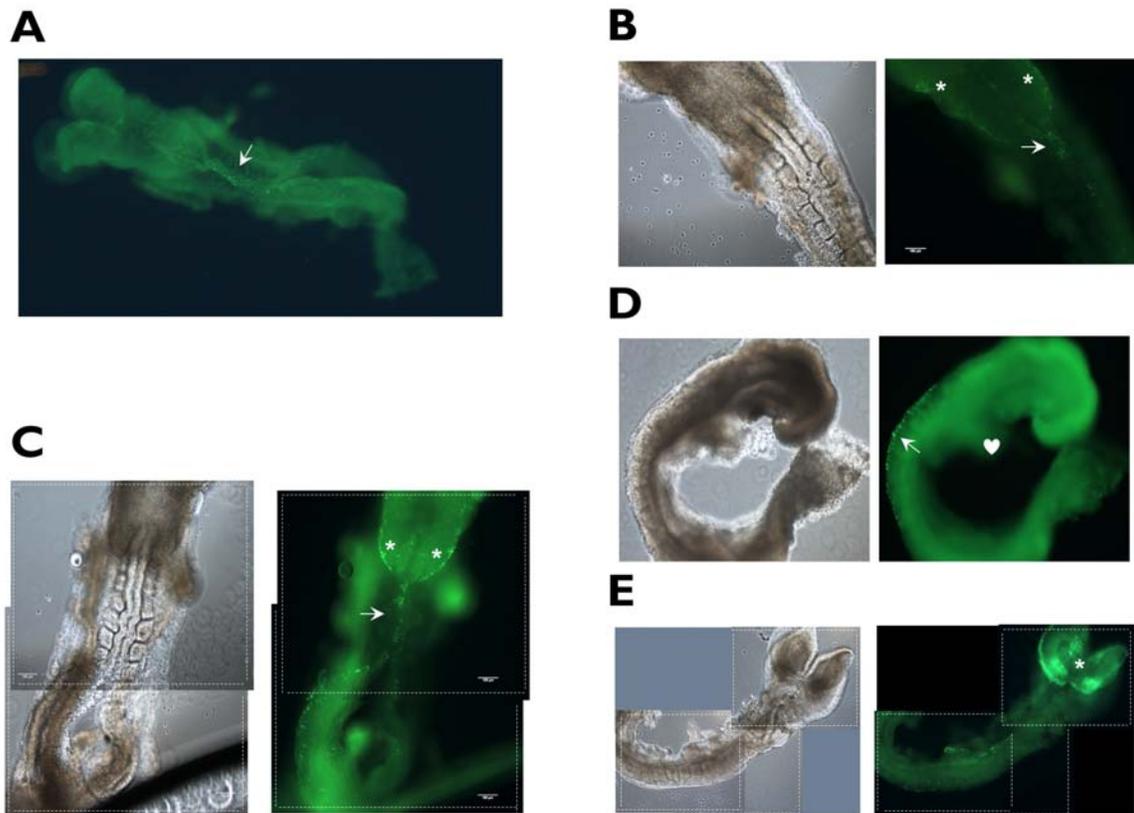


Figura 10. Se observaron células con mayor número de autofagosomas en la línea de fusión del tubo neural por microscopia de fluorescencia de embriones etapa E8.5 teñidos con Cyto-ID. Se observa señal a lo largo de la línea de fusión del tubo neural (A-D, flecha) y en los pliegues neurales (B y C, asterisco). En una vista ventral (E) se observa señal con mayor intensidad en el prosencéfalo (asterisco). Barra de escala: 100μm. ♥ = primordio del corazón.

La presencia de autofagosomas a lo largo de la línea de fusión del tubo neural se confirmó al analizar la distribución de GFP-LC3 en embriones transgénicos (Mizushima 2004). En la figura 12 se presenta la foto de un embrión heterocigoto ($Tg^{+/-}$) en etapa E9.0. Si bien la señal era tenue, se puede observar que la proteína GFP-LC3 se encuentra ampliamente distribuida por todo el embrión (Figura 12B). El embrión quedó colocado de tal manera que no se podía observar directamente el tubo neural, pero aprovechando las ventajas de la microscopía confocal se obtuvieron 246 secciones, a 1μ una de otra y a continuación se hizo una reconstrucción 3D. Además, se aplicó un LUT que es un

pseudocolor que nos facilita apreciar cambios en la intensidad de la señal (Figura 12C). Esto permitió observar una señal persistente de GFP-LC3 en el tubo neural, un foco de mayor intensidad en la región romboencéfalica donde apenas pareciera estar cerrándose el tubo neural, y una señal que se bifurca en dirección rostral delineando los pliegues neurales. También hay una intensa señal en el primordio del corazón.

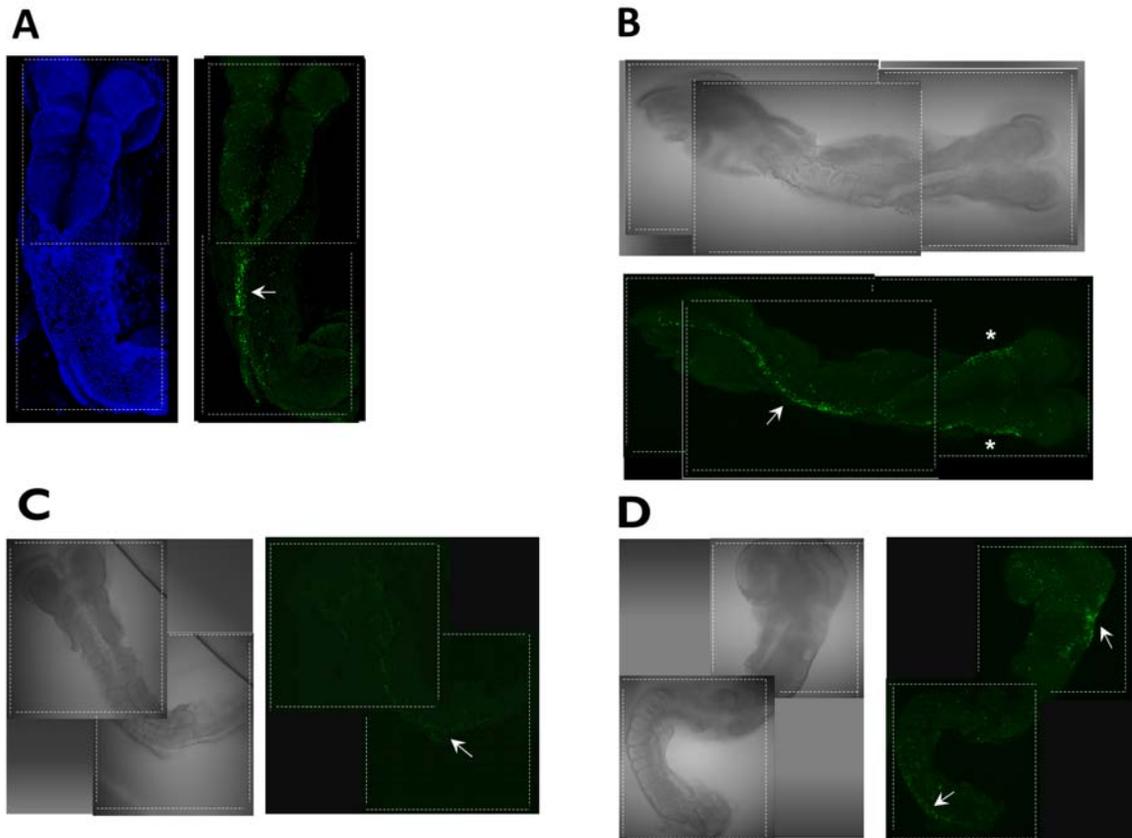


Figura 11. Se corroboró la presencia de autofagosomas, teñidos con Cyto-ID, en la línea de fusión del tubo neural por microscopia de dos fotones en embriones de etapa E8.5-9.5. Se observa señal a lo largo de la línea de fusión del tubo neural (A-D, flecha) y en el borde los pliegues (B, asterisco). En (A) se muestra la tinción de núcleos con el colorante Hoechst. En estados más avanzados del desarrollo (D) se observa señal con mayor intensidad en la región romboencéfalica/cervical y en la región caudal.

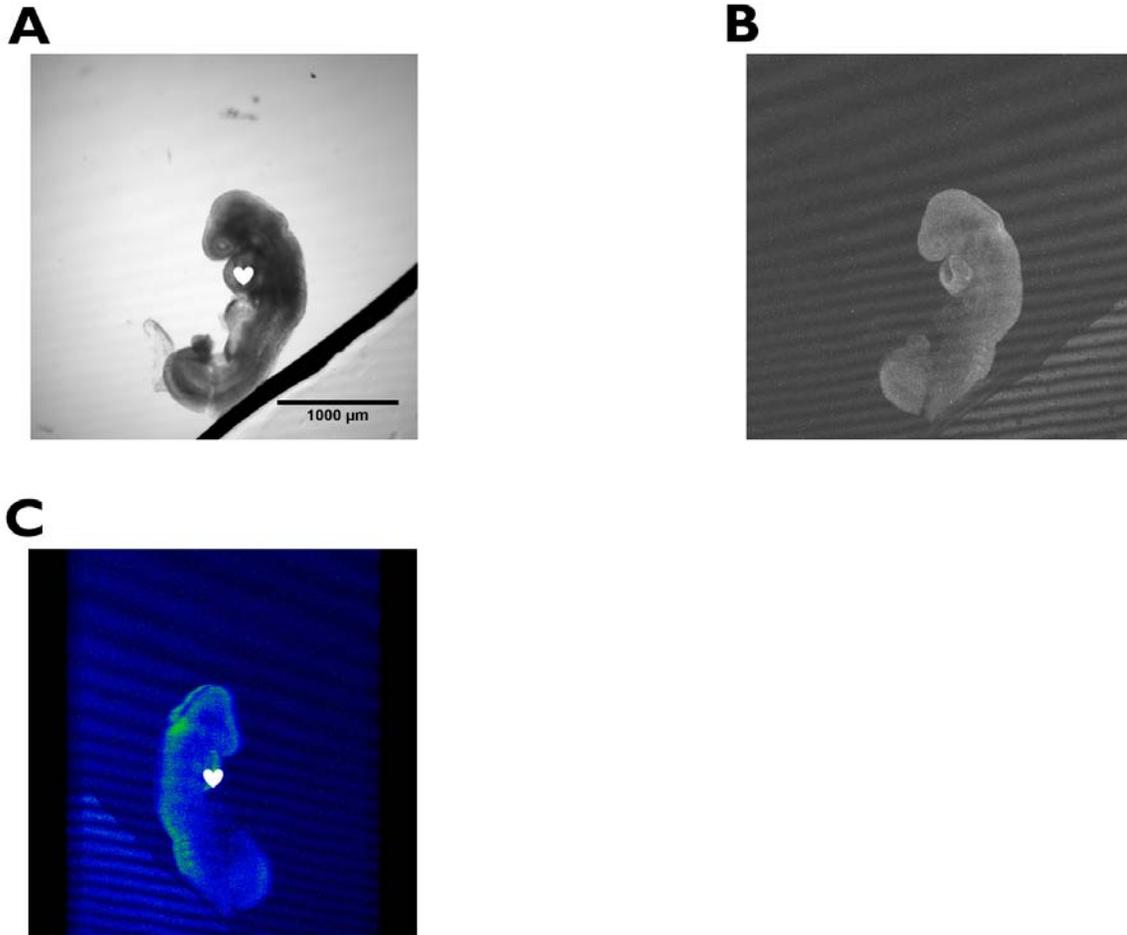


Figura 12. Se observan células con mayor autofagia, detectada por la abundancia de **GFP-LC3**, en la región romboencefálica donde apenas pareciera estar cerrándose el tubo neural, y una señal que se bifurca en dirección rostral delineando los pliegues neurales. Embrión GFP-LC3 Tg/+ C57BL/6 en etapa E 9.0 observado por microscopía de luz transmitida (**A**), microscopía confocal canal verde (**B**) y vista dorsal de la proyección 3D (**C**). Adicional a la proyección se aplicó un LUT (Look Up Table), que es un pseudocolor que permite *marcar diferencias* en la intensidad de la señal. La señal más intensa se observa en la región romboencefálica del embrión, en los pliegues neurales que continúan a esta región en dirección rostral, en el primordio del corazón (♥) y en somitas situadas en la porción caudal. La barra de escala representa 1000 µm.

Para determinar si la presencia de células con mayor actividad autofágica correlaciona con un aumento en la expresión de *Becn1*, que actúa en las primeras etapas de la vía autofágica, se detectó por inmunofluorescencia la distribución de **BECNI** en el neuroepitelio. Para estandarizar la técnica, se efectuaron inmunofluorescencias contra una proteína constitutiva y abundante en las células como α -tubulina (Figura 13A-C) y otra que se hallase en el neuroepitelio como N-cadherina (Figura 13D-F). El control negativo corresponde al fondo de señal obtenido en ausencia de anticuerpo primario. Habiendo logrado obtener inmunofluorescencias libres de autofluorescencia, se determinó el patrón de distribución de **BECNI**. Como se observa en la Figura 14, se detecta una señal

abundante en el futuro cerebro, en la parte rostral del embrión, pero en la porción más ventral del mesencéfalo hay una línea muy brillante (Figura 14C).

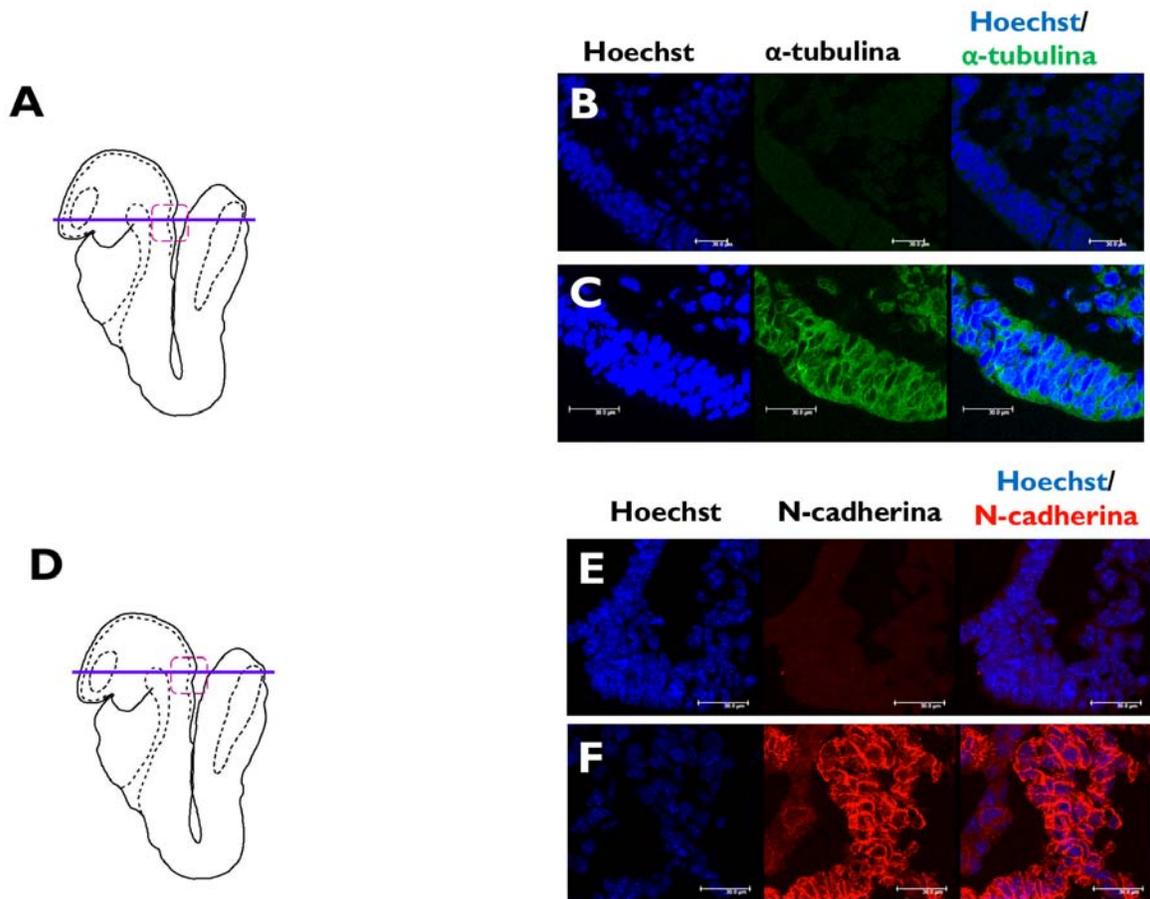


Figura 13. Inmunodetección de α -tubulina y N-cadherina, marcador de neuroepitelio, en secciones de embrión para estandarizar las condiciones libres de autofluorescencia. Microscopía confocal de secciones de embrión etapa E8.5. **A**, esquema representativo de sección a la que corresponde el corte en el embrión que se muestra en B y C. **B**, control negativo en ausencia de anticuerpo primario. **C**, inmunolocalización de α -tubulina. **D**, esquema representativo de sección a la que corresponde el corte en el embrión que se muestra en E y F. **E**, control negativo. **F**, Inmunolocalización de N-cadherina. Se muestra localización de los núcleos teñidos con Hoechst. Barra de escala 30 μ m.

En conjunto, los resultados hasta aquí presentados indican que existen células con mayor actividad autofágica en los pliegues y a lo largo de la línea de fusión del tubo neural en embriones de E8.5. Considerando que el ratón carente de la proteína AMBRA1, inductora de autofagia, tiene defectos en el cerrado del tubo neural (Fimia 2007), proponemos que esta autofagia tiene una función en la morfogénesis del tubo neural.

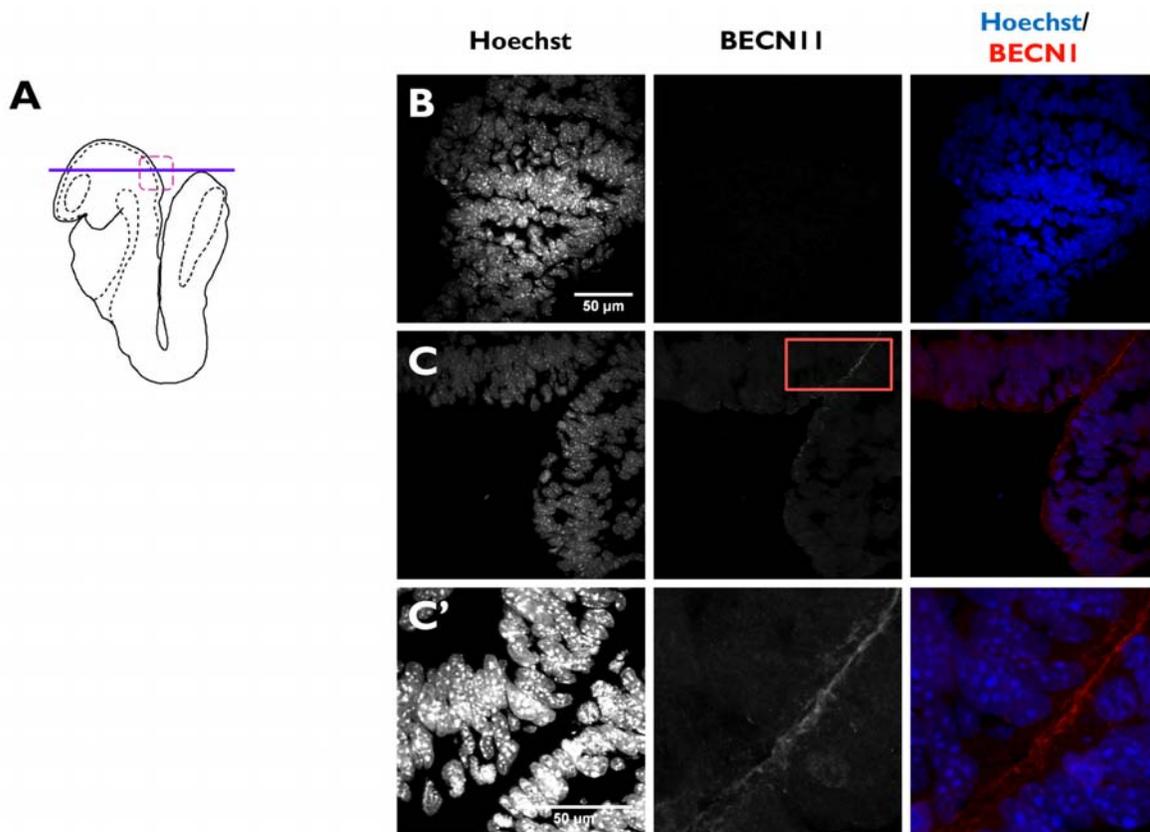


Figura 14. La proteína pro-autofágica BECN1 se observa en el futuro cerebro y la porción más ventral del mesencéfalo. A, esquema representativo de la sección a la que corresponde el corte en el embrión. Se muestra microscopía confocal de **B**, control negativo sin anticuerpo primario; **C**, inmunofluorescencia con anticuerpo primario contra BECN1. **C'**, ampliación de la zona indicada con el recuadro rojo en C. Barra de escala: 50 μm

B) No se detectó la presencia de células senescentes en la línea de fusión del tubo neural de embriones de E8.5.

Comprobada la presencia de células con mayor actividad autofágica en la línea de fusión de tubo neural, y considerando que: a) ratones mutantes carentes de la proteína p21 que no tienen células senescentes durante el desarrollo, tienen defectos en el desarrollo del tubo neural (Patterson 2006; Hosako 2009); b) la autofagia contribuye al establecimiento del fenotipo secretor senescente (Narita 2011); y c) se observan células senescentes en la línea de fusión del tubo neural en la etapa E11.5 (Storer 2013), se planteó que la autofagia que se observa en la línea de fusión del tubo neuronal a los E8.5 podría favorecer el establecimiento de células con senescencia programada, que secretarían proteínas remodeladoras de la matriz extracelular contribuyendo al cierre del tubo neural.

Para probar esta hipótesis se procedió a buscar células senescentes para averiguar si existe una relación autofagia-senescencia en el cierre del tubo neural. La senescencia programada se ha descrito en la cresta ectodérmica apical, en la placa del techo del tubo neural, mesonefros y el saco endolinfático del oído medio en las etapas E10.5-E16.5 (Muñoz-Espín 2013; Storer 2013) pero no en la línea de fusión del tubo neural de E8.5. Para determinar si en esta etapa también hay células con fenotipo senescente, y si su distribución sobrelapa con las células con mayor autofagia, se evaluó en el embrión completo la actividad de la enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal), el marcador de senescencia más ampliamente utilizado (Muñoz-Espín 2014). Ésta actividad se basa en el incremento del contenido lisosomal en células senescentes, lo que permite la detección de la enzima lisosomal β -galactosidasa a un pH subóptimo (pH6.0) (Muñoz-Espín 2014). Para el ensayo se agrega el sustrato X-gal, que es hidrolizado por la enzima, uno de los productos resultantes se oxida produciendo un compuesto azul insoluble.

Los resultados mostraron que en embriones en etapa E8.5 no hay presencia de células senescentes en el tejido propio del embrión (Figura 15). Sin embargo, el saco vitelino en embriones de la misma etapa muestra una tinción positiva (Figura 15C). Se analizaron también embriones en etapa E12.5 como controles positivos; se puede observar tinción en distintas estructuras como el primordio del ojo y el tubo neural (Figura 15A).

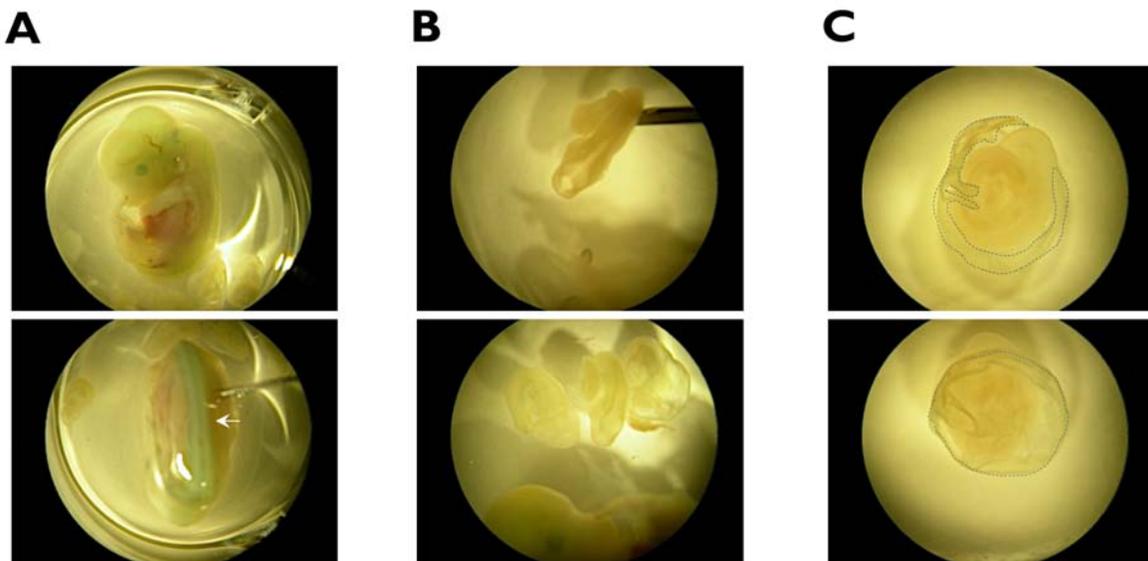


Figura 15. No se observaron células senescentes, evaluando la actividad de SA- β gal, en embriones de E8.5, pero sí en el saco vitelino. Microscopía estereoscópica de embriones completos. Como control positivo de la tinción se tiñeron embriones en etapa E12.5 (A); se observan células senescentes en distintas estructuras acorde a lo descrito (Storer 2013). Sin embargo, en los embriones en etapa E8.5 no se detectaron células positivas a SA- β gal (B). En el saco vitelino de embriones de E8.5

(delimitado por una delgada línea azul punteada) sí se observaron células senescentes, también acorde a lo descrito (Huang 2014) .

La ausencia de actividad SA- β gal en los embriones en etapa E8.5 indica que en el cierre del tubo neural la senescencia celular programada no tiene un papel fisiológico. Dado que la autofagia en ocasiones contribuye a la secreción no convencional (Deretic 2012), podría estar mediando la secreción de moléculas necesarias para el correcto cierre del tubo neural de manera independiente a la senescencia. De entre las moléculas potencialmente secretadas, es interesante considerar a las metaloproteinasas de la matriz extracelular, ya que tienen un papel fundamental en la migración, proliferación y apoptosis (Vu 2000; Van Hove 2012), que son eventos que ocurren durante el cerrado del tubo neural.

C) Las metaloproteinasas MMP-2,-3 y -9 tienen un patrón de expresión específico y diferencial a lo largo de la línea de fusión del tubo neural.

Si bien proponemos que las MPP contribuyen a la morfogénesis del tubo neural al considerar su función, no hay reportes que describan su patrón de expresión durante este proceso. Por lo tanto, antes de investigar el posible papel de la autofagia en la secreción no convencional de metaloproteinasas de la matriz, es necesario saber si se expresan durante la formación del tubo neural. Se realizaron inmunofluorescencias en secciones de embrión en búsqueda de las metaloproteinasas MMP-3, MMP-2 y MMP-9, y se halló que cada una tiene un patrón de expresión específico.

La metaloproteinasa de la matriz (MMP)-3 se encontró en secciones de embrión donde el tubo ya se encuentra cerrado; hay presencia de dicha proteína en el lumen del tubo neural, en el ectodermo y en el endodermo que se haya por debajo del tubo neural (Figura 16C). En otro corte donde apenas los extremos de los pliegues neurales están aproximándose para fusionarse, se observa a la MMP-3 en las *puntas* de los pliegues y en el espacio medial en el que ambos pliegues convergen (Figura 16E).

También se analizaron a los miembros de la familia de las gelatinasas, la MMP-2 y la MMP-9. Como se observa en la Figura 17, en secciones donde el tubo neural aún no se ha formado, MMP-2, se halla polarizada, expresándose exclusivamente en la región apical de las células de los pliegues neurales. Es decir, en la superficie del embrión que dará al lumen del tubo neural (Figura 17C). En la parte más ventral del tubo neural, donde los pliegues ya se han afrontado también es posible ver señal en la línea media (Figura 17D).

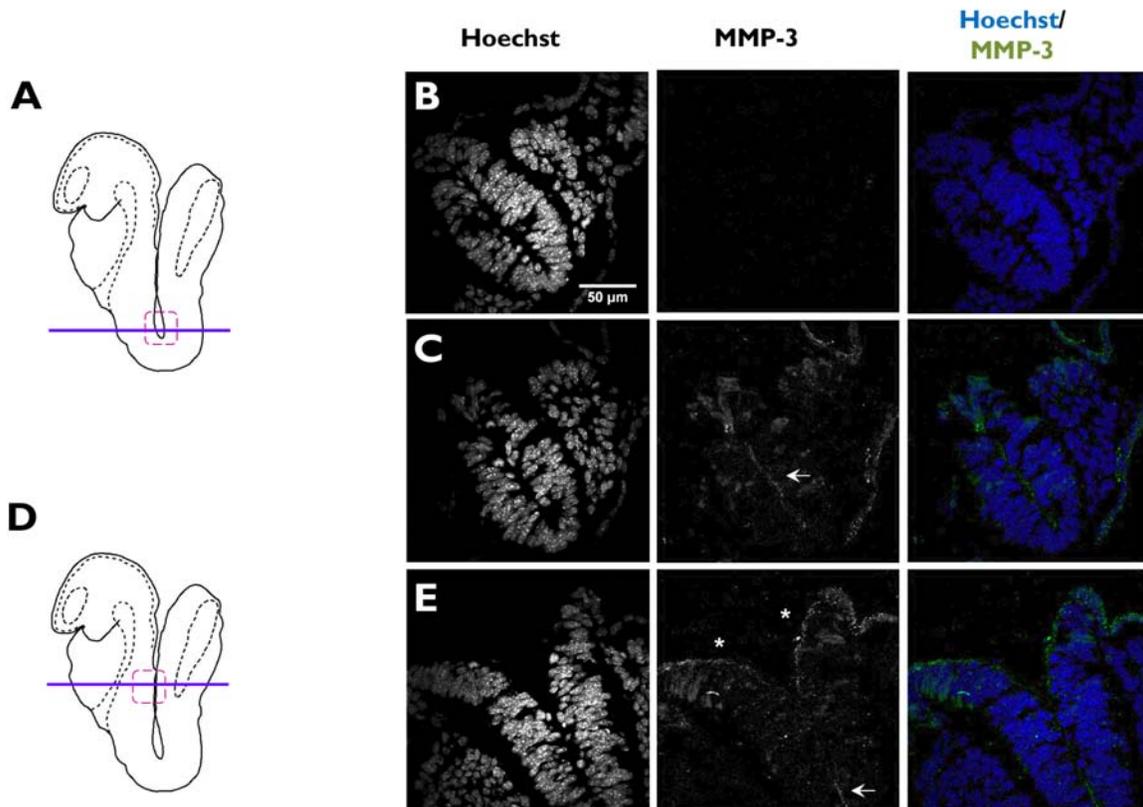


Figura 16. La metaloproteinasa de la matriz (MMP)-3 se expresa en el lumen del tubo neural y en las puntas de los pliegues neurales de embrión de ratón E8.5, principalmente en el lado exterior del embrión. **A**, Se muestra un esquema representativo de la sección a la que corresponde el corte que se muestra en B-C. Inmunofluorescencia observada por microscopía confocal en secciones de embrión. **B**, control negativo sin anticuerpo primario. **C**, inmunodetección de MMP-3 en el lumen del tubo neural (flecha). **D**, se muestra un esquema representativo de la sección a la que corresponde el corte en E. **E**, inmunodetección de MMP-3 en las puntas de los pliegues neurales (*). Barra de escala: 50 µm.

En cambio, MMP-9 (Figura 18) se encuentra en regiones donde apenas puede distinguirse el neuroepitelio; de manera muy interesante se encuentra rodeando completamente algunas células en lugar de estar polarizada como MPP-2 o MPP-3 (Figura 18C). En aquellas regiones donde los pliegues (Figura 18C) y el surco neural (Figura 18E) ya se han formado también se encuentran células que expresan MMP-9 alrededor. Sin embargo, también destaca su abundancia en la cara exterior de todas las células que se encuentran en los pliegues neurales que darán al lumen del tubo neural (Figura 18E). Cuando el tubo neural ya está formado, se mantiene la expresión aparentemente residual de MPP-9 en el lumen del tubo neural, en el endodermo y ectodermo que se hallan por debajo y por arriba del tubo neural, respectivamente (Figura 18G).

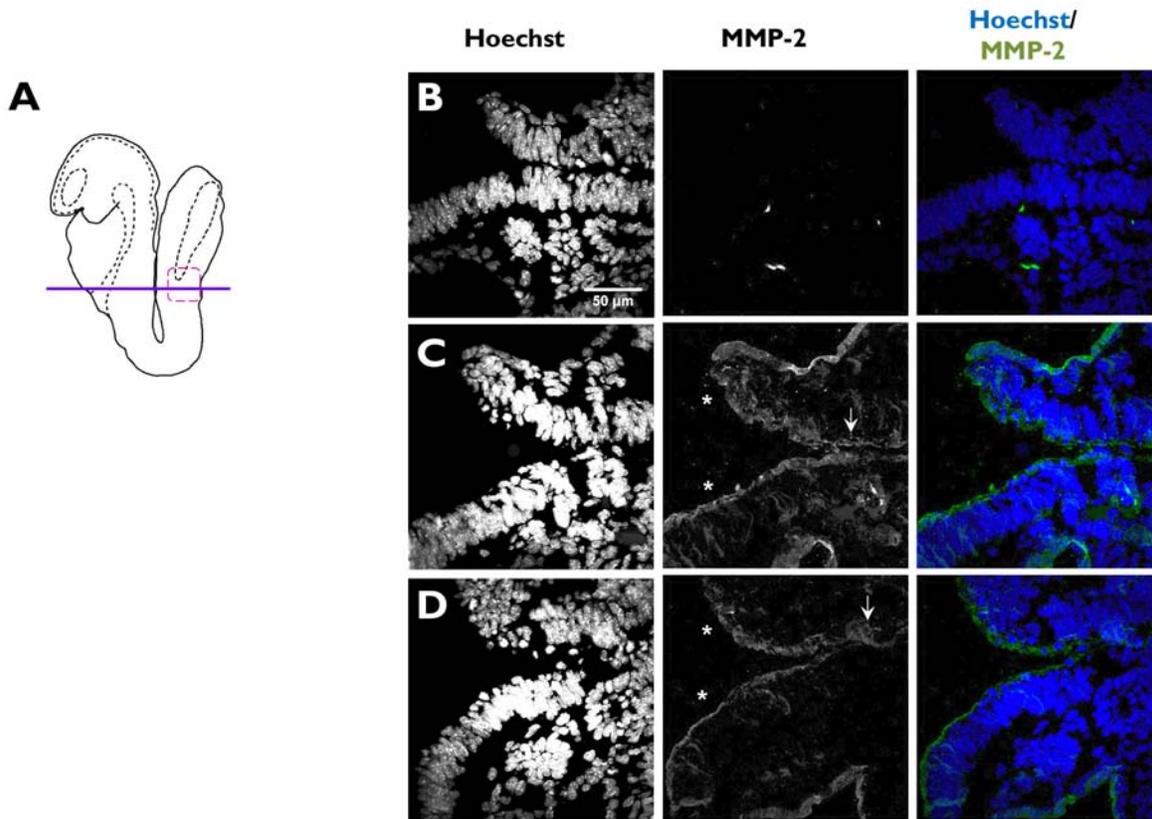


Figura 17. La metaloproteinasa de la matriz (MMP)-2 se expresa en la región apical de las células de los pliegues neurales de embrión de ratón E8.5. A, se muestra un esquema representativo de la sección a la que corresponde el corte. Microscopía confocal en secciones de embrión. B, control sin anticuerpo primario. C y D, inmunodetección de MMP-2 en la porción apical de los pliegues neurales (*) y en el lumen del tubo neural (flecha). Barra de escala: 50 µm.

En resumen, las metaloproteinasas MMP-3, MMP-2 y MMP-9 se aprecian durante la morfogénesis del tubo neural, por lo que podrían contribuir a este proceso. Las tres MMPs se observan en la región apical de las células de los pliegues neurales y en el lumen del tubo neural. Pero se pueden notar diferencias en cuanto a su localización; la MMP-3 también se observa en los límites del neuroectodermo y el ectodermo superficial; y la MMP-9 se observa ampliamente distribuida en el tejido embrionario.

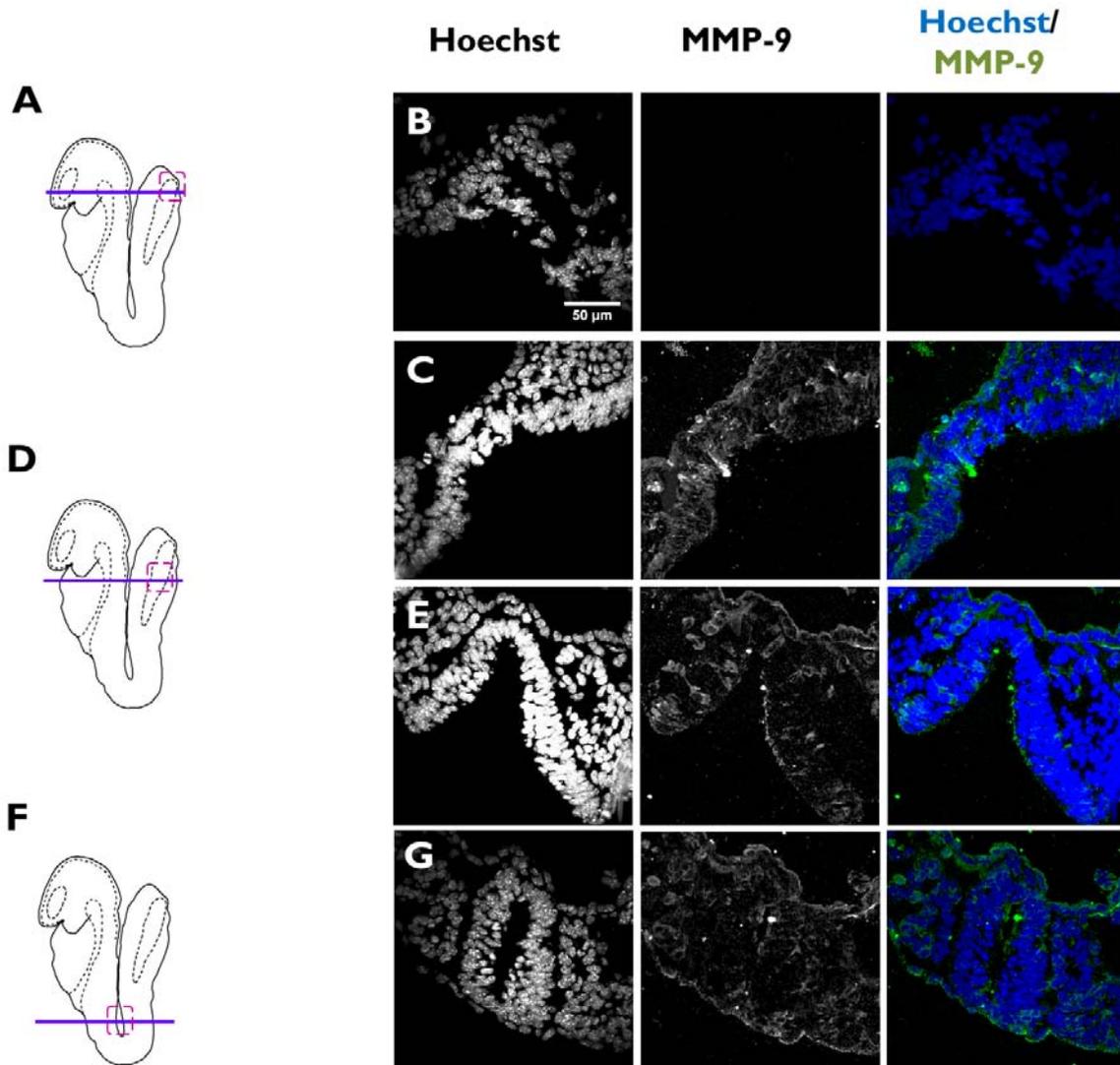


Figura 18. La metaloproteínasa de la matriz (MMP)-9 se expresa en la capa exterior de los pliegues neurales de embrión de ratón E8.5. A, D y F muestran un esquema representativo de la sección a la que corresponden los cortes que se muestran en C, E y G, respectivamente. B, control sin anticuerpo primario. C, E y G, inmunodetección de MMP-9. Microscopía confocal. Barra de escala: 50 µm.

D) El desarrollo extra-uterino de embriones de E8.5 permite observar el cerrado el tubo neural.

Para estudiar si la autofagia podría estar mediando la secreción de metaloproteínas para la formación del tubo neural, es necesario poder manipularla durante el desarrollo embrionario. Con ese fin, en este proyecto se planteó como objetivo establecer las condiciones del cultivo de embriones que permitieran observar el desarrollo del tubo neural extra-uterino. De esta manera se puede manipular la autofagia, evitando tanto que

el metabolismo materno modifique los resultados (Gray 2011) como evitando sufrimiento a la madre.

Para el cultivo de embriones se siguió el protocolo reportado por Gray y colaboradores (Gray 2011) y se probó un medio de cultivo libre de suero reportado para embriones en etapa E10.5 (Kalaskar 2014). Brevemente, los embriones en etapa E8.5 deben extraerse con saco vitelino y cono ectoplacentario íntegros, mantenerse en frascos de cultivo con medio a 37°C (50/ 50 o libre de suero) gaseados con 20% O₂ 5% CO₂ 75% N₂ y en rotación.

Al momento de realizar la extracción se apartaron embriones para que sirvieran como referente para evaluar el desarrollo conseguido con el cultivo de embriones extra-uterino (Figura 19A-B). Después de 16 horas de cultivo los embriones incubados con medio 50/50 mostraron un desarrollo variable que dependió del buen estado del saco vitelino (Figura 19C-D). Embriones cultivados con un saco vitelino deteriorado continúan su desarrollo (Figura 19C) con respecto a los embriones recién extraídos. Pero, embriones cultivados con su saco vitelino íntegro se desarrollan mejor (Figura 19D). Aunque en ambos casos es notable el cambio de la posición axial (la parte caudal del embrión se sitúa frente al rostro), los cambios morfológicos (presencia de vesícula óptica, pozo óptico y arcos branquiales en Figura 19 D) evidencian que la calidad del saco vitelino influye en gran medida el desarrollo embrionario.

Los embriones cultivados con medio libre de suero también sobrevivieron, pero su desarrollo no fue tan notable (Figura 19E-F). Hubo un aumento de tamaño y también cambio de la morfología, pero no fue el esperado. Comparando ambas condiciones de cultivo (Figura 19G) los mejores resultados se obtuvieron con el medio 50/50.

Se logró establecer el protocolo para cultivar a los embriones el tiempo suficiente para observar la fusión del tubo neural.

E) El empleo de Spautin I, inhibidor de autofagia, altera el desarrollo extra-uterino, incluidas malformaciones del tubo neural.

Una vez que se optimizaron las condiciones de cultivo, se cultivaron embriones en etapa E8.5 en presencia o ausencia del inhibidor de autofagia Spautin I (Figura 20). Se realizó la extracción de los embriones y se mantuvieron en condiciones de cultivo dos horas antes de comenzar con el tratamiento de Spautin I, de acuerdo a lo descrito (Gray 2011). Se establecieron dos intervalos de tratamiento: Tiempo 1, equivalente a 8 horas de cultivo de las cuales 6 horas fueron de tratamiento de Spautin I; y Tiempo 2 equivalente a 20 horas de cultivo de las cuales 18 horas fueron de tratamiento con

Spautin I (Figura 20A). Se evaluó que recién salidos de la incubadora en los embriones el primordio del corazón siguiera latiendo, se tomaron vídeo y fotos.

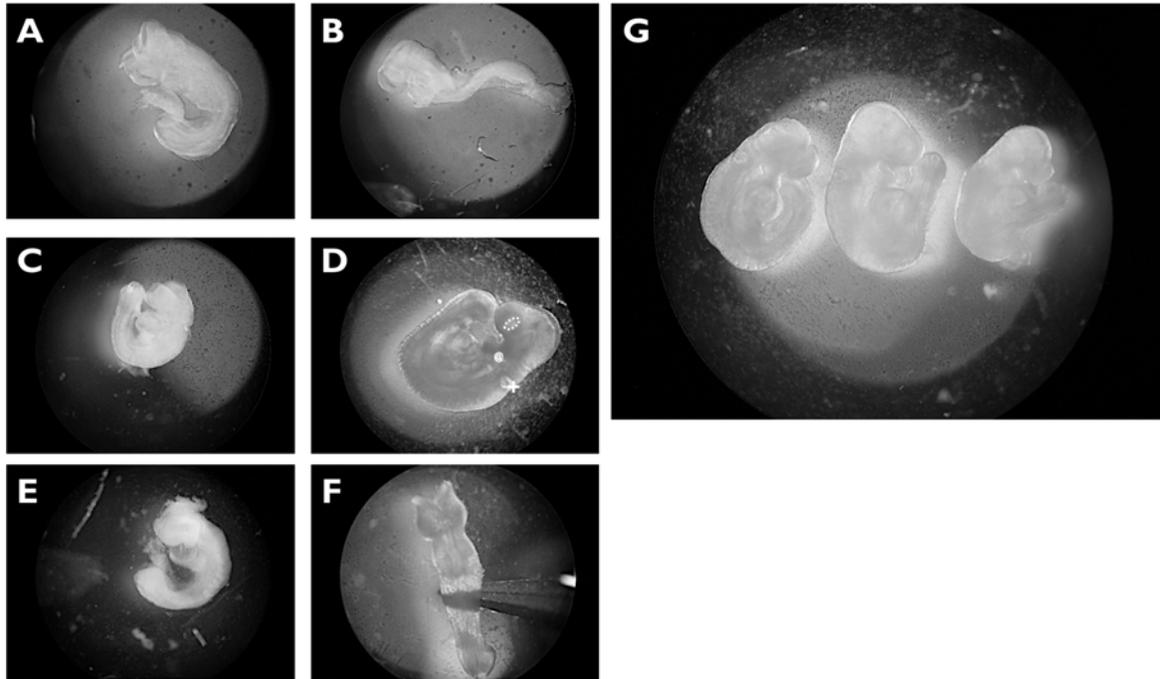


Figura 19. Estandarización de cultivo de embriones de ratón E8.5. Microscopía estereoscópica de embriones al inicio y después de 16 hr de cultivo. **A, B**, al momento que comenzó el cultivo. **C, D**, embriones cultivados con medio 50/50. **E, F**, embriones cultivados con medio libre de suero. **G**, comparación de embriones en distintas condiciones de cultivo, de izquierda a derecha: embrión cultivado en medio 50/50, embrión cultivado en medio 50/50 y embrión cultivado en medio libre de suero.

A las 8 horas de cultivo el embrión control mostró cierre en la parte más rostral (prosencefalo; Cierre 3) pero permaneció abierto el neuroporo anterior que se extiende desde el mesencefalo hasta el romboencefalo. En su parte más posterior, el neuroporo posterior no se aprecia (Figura 20B). En el embrión tratado durante 6h con Spautin-I el cierre más rostral (Cierre 3) apenas ha comenzado y por lo tanto el neuroporo anterior abarca del prosencefalo hasta el romboencefalo. También se aprecia el neuroporo posterior (Figura 20C).

A las 20 horas de cultivo se aprecia que el embrión control ha aumentado de tamaño considerablemente, ha llevado a cabo el giro axial, se observan los arcos faríngeos, la vesícula óptica y el pozo óptico, y un corazón más desarrollado. El neuroporo anterior se restringe a los límites del mesencefalo/romboencefalo (Figura 20D-D'). En cambio, el embrión tratado con SpautinI durante 18 horas aunque parece haber aumentado de tamaño no ha llevado a cabo el giro axial, y el neuroporo anterior y posterior aún

persisten, el primer arco faríngeo es visible, al igual que la vesícula óptica y el pozo ótico (Figura 20). En la vista dorsal del embrión puede apreciarse la parte medial del tubo neural que tiene una apariencia rugosa (Figura 20E). En el mismo día que el cultivo de embriones término se aislaron embriones de una ratona con el mismo tiempo de gestación (Figura 20F). El embrión desarrollado *in utero* muestra un desarrollo superior que los desarrollados en incubadora.

En resumen, el uso del inhibidor de autofagia SpautinI altera el desarrollo embrionario notablemente, retrasando el cierre del tubo neural y evitando el giro axial del embrión.

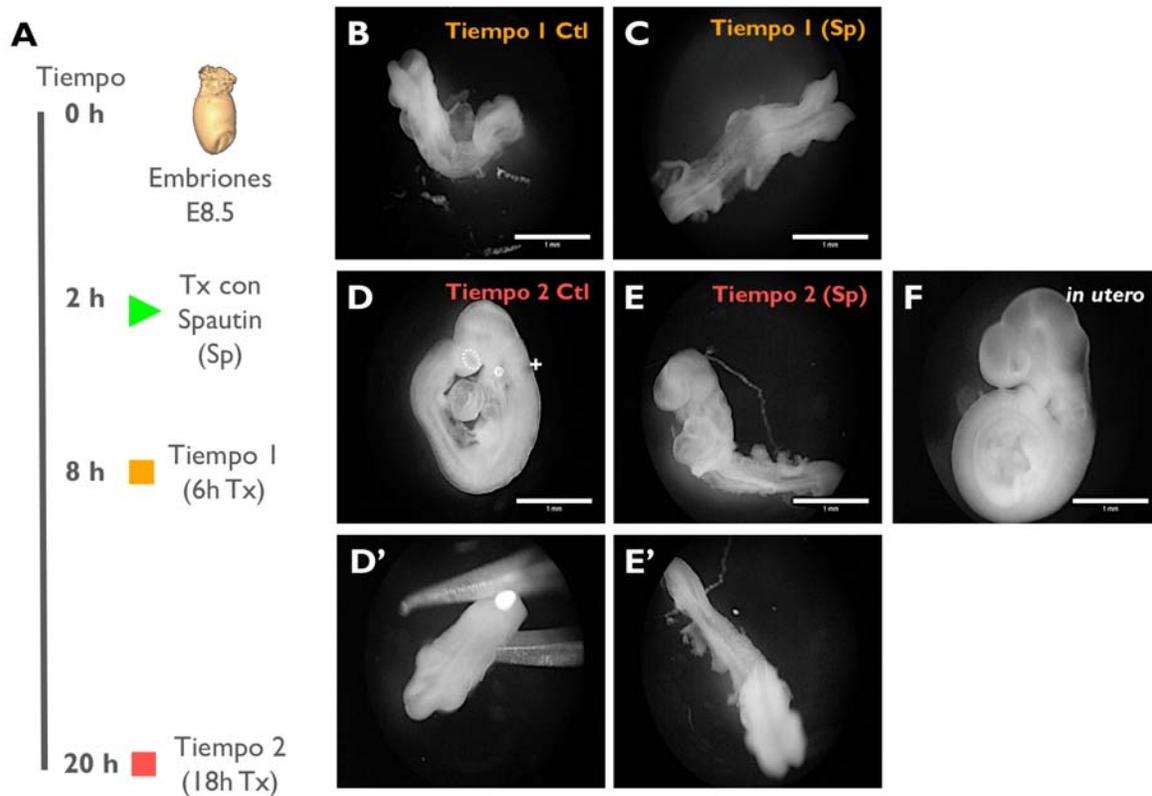


Figura 20. Alteración en el desarrollo de embriones en etapa E8.5 cultivados con SpautinI, inhibidor de autofagia. **A**, Diseño experimental. **B-F** Microscopía estereoscópica. **B**, embriones control cultivados 8 hr. **C**, embriones tratados con SpautinI por 6 hr, adicionado dos horas después de la extracción (8 hr de incubación total). **D**, embrión control cultivado 20 hr, vista lateral; **D'**, vista dorsal. **E**, embrión tratado con SpautinI por 18 hr, adicionado dos horas después de la extracción (20 hr de incubación total), vista lateral; **E'**, vista dorsal. **F**, embrión desarrollado *in utero*. Barra de escala: 1mm.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que la autofagia contribuye de manera crucial en distintas etapas del desarrollo en mamíferos (Cecconi 2008, Di Bartolomeo 2010). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si la autofagia participa en el cierre del tubo neural durante el desarrollo embrionario del ratón.

En el presente trabajo con los colorantes naranja de acridina y LysoTracker se identificaron células con mayor número de vesículas ácidas, lisosomas y probablemente autolisosomas, en la línea de fusión del tubo neural de embriones de ratón en etapa embrionaria (E) 8.5.

Hasta el momento no hay trabajos en los que se empleen naranja de acridina o LysoTracker en embriones de ratón para estudiar el cierre del tubo neural. Sin embargo, en distintos trabajos se puede observar que los embriones *control* muestran patrones de tinción similares a los obtenidos en este trabajo. Por ejemplo, la vista lateral de un embrión en etapa E9.5 teñido con naranja de acridina muestra señal positiva en el romboencéfalo y prosencéfalo (Chen I. 1995). Embriones *control* en etapas E8.5-E11.5 teñidos LysoTracker muestran señal positiva en el prosencéfalo, romboencéfalo (Stumpo 2004; Beck-Cormier 2014; Jang 2015) y en la región más caudal del embrión (Anderson 2016), que coinciden con la formación del tubo neural.

Además, en otros tejidos donde se requiere de un proceso de fusión para su formación, el esternón y paladar del embrión de ratón, se observa la presencia de vesículas ácidas con naranja de acridina (Salas-Vidal E. 1998).

Algunos autores emplean la naranja de acridina y el LysoTracker como indicadores de muerte celular, e incluso como marcadores únicos de apoptosis, a pesar de que ambos colorantes reconocen un gran número de vesículas ácidas que pueden estar relacionadas o no con la muerte celular. Se debe ser cuidadoso con la interpretación de los resultados obtenidos con estos compuestos y realizar ensayos complementarios para poder aseverar que se trata de un proceso celular determinado.

En adición a los colorantes antes mencionados, se empleó Cyto-ID® para identificar autofagosomas, el cual se acumula selectivamente en vacuolas autofágicas y cuya fluorescencia se pierde en medios ácidos. Embriones de ratón en etapa E8.5 mostraron células con un aumento de autofagosomas en la línea de fusión del tubo neural, y la observación del patrón de expresión en el embrión GFP-LC3 ($Tg/+$) corroboró este resultado. Además, en secciones de embrión se identificó la presencia de la proteína BECN1 en el neuroepitelio del mesencéfalo.

Hasta el momento la única proteína relacionada con la autofagia reportada en embriones de ratón etapa E8.5 ha sido AMBRA1 (Fimia 2007), que justo se expresa en el neuroepitelio. En etapas más avanzadas del desarrollo, mediante hibridación *in situ* con una sonda pan-LC3 se ha observado una expresión robusta del RNAm de LC3 en el sistema nervioso central, sobre todo en el prosencéfalo y mesencéfalo, en la etapa E11.5.

Para el día siguiente (E12.5) la expresión también se observa en el romboencéfalo, ganglios de la raíz dorsal, delineando los dígitos emergentes y en las vibrisas (Cann 2008). En este trabajo Cann y colaboradores también mostraron que ratones $LC3\beta^{-/-}$ son viables (Cann 2008). Lo mismo ocurre con ratones mutantes $Atg4b^{-/-}$ (Mariño 2010; Read 2011) $Atg4c^{-/-}$ (Mariño 2007) y $GABARAP^{-/-}$ (O'Sullivan 2005). En contra parte, ratones $FIP200^{-/-}$ (Gan 2006), $Pi3kc3^{-/-}$ (Zhou 2011) y $Becn1^{-/-}$ (Yue 2003) presentan letalidad embrionaria, al igual que $Ambra1^{gt/gt}$ (Fimia 2007). A su vez, en los modelos $Ulk1$, $Ulk2^{-/-}$ (Cheong 2014); $Atg3^{-/-}$ (Sou 2008); $Atg5^{-/-}$ (Kuma 2004); $Atg7^{-/-}$ (Komatsu 2005); $Atg9^{-/-}$ (Saitoh 2009) y $Atg16LI^{-/-}$ (Saitoh 2008) se observa letalidad en el primer día posnatal.

El hecho de que Cann y colaboradores demostraran que ratones $LC3\beta^{-/-}$ se desarrollan correctamente no implica que la autofagia no participe en el cierre del tubo neural o en otros procesos embrionarios. Tanto $LC3$ como $Atg4$ tienen múltiples parálogos (Antionoli 2015), de hecho $LC3$ y $GABARAP$ son parálogos, lo que implica que alguna de las proteínas relacionadas podría compensar la ausencia de la otra (Cann 2008).

El nacimiento representa para los neonatos enfrentarse a un ambiente completamente distinto al que estaban acostumbrados y *auto-alimentarse*, al menos hasta que sean capaces de amamantarse. Se sabe que en los neonatos durante las primeras horas y hasta el segundo día posnatal hay una inducción de autofagia en varios tejidos: corazón, músculos, piel, entre otros (Kuma 2004). En dos de los modelos con letalidad posnatal ($Atg5^{-/-}$ y $Atg7^{-/-}$) se ha demostrado que las crías son incapaces de amamantarse, sugiriendo defectos en el desarrollo del sistema nervioso central (Di Bartolomeo 2010).

Por lo tanto los datos obtenidos hasta ahora y los reportes en la literatura sugieren que es el proceso de la autofagia, y no funciones independientes de proteínas relacionadas con ella, el que participa durante el desarrollo neural.

La autofagia es un proceso multifuncional, que de acuerdo al contexto celular puede : reciclar, remodelar, promover muerte programada, transportar, secretar, defender y desintoxicar. (Clarke P. 1990; Shintani T. 2004; Deretic 2012; Ponpuak 2015). Para desempeñar éstos distintos roles, la autofagia se interconecta con otros procesos.

Conociendo la relación entre la autofagia y la senescencia, en este trabajo se propuso que la autofagia que observamos en la línea de fusión del tubo neuronal a los E8.5 podría favorecer el establecimiento de células en senescencia programada, que secretarían proteínas remodeladoras de la matriz extracelular y así contribuir al cerrado del tubo neural. Para probar esta hipótesis se procedió a identificar células senescentes en el embrión completo durante la formación del tubo neural, utilizando el ensayo de actividad de SA- β gal. Sin embargo los resultados obtenidos fueron negativos. En la línea media de fusión del tubo neural, donde se observaron células con mayor número de vesículas autofágicas y lisosomas, no se detectó un incremento en la actividad de la enzima β -galactosidasa. La senescencia celular se determina por un conjunto de marcadores que por sí solos no son suficientes para decretar senescencia. No obstante, el primer marcador y

el más ampliamente utilizado es el ensayo de SA- β gal y no se han descrito ejemplos de células con fenotipo senescente sin actividad de SA- β gal (Huang 2014).

Storer y colaboradores detectaron células senescentes en embriones de ratón etapa E11.5 en la placa del techo, considerado el equivalente dorsal de la notocorda (Thomaidou 2010), y en la cresta ectodérmica apical, centro señalizador implicado en el desarrollo de las extremidades (Storer 2013). Previo a la generación de la placa del techo, las señales que determinan la especificación dorsal provienen del ectodermo superficial que se forma desde el día E8.0 en ratones (Thomaidou 2010). De igual manera, un segundo centro señalizador, la zona de actividad polarizante establece el eje antero-posterior de las extremidades en desarrollo (Pownall 2010). En ambos casos, la presencia de células senescentes parece limitarse a centros organizadores con características muy específicas. Aquí se demuestra que el ectodermo superficial en etapas previas (E8.5) al establecimiento de la placa del techo como centro señalizador (E9.5) no contiene células senescentes, y tampoco se ha reportado para otros centros señalizadores como la zona de actividad polarizante o la notocorda.

Actividad SA- β gal también se ha reportado en el endodermo visceral del saco vitelino visceral de embriones de ratón en etapas E5.5 a E9.5, pero no se asocia con otro marcador de senescencia, como p21 (Huang 2014). Si bien es cierto que el ensayo refleja únicamente la actividad de la enzima lisosomal β -galactosidasa, casi siempre es considerado un marcador de senescencia celular. En el presente trabajo se corrobora que el saco vitelino visceral de embriones en etapa E8.5 muestra actividad β -gal positiva.

Huang y Rivera-Pérez observaron que la actividad SA- β gal en el endodermo visceral coincide con vacuolas apicales que exhiben características lisosomales (Huang 2014). Durante la neurulación y previo al establecimiento del flujo sanguíneo a través de la placenta (nutrición hemotrófica), los nutrientes disponibles para el embrión son absorbidos por mecanismo histotróficos que involucran la endocitosis y degradación lisosomal (Zohn 2010) en el endodermo visceral (Huang 2014).

Si bien la hipótesis de que la autofagia media la secreción de moléculas del SASP, específicamente metaloproteinasas de la matriz (MMP), en células senescentes en la línea de fusión del tubo neural resultó nula, aún en ausencia de células senescentes la autofagia podría mediar la secreción no convencional de MMPs para la formación del tubo neural. Hasta el momento no existen estudios en los que se describan a MMPs en la formación del tubo neural del ratón, por lo que fue necesario determinar si se expresan durante la formación del tubo neural. Las MMPs constituyen una familia muy grande de endoproteinasas, en este trabajo nos limitamos a explorar la presencia de MMP -3, -2 y -9, porque pueden formar parte del SASP (Storer 2013). Las MMP -3,-2 y -9 se observaron en los pliegues neurales y en el tubo neural ya fusionado, con distintos patrones de distribución.

En el desarrollo neural, la actividad de las MMPs ha sido descrita en la migración neural, mielinización, invasión/colapso axonal, plasticidad sináptica y neurogénesis (Small

2016), que si bien se relacionan con el desarrollo del sistema nervioso no son eventos tempranos. Entre los reportes que se relacionan con la formación del primordio del sistema nervioso central en embriones, se ha descrito que la sobreexpresión de MT3-MMP (Walsh 2007) o TIMP-3 (Pickard 2004) en embriones de *Xenopus laevis* provoca defectos en el cierre del tubo neural, sugiriendo que MMPs que pueden ser activadas por MT3-MMP, por ejemplo MMP-2, participan en el cierre del tubo neural. En embriones de pollo la MT2-MMP se localiza en el ectodermo epidermal y pliegues neurales en etapas HH8-11 (Patterson 2013). Además, las MMPs son necesarias en la migración de las células de la cresta neural, tanto en embriones de pollo (MMP-2 y -9) (Duong 2004; Monsonego-Ornan 2012) como en embriones de ratón (MMP-8) (Giambernardi 2001) y fallas en la migración de estas células también se han relacionado con DTN (Acoque 2008).

Estudios genéticos como mutaciones nulas permiten enfatizar los papeles de las MMPs en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). Por ejemplo, ratones deficientes de MT1-MMP presentan cráneos más pequeños y un SNC subdesarrollado; en ratones deficientes de MMP-9, los precursores de células granulares se acumulan, migran con retraso y presentan una reducción en la muerte celular programada (Agrawal 2008). Sin embargo, ninguno de los modelos deficientes en las MMPs aquí estudiadas (MMP -3, -2 y -9) provoca defectos del tubo neural o causa letalidad embrionaria, esto puede deberse a mecanismos compensatorios por miembros de la gran familia de las MMPs. Además para comprender más sobre el papel de las MMPs durante el desarrollo sería útil la inactivación de múltiples MMPs al mismo tiempo (Vu 2000).

El estudio de los sustratos podrían aportar información sobre la función que realizan las MMP aquí estudiadas en el cerrado del tubo neural. Durante la neurulación, la matriz extracelular se interpone entre la placa neural y el ectodermo superficial (en dirección dorsal), y entre el neuroepitelio y el mesodermo paraxial o notocorda (en dirección ventral). Conforme el neuroepitelio se flexiona y los pliegues neurales se aproximan, una membrana basal primitiva compuesta de *colágeno tipo IV* (sustrato de MMP -3, -2 y -9, entre otras), *fibronectina* (sustrato de MMP -3, -2 y -9, entre otras), *laminina* (sustrato de MMP-3 y otras) y *proteoglicanos* se extiende en la interfase de la placa neural-ectodermo superficial. Cuando los pliegues neurales ya se han fusionado, la lámina basal se remodela de nueva cuenta, y la continuidad tisular permanece en la línea media dorsal (Massa 2009). A continuación la MEC sufre de modificaciones para permitir la migración de las células de la cresta neural. Aunque existen sustratos descritos para las MMP -3, -2 y -9 durante la etapa de neurulación, hasta el momento el resultado obtenido contrasta con la ubicación de dichos sustratos, pues no se ha descrito una lámina basal o membrana basal en el lumen del tubo neural, que es donde se observa la señal de éstas MMPs a distintos niveles del embrión.

La idea de que la autofagia pueda mediar la secreción no convencional de MMPs se apoya por los datos provenientes de un trabajo (Kean 2009) en el cual la línea celular de fibrosarcoma altamente invasiva HT-1080, cultivada en condiciones bajas en suero y en

presencia de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), ambas condiciones inductoras de autofagia (Mizushima 2007; Zogovic 2015), promueve un aumento en la colocación de MMP-2 y -9 con la proteína asociada a sinaptosoma 23 (SNAP23), la proteína de membrana asociada a vesícula (VAMP3) y syntaxina13, todas ellas proteínas reguladoras del tráfico vesicular. Además mutaciones con pérdida de función de SNAP23, VAMP3 y syntaxina13 provocaron una disminución en la secreción de las MMP-2 y -9 en el medio extracelular (Kean 2009). Aunado a esto, Zhu y colaboradores, intentando discernir componentes involucrados en la exocitosis del factor von Willebrand (vWF) en células endoteliales HUVEC, hallaron que se requiere de SNAP23, VAMP3 u 8 y syntaxina4 (Zhu 2015), una maquinaria similar a la reportada por Kean y colaboradores. El vWF es una proteína que presenta péptido señal, por lo que se esperaría que su secreción siguiera la vía clásica de secreción: retículo endoplásmico-aparato de Golgi-membrana plasmática. Sin embargo, se ha comprobado que la secreción no convencional mediada por autofagia es necesaria para la secreción y maduración del vWF en células endoteliales (Torisu 2013). Por lo tanto, no se descarta que las MMPs, las cuales también presentan péptido señal, puedan ser secretadas de manera no convencional por autofagia.

Para poder probar de que manera la autofagia podría estar participando en la formación del tubo neural, si es mediando la secreción no convencional de MMPs o llevando a cabo alguna otra de sus funciones, era conveniente contar con una metodología que nos permitirán manipular la autofagia en los embriones de una manera más directa, por lo que se estableció el protocolo de cultivo *extra-uterino* de embriones de ratón.

El tratamiento con Spautin1, inhibidor del complejo VPS34, parece cualitativamente retrasar el desarrollo embrionario. Embriones cultivados durante más de 12 horas en presencia del inhibidor mostraron un aumento de tamaño que no se acompaña del cierre del tubo neural ni del giro axial del embrión. En la literatura solo existe un reporte similar, en el que intentado discernir los efectos teratógenicos de la cloroquina (CQ, la cual impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma) como medicamento antimalárico, embriones de rata fueron cultivados con distintas concentraciones de CQ. Los resultados mostraron que a mayores concentraciones de CQ el saco vitelino y el amnios se tornaban opacos y la letalidad embrionaria aumentaba. La anomalía morfológica más observada fue la displasia craneofacial: hipoplasia del prosencéfalo, protusiones laterales en el romboencéfalo, disminución del largo de la cabeza y microftalmia. Interesante es que también reportan rotación axial anormal (Ambroso 1993). Pese a que en este estudio no se propusieron identificar los efectos de la CQ como un inhibidor de autofagia, los resultados concuerdan a los hallados en el presente trabajo: malformaciones del primordio del sistema nervioso central y alteraciones en el giro axial del embrión.

Tomando en conjunto las malformaciones del primordio del sistema nervioso central al emplear dos distintos inhibidores de autofagia en modelos murinos, junto con los patrones obtenidos con las tinciones de naranja de acridina, LysoTracker y Cyto-ID, corroborado con la observación del embrión GFP-LC3^{Tg/+} y la presencia de BECN1 en el

neuroepitelio, apuntan a que es la autofagia, y no funciones independientes de proteínas relacionadas a ella, la que participa en la formación del tubo neural.

Las alteraciones en el giro axial del embrión pueden deberse a que no está recibiendo los nutrientes adecuados provenientes del saco vitelino visceral. Como ya se mencionó, previo a la nutrición hemotrófica los mecanismos catabólicos llevados a cabo en el saco vitelino visceral son indispensables durante la neurulación del embrión. Hasta el momento se ha descrito que la endocitosis, la actividad lisosomal y la microautofagia (invaginaciones de la membrana lisosomal) son las encargadas de la degradación en el endodermo visceral, y el estudio de Ambroso corrobora estos antecedentes, ya que la CQ aumenta el pH lisosomal. Entonces, el bloqueo de la vía autofágica con SpautinI, que previene la formación de autofagosomas plantea un cuestionamiento interesante: ¿La (*macro*)autofagia podría participar en la provisión de nutrimentos en el endodermo visceral durante la neurulación del embrión?

PERSPECTIVAS

- Cultivar embriones transfectados con siRNA contra los genes pro-autofágicos *Becn1*, *Atg7* y *Vps34* o un siRNA irrelevante y analizar la integridad del neuroepitelio, así como el cerado del tubo neural.
- Determinar si especies reactivas de oxígeno (EROs) activan a la autofagia en la línea de fusión del tubo neural, ya que las EROs sirven como moléculas señalizadoras que inducen autofagia, y hay un incremento de EROs en la línea de fusión en tejidos que deben fusionarse durante el desarrollo, como el paladar y el esternón (Salas Vidal 1998).
- Determinar si las MMPs son activas, por ejemplo agregando como sustrato con colágena marcada o gelatina.
- Analizar si la inhibición de la autofagia altera el patrón de expresión y funcionalidad de las MMPs -3, -2 y -9.
- Evaluar si la inhibición de las MMP- 2, -3 y -9 altera el cierre del tubo neural.
- Determinar si hay en el saco vitelino células con mayor (*macro*) autofagia y su posible papel en el giro axial del embrión.

BIBLIOGRAFÍA

- Acloque, H. A., M. S.; Fishwick, K.; Bronner-Fraser, M.; Nieto, M. A.; (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." J Clin Invest **119**(6): 1438-1449.
- Agrawal, S. M. L., L.; Yong, V.W; (2008). "MMPs in the central nervous system: Where the good guys go bad." Seminars in Cell & Developmental Biology **19**(1): 10.
- Ambroso, J. L. H., C.; (1993). "Chloroquine Embriotoxicity in the Postimplantation Rat Conceptus in Vitro." Teratology **48**: 14.
- Anderson, M. J. S., T.; Lewandoski, M.; (2016). "An FGF3-BMP Signaling Axis Regulates Caudal Neural Tube Closure, Neural Crest Specification and Anterior-Posterior Axis Extension." PLoS Genet **12**(5).
- Antionoli, M. A., F.; Fimia, G.M.; Piacentini, M.; (2015). "AMBRA-1 regulated autophagy in vertebrate development." Int. J.Dev.Biol **59**: 9.
- Beck-Cormier, S. E., M.; Souilhoul,C.; Vandormael-Pournin,S.; Sourice,S.; Pilet, P.; Babinet,C.;Cohen-Tannoudji, M.; (2014). "Notchless Is Required for Axial Skeleton Formation in Mice." PLoS One **9**(5).
- Berry, D. L. B., E. H.; (2007). "Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in Drosophila." Cell **131**(6): 1137-1148.
- Cann, G. M. G., C.; Ying, L.; Deshpande, N.; Bekker, J.M.; Wang, L.; Zhou, B.; Rabinovitch, M.; (2008). "Developmental expression of LC3 α and β : absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice." Dev Dyn. **237**(1): 9.
- Cecconi, F. P., M.; Fimia, G. M. (2008). "The involvement of cell death and survival in neural tube defects: a distinct role for apoptosis and autophagy?" Cell Death Differ **15**(7): 1170-1177.
- Clarke P. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol **181**: 195-213.
- Cuervo, A. M. (2011). "Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 535-541.
- Chen I., Z.-F. B., R.R.; (1995). "*twist* is required in head mesenchymefor cranial neural tube morphogenesis." Genes & Development **9**: 14.
- Cheong, H. W., J.; Gonzales, L.K.; Guttentag, S.H.; Thompson, C.B.; Lindsten, T.; (2014). "Analysis of a lung defect in autophagy-deficient mouse strains." Autophagy **10**(1).
- Davalos, A. R. C., J.P.; Campisi,J.;Desprez P.Y.; (2010). "Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression." Cancer Metastasis Rev **29**(2): 11.
- Deretic, V. J., S.; Dupont, N.; (2012). "Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation." Trends Cell Biol **22**(8): 397-406.
- Di Bartolomeo, S. N., F.; Cecconi, F. (2010). "The role of autophagy during development in higher eukaryotes." Traffic **11**(10): 1280-1289.
- Duong, T. D. E., C.A.; (2004). "MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo." Dev Dyn. **229**(1): 12.
- Dupont, N. J., S.; Pilli, M.; Ornatowski, W.; Bhattacharya, D.; Deretic, V.; (2011). "Autophagy based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β ." EMBO J. **30**(23): 11.
- Duran, J. M. A., C.; Stefan, C.; Loomis, W. F.; Malhotra, V.; (2010). "Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes." J Cell Biol. **188**(4): 10.
- Fimia, G. M. S., A.; Romagnoli, A.; Giunta, L.; Di Bartolomeo, S.; Nardacci, R.; Corazzari, M.; Fuoco, C.; Ucar, A.; Schwartz, P.; Gruss, P.; Piacentini, M.; Chowdhury, K.;Cecconi, F.; (2007).

- "Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system." Nature **447**(7148): 1121-1125.
- Gan, B. P., X.; Nagy, T.; Alcaraz, A.; Gu, H.; Guan, J.L.; (2006). "Role of FIP200 in cardiac and liver development and its regulation of TNFalpha and TSC-mTOR signaling pathways." J Cell Biol. **175**(1): 12.
- Giambernardi, T. A. S., A.Y.; Gluhak, J.; Pavlin, D.; Troyer, D.A.; Das, G.; Rodeck, U; Klebe, R.J.; (2001). "Neutrophil collagenase (MMP-8) is expressed during early development in neural crest cells as well as in adult melanoma cells." Matrix Biol. **20**(8): 11.
- Gray, J. R., M.E.; (2011). "Neural tube closure in mouse whole embryo culture." J Vis Exp **56**: pii:3132.
- Greene, N. D. C., A. J. (2009). "Development of the vertebrate central nervous system: formation of the neural tube." Prenat Diagn **29**(4): 303-311.
- Harris, M. J. J., D.M. (2007). "Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. **79**(3): 13.
- He, C. K., D. J. (2009). "Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy." Annu Rev Genet **43**: 67-93.
- Hosako, H. F., L.E.; Martin, G.S.; Mirkes, P.E.; (2009). "The roles of p53 and p21 in normal development and hyperthermia-induced malformations." Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. **86**(1): 8.
- Huang, T. R.-P., J.A; (2014). "Senescence-Associated β –Galactosidase Activity Marks the Visceral Endoderm of Mouse Embryos but is not Indicative of Senescence." Genesis **52**: 9.
- Jang, C.-W. S., Y.; Starmer, J.; Yee, D.; Magnuson, T.; (2015). "Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development." Genes Dev. **29**(13): 16.
- Jiang, H. W., E.J.; Conrad, C.; Gomez-Manzano C.; Fueyo, J.; (2009). Autophagy pathways in glioblastoma. Autophagy in Disease and Clinical Applications. D. J. Klionsky, Elsevier Inc. **453**.
- Kalaskar, V. L., J.D.; (2014). "Mouse Embryonic Development in Serum-free Whole Embryo Culture System." J.Vis.Exp(85).
- Kean, M. J. W., K.C.; Skalski, M.; Myers, D.; Burtnik, A.; Foster, D.; Coppolino, M.G.; (2009). "VAMP3, syntaxin-13 and SNAP23 are involved in secretion of matrix metalloproteinases, degradation of the extracellular matrix and cell invasion." J Cell Sci. **122**(22): 10.
- Khaminets, A. B., C.; Dikic, I. (2016). "Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy." Trends Cell Biol **26**(1): 6-16.
- Klionsky, D. J. e. a. (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy **12**(1): 223.
- Komatsu, M. W., S.; Ueno, T.; Iwata, J.; Murata, S.; Tanida, I.; Ezaki, J.; Mizushima, N.; Ohsumi, Y.; Uchiyama, Y.; Kominami, E.; Tanaka, K.; Chiba, T.; (2005). "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice." J Cell Biol. **169**(3): 10.
- Kuma, A. H., M.; Matsui, M.; Yamamoto, A.; Nakaya, H.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y.; Tokuhiisa, T.; Mizushima, N. (2004). "The role of autophagy during the early neonatal starvation period." Nature **432**: 5.
- Laplante, M. S., D. M. (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- Lee, J. G., S.; Zhang, J.; (2012). "Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling." Biochem J **441**(2): 523-540.
- Liu, J. X., H.; Kim, M.; Xu, L.; Li, Y.; Zhang, L.; Cai, Y.; Norberg, H. V.; Zhang, T.; Furuya, T.; Jin, M.; Zhu, Z.; Wang, H.; Yu, J.; Hao, Y.; Choi, A.; Ke, H.; Ma, D.; Yuan, J.; (2011). "Beclin1 controls

- the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13." Cell **147**(1): 223-234.
- Manjithaya, R. A., C.; Loomis, W. F.; Subramani, S.; (2010). "Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation." J Cell Biol. **188**(4): 10.
- Mardones, P. R., D.C ; Hetz, C.; (2016). "Mystery solved: Trehalose kickstarts autophagy by blocking glucose transport." Sci. Signal **9**(416): fs2.
- Mari, M. T., S.A.; Reggiori, F.; (2011). "The puzzling origin of the autophagosomal membrane." F1000 Biol Rep. **3**(25).
- Mariño, G. F., A.F.; Cabrera, S.; Lundberg, Y.W.; Cabanillas, R.; Rodríguez, F.; Salvador-Montoliu, N.; Vega, J.A.; Germanà, A.; Fueyo, A.; Freije, J.M.; López-Otín, C.; (2010). "Autophagy is essential for mouse sense of balance." J Clin Invest. **120**(7): 14.
- Mariño, G. S.-M., N.; Fueyo, A.; Knecht, E.; Mizushima, N.; López-Otín, C.; (2007). "Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3." J Biol Chem. **282**(25): 11.
- Massa, V. G., N.D.E.; Copp, A.J.; (2009). "Do cells become homeless during neural tube closure?" Cell Cycle **8**(16): 2.
- Massa, V. S., D.; Ybot-Gonzalez, P.; Ferraro, E.; Rongvaux, A.; Cecconi, F.; Flavell, R.; Greene, N. D.; Copp, A. J. (2009). "Apoptosis is not required for mammalian neural tube closure." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(20): 8233-8238.
- Mehrpour, M. E., A.; Beau, I.; Codogno, P., (2010). "Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells." Cell Res **20**(7): 748-762.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes & Dev. **21**: 13.
- Mizushima, N. K., M. (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." Cell **147**(4): 728-741.
- Mizushima, N. Y., A.; Matsui, M.; Yoshimori, T.; Ohsumi, Y.; (2004). "In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker." Mol Biol Cell. **15**(3): 12.
- Monsonego-Ornan, E. K., J.; Bar, A.; Roth, L.; Fraggi-Rankis, V.; Simsa, S.; Kohl, A.; Sela-Donenfeld, D.; (2012). "Matrix metalloproteinase 9/gelatinase B is required for neural crest cell migration." Dev Biol **364**(2): 162-177.
- Muñoz-Espín, D. C., M.; Maraver, A.; Gómez-López, G.; Contreras, J.; Murrillo-Cuesta, S.; Rodríguez-Baeza, A.; Varela-Nieto, I.; Ruberte, J.; Collado, M.; Serrano, M. (2013). "Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development." Cell **155**: 15.
- Muñoz-Espín, D. S., M.; (2014). "Cellular senescence: from physiology to pathology." Nature Reviews Molecular Cell Biology **15**(482): 15.
- Nagy, A. G., M.; Vintersten, K.; Berhinger, R.; (2003). Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual., John Inglis.
- Narita, M. Y., A. R.; Arakawa, S.; Samarajiwa, S. A.; Nakashima, T.; Yoshida, S.; Hong, S.; Berry, L. S.; Reichelt, S.; Ferreira, M.; Tavare, S.; Inoki, K.; Shimizu, S.; (2011). "Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes." Science **332**(6032): 966-970.
- O'Sullivan, G. A. K., M.; Elazar, Z.; Betz, H.; (2005). "GABARAP is not essential for GABA receptor targeting to the synapse." Eur J Neurosci. **22**(10): 5.
- Patterson, A. D. H., J.; Fornace, A.J.Jr; Hollander, M.C.; (2006). "Neural tube development requires the cooperation of p53- and Gadd45a-associated pathways." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. **76**(2): 4.
- Patterson, R. A. C., A.M.; Cantemir, V.; Brauer, P.R; Reedy, M.V.; (2013). "MT2-MMP Expression During Early Avian Morphogenesis." Anat Rec (Hoboken) **296**(1): 7.

- Pickard, B. D., S. (2004). "Overexpression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 during *Xenopus* embryogenesis affects head and axial tissue formation." *Cell res* **14**(5): 11.
- Ponpuak, M. M., M.A.; Kimura, T.; Chauhan, S.; Cleyrat, C; Deretic, V; (2015). "Secretory autophagy." *Curr Opin Cell Biol* **35**: 11.
- Pownall, M. E. I., H.V. (2010). *FGF Signalling in Vertebrate Development*, Morgan & Claypool Life Sciences.
- Qu, X. Z., Z.; Sun, Q.; Luby-Phelps, K.; Cheng, P.; Hogan, R.N.; Gilpin, C.; Levine, B.; (2007). "Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development." *Cell* **128**(5): 16.
- Ray, H. J. N., L. (2012). "Mechanisms of tissue fusion during development." *Development* **139**(10): 1701-1711.
- Read, R. S., K.; Baker, K.; Hansen, G.; Vogel, P.; (2011). "Histopathological and neurological features of Atg4b knockout mice." *Vet Pathol.* **48**(2): 9.
- Saitoh, T. F., N.; Hayashi, T.; Takahara, K.; Satoh, T.; Lee, H.; Matsunaga, K.; Kageyama, K.; Omori, H.; Noda, T.; Yamamoto, N.; Kawai, T.; Ishii, K.; Takeuchi, O.; Yoshimori, T.; Akira, S.; (2009). "Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(49): 5.
- Saitoh, T. F., N.; Jang, M.H.; Uematsu, S.; Yang, B.G.; Satoh, T.; Omori, H.; Noda, T.; Yamamoto, N.; Komatsu, M.; Tanaka, K.; Kawai, T.; Tsujimura, T.; Takeuchi, O.; Yoshimori, T.; Akira, S.; (2008). "Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production." *Nature*.
- Salas-Vidal E., L. H., Castro-Obregón S., Cuervo R., Escalante-Alcalde D., Covarrubias L. (1998). "Reactive Oxygen Species Participate in the Control of Mouse Embryonic Cell Death." *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* (238): 136-147.
- Shintani T., K. D. J. (2004). "Autophagy in health and disease: a double-edged sword." *Science* **306**(5698): 990-995.
- Sou, Y. S. W., S.; Iwata, J.; Ueno, T.; Fujimura, T.; Hara, T.; Sawada, N.; Yamada, A.; Mizushima, N.; Uchiyama, Y.; Kominami, E.; Tanaka, K.; Komatsu, M.; (2008). "The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice." *Mol Biol Cell.* **19**(11): 14.
- Storer, M. M., A.; Robert-Moreno, A.; Pecoraro, M.; Ortells, M. C.; Di Giacomo, V.; Yosef, R.; Pilpel, N.; Krizhanovsky, V.; Sharpe, J.; Keyes, W. M.; (2013). "Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning." *Cell* **155**(5): 1119-1130.
- Stumpo, D. J. B., N.A.; Phillips, R.S.; Ghosh, S.; Maronpot, R.R.; Castranio, T.; Meyers, E.N.; Mishina, Y.; Blackshear, P.J.; (2004). "Chorioallantoic Fusion Defects and Embryonic Lethality Resulting from Disruption of *Zfp36L1*, a Gene Encoding a CCCH Tandem Zinc Finger Protein of the Tristetraprolin Family." *Molecular and Cellular Biology* **24**(14): 11.
- Thomaidou, D. P., P.K.; Matsas, R.; (2010). Neurogenesis in the Central Nervous System: Cell Cycle Progression/Exit and Differentiation of Neuronal Progenitors. *Cell Cycle Regulation and Differentiation in Cardiovascular and Neural Systems*. A. G. Giordano, U.
- Torisu, T. T., K.; Lee, I. H.; Liu, J.; Malide, D.; Combs, C. A.; Wu, X. S.; Rovira, I.I.; Fergusson, M.M.; Weigert, R.; Connelly, P. S.; Daniels, M. P.; Komatsu, M.; Cao, L.; Finkel, T.; (2013). "Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor." *Nat Med.* **19**(10): 7.
- Torisu, T. T., K.; Lee, I.H.; Liu, J.; Malide, D.; Combs, C.A.; Wu, X.S.; Rovira, I.I.; Fergusson, M.M.; Weigert, R.; Connelly, P.S.; Daniels, M.P.; Komatsu, M.; Cao, L.; Finkel, T.; (2013). "Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor." *Nat Med.* **19**(10): 7.

- Tsukamoto, S. K., A.; Mizushima, N.; (2008). "The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition." Autophagy **4**(8): 3.
- Van Hove, I. L., K.; Van de Velde, S.; Verslegers, M.; Moons, L.; (2012). "Matrix metalloproteinase-3 in the central nervous system: a look on the bright side." J Neurochem **123**(2): 14.
- Vu, T. H. W. Z. (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." Genes & Development **14**: 11.
- Walsh, L. A. C., C.A.; Damjanovski, S.; (2007). "Soluble membrane-type 3 matrix metalloproteinase causes changes in gene expression and increased gelatinase activity during *Xenopus laevis* development." Int. J.Dev.Biol **51**: 7.
- Yang, Z. K., D. J.; (2010). "Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 124-131.
- Yue, Z. J., S.; Yang, C.; Levine, A.J.; Heintz, N.; (2003). "Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(25): 6.
- Zhou, X. T., J.; Wang, F.; (2011). "The Mammalian Class 3 PI3K (PIK3C3) Is Required for Early Embryogenesis and Cell Proliferation." PLoS One **6**(1).
- Zhu, Q. M. Y., M.; Lowenstein, C.J.; (2015). "SNAP23 Regulates Endothelial Exocytosis of von Willebrand Factor." PloS One **10**(8).
- Zogovic, N. T.-K., G.; Misirkic-Marjanovic, M.; Vucicevic, L.; Janjetovic, K.; Harhaji-Trajkovic, L.; Trajkovic, V.; (2015). "Coordinated activation of AMP-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and autophagy regulates phorbol myristate acetate-induced differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells." J Neurochem. **133**(2): 10.
- Zohn, I. E. S., A.A.; (2010). "The visceral yolk sac endoderm provides for absorption of nutrients to the embryo during neurulation." Birth Defects Res A Clin Mol Teratol. **88**(8): 8.