



**Universidad Nacional Autónoma de México**

---

---

**Facultad de Ciencias**

**Activación temprana de la autofagia en respuesta al daño  
al DNA ocasionado por Irinotecan en células de mamífero**

T e s i s

que para obtener el título de:

B I Ó L O G A

p r e s e n t a:

**Zaida Escila Martínez Moreno**



**Directora de tesis:  
Dra. Susana Castro Obregón  
Ciudad Universitaria, CDMX, 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.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

### 1. Datos del alumno:

APELLIDO PATERNO: Martínez  
APELLIDO MATERNO: Moreno  
NOMBRES: Zaida Escila  
NO. DE CUENTA: 309241566  
TELÉFONO: 58491645  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología

### 2. Datos de la tutora y secretaria del jurado:

GRADO: Dra.  
APELLIDO PATERNO: Castro  
APELLIDO MATERNO: Obregón  
NOMBRES: Susana  
CORREO: scastro@ifc.unam.mx  
TELÉFONO: 56225676  
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias  
Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología

### 3. Datos del sinodal y presidente del jurado:

GRADO: Dr.  
APELLIDO PATERNO: Valdés  
APELLIDO MATERNO: López  
NOMBRES: Víctor Manuel  
CORREO: vvaldes@unam.mx  
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Celular

### 4. Datos del sinodal y vocal del jurado:

GRADO: Dra.  
APELLIDO PATERNO: Cabrera  
APELLIDO MATERNO: Benítez  
NOMBRES: María Sandra  
CORREO: sandris\_cabrera@yahoo.com  
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Celular

**5. Datos del sinodal y suplente I del jurado:**

GRADO: Dra.  
APELLIDO PATERNO: Escobar  
APELLIDO MATERNO: Sánchez  
NOMBRES: María Luisa  
CORREO: escobarluisa@ciencias.unam.mx  
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Celular

**6. Datos del sinodal y suplente II del jurado:**

GRADO: Dra.  
APELLIDO PATERNO: Rojas  
APELLIDO MATERNO: Lemus  
NOMBRES: Marcela  
CORREO: marcelarojaslemus@hotmail.com  
UBICACIÓN: Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Medicina  
Departamento de Biología Celular y Tisular

**7. Datos del trabajo escrito:**

TÍTULO: Activación temprana de la autofagia en respuesta al daño al  
DNA ocasionado por Irinotecán en células de mamífero  
NÚMERO DE PÁGINAS: 77  
AÑO: 2017

## DEDICATORIA

A mis padres, con mucho amor, dedicación, respeto y orgullo, en muestra del esfuerzo que hicieron a lo largo de estos 23 años, para sacarme adelante.

A mi hermano, con mucho amor.

A todos los animales que dieron su vida para permitirme desarrollar este trabajo lo mejor que pude.

Al Instituto de Fisiología Celular, a la Universidad Nacional Autónoma de México, y a mi país, México, que puede ser aún, muchísimo más.

A mí.

*“Por mi raza, hablará el espíritu”*

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

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 Dra. Susana Castro Obregón. Durante la realización de este trabajo se contó con beca para concluir los estudios de licenciatura del proyecto PAPIIT-IN206015 y beca para la presentación de este trabajo en el XXXI Congreso Nacional de Bioquímica por parte de la Sociedad Mexicana de Bioquímica y del proyecto CONACyT CB2013-220515. 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*.

Agradezco a la Dra. Beatriz Aguilar Maldonado por todo el apoyo otorgado dentro y fuera del laboratorio, los consejos para las técnicas llevadas a cabo, así como la ayuda técnica directa a mi trabajo.

A los miembros del jurado, Dr. Víctor Valdés (Presidente), Dra. Sandra Cabrera (Vocal), Dra. Luisa Escobar (Suplente I) y Dra. Marcela Rojas (Suplente II), por todas sus aportaciones y correcciones para hacer este trabajo digno de esta Universidad.

Al Dr. Gabriel del Río y a la Dra. Leonor Pérez Martínez por la donación y el préstamo de material para el desarrollo de esta tesis.

A todos los miembros administrativos, al taller del IFC, en particular al Ing. Manuel Ortíz Benavides, por arreglar todos los accidentes ocurridos, al área de cómputo por el apoyo dado, en particular a Francisco Pérez Eugenio.

A la Dra. Mahara Valverde y la Dra. Marcela Rojas, por su apoyo y conocimiento otorgado para llevar a cabo el ensayo cometa.

A la Dra. Rocío Salceda, por permitirme formar parte de su taller.

A Teresa Constantino Velázquez por su amabilidad y su ayuda en el mantenimiento del laboratorio, y a Daniel Quintero Enriquez, Miguel Angel Enriquez Correa y Concepción Nuñez Constantino por todos esos buenos deseos al llegar temprano o salir tarde todos los días.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres María Eugenia Moreno Chaparro y José Luis Martínez Palacios, y a mi hermano Josué Martínez Moreno, por todo el apoyo, la paciencia, los consejos, el tiempo, las experiencias compartidas, los ejemplos dados, el amor y el cariño que me han dado en 23 años de vida.

A Jorge, por ser mi apoyo incondicional durante tiempos difíciles y momentos maravillosos; por darme esos ratitos de descanso y felicidad que tanto necesitaba. También por todo lo referente a la revisión de mi tesis y a hacer este trabajo más comprensible para el mundo.

A mi tutora, la Dra. Susana Castro, por todas las ideas, consejos y enseñanzas recibidas; por toda la supervisión dada hacia mí y mi trabajo a lo largo de mi proyecto, así como la oportunidad de ser parte de su laboratorio.

Al futuro Dr. Gabriel Muciño por todo el tiempo dedicado a mi aprendizaje, todos los consejos para facilitarme las cosas y por todas las pláticas compartidas entre experimentos.

A todos los amigos que a lo largo de estos cuatro años o más, me han apoyado de mil maneras: Manuel Argüelles, Ameyalli Gómez, Gustavo Tovar, Antonio López, Eugenio Contreras, Jaipuneet Singh, Noémie Bélanger, Miguel Tavera, Carolina León, Santiago Ortega, Andrés Mejía y Luis Vigosa.

A todos los excelentes profesores que he tenido en mi vida, por todas sus enseñanzas; especialmente a María del Carmen Miñana, Carlos Ochoa, Rodolfo Salas, Helia Reyna Osuna y Alejandro Marché por ayudarme a formar mi criterio y a cumplir mis metas.

A Gabriel, Bety, Daniel, Pilar, Abiram, Alex, Jorge, Elisa y Miguel por hacer del laboratorio mi segunda casa con todo y las palomitas, las pizzas, las gomitas, las galletas y el helado.

A Intercambio Internacional Puma, a Shary, Pablo, Óscar, Ameyalli, Lalo, Emmanuel, Kevin y todos los intercambistas por el apoyo, los aprendizajes y las distracciones otorgadas.

Al gobierno de Canadá, a MITACS y al Dr. Marc Germain por permitirme salir del país y conocer nuevas ideas, lugares y personas; por todo el conocimiento y las habilidades obtenidos en tres meses.

Pour Noémie, Valerie, Gerald et Julie pour la camaraderie dans mon stage à l'étranger.

To Jorge Ramos, Jaipuneet Singh, Eduardo Tavares, Noémie Bélanger, Violeta Hernández, Tumulu Satish, Sergio Díaz, Sherezada Ochoa and Karen Gonçalves, because I always needed a place to call it home, and you made it posible in another country with a foreign language. You also made possible all the changes I have been through since that summer and all the great memories I have.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y a mi hermoso país que es México, y que por más lejos que me encuentre, siempre formará parte de mí.

# ÍNDICE

---

<b>I. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>II. Abreviaturas</b> .....	<b>3</b>
<b>III. Introducción</b> .....	<b>6</b>
1. <i>Autofagia</i> .....	6
1.1. Tipos de autofagia.....	6
1.2. Mecanismos moleculares y de regulación de la autofagia.....	8
1.3. Monitoreo de la autofagia.....	12
1.4. Manipulación de la autofagia.....	14
2. <i>La autofagia y el daño al DNA</i> .....	14
2.1. El daño al DNA y su reparación.....	16
2.2. Rupturas de cadena sencilla de DNA y los mecanismos celulares de reparación.....	16
2.3. Monitoreo del daño al DNA.....	18
2.4. La autofagia y la respuesta al daño al DNA.....	19
3. <i>Modelos de estudio</i> .....	21
3.1. Fibroblastos embrionarios de ratón.....	22
3.2. Línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.....	22
<b>IV. Justificación</b> .....	<b>23</b>
<b>V. Hipótesis</b> .....	<b>25</b>
<b>VI. Objetivos</b> .....	<b>25</b>
<b>VII. Material y métodos</b> .....	<b>26</b>
1. <i>Cultivos celulares</i> .....	26
1.1. Mantenimiento de los fibroblastos embrionarios de ratón y de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549.....	26
2. <i>Inducción de daño a través de Irinotecán y evaluación por Ensayo Cometa</i> .....	28
2.1. Daño al DNA provocado por Irinotecán.....	28
2.2. Ensayo cometa.....	28
3. <i>SDS-PAGE / Western blot</i> .....	30
3.1. Preparación de las células.....	30
3.2. Extracción de las proteínas.....	30
3.3. Corrida del gel y transferencia.....	31
3.4. Incubación de la membrana con anticuerpos.....	32
3.5. Revelado de la membrana.....	33
4. <i>Inmunofluorescencia</i> .....	33
4.1. Preparación de los cubreobjetos.....	33
4.2. Fijación.....	34
4.3. Incubación con anticuerpos.....	34
4.4. Montaje de laminillas.....	35
5. <i>Manipulación de la autofagia</i> .....	35
5.1. Inhibición del flujo autofágico por cloroquina.....	35



5.2. Inducción de la autofagia por trehalosa.....	35
6. <i>Adquisición de imágenes</i> .....	35
6.1. Microscopio.....	35
6.2. Lámpara.....	35
6.3. Cámara.....	35
6.4. Software.....	35
7. <i>Cuantificaciones y estadística</i> .....	36
7.1. Cuantificación de células y viabilidad por exclusión de azul de tripano.....	36
7.2. Ensayo cometa.....	36
7.3. Estadística.....	36
<b>VIII. Resultados</b> .....	<b>37</b>
1. <i>Estandarización del Ensayo Cometa para cuantificar rupturas de DNA</i> .....	37
2. <i>Inducción de daño al DNA con una dosis subletal de Irinotecán</i> .....	38
2.1. Fibroblastos embrionarios de ratón.....	38
2.2. Línea celular A549.....	38
3. <i>La reparación del daño al DNA causado por Irinotecán subletal se da en 6 horas en ambos tipos celulares</i> .....	43
4. <i>En MEFs, la autofagia se activó durante la inducción del daño y se mantuvo activa durante la reparación del DNA; mientras que en las células A549, la autofagia se activa moderadamente sólo durante el daño</i> .....	43
5. <i>El flujo autofágico no se altera durante la exposición al daño y la reparación de éste</i> .....	45
6. <i>La activación de la autofagia disminuye el daño al DNA</i> .....	47
7. <i>El Irinotecán se acumula en forma punteada dentro de las células, posiblemente en autofagosomas</i> .....	49
<b>IX. Discusión</b> .....	<b>52</b>
1. <i>La reparación del DNA se realiza con la misma velocidad en las células MEF y en la línea celular A549</i> .....	52
2. <i>La respuesta autofágica es diferente en ambos tipos celulares</i> .....	53
3. <i>La función de la autofagia durante la reparación del daño al DNA</i> .....	54
4. <i>Participación de otros tipos de autofagia y de la vía proteasomal en la reparación del daño al DNA</i> .....	56
<b>X. Conclusiones</b> .....	<b>59</b>
<b>XI. Perspectivas</b> .....	<b>60</b>
<b>XII. Referencias</b> .....	<b>62</b>
<b>XIII. Anexos</b> .....	<b>69</b>
1. <i>Cultivo celular</i> .....	69
2. <i>Inducción de daño al DNA y evaluación por ensayo cometa</i> .....	71
3. <i>SDS-PAGE / Western blot</i> .....	72
4. <i>Inmunofluorescencia</i> .....	76
5. <i>Manipulación de la autofagia</i> .....	77
6. <i>Equipos</i> .....	77

# I. RESUMEN

---

La macroautofagia (referida como autofagia en adelante) es un proceso evolutivamente conservado en el cual algunas macromoléculas y organelos de células eucariontes son degradados a través de la fusión de vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas con los lisosomas. Esta vía catabólica se encuentra desregulada en diferentes patologías como la neurodegeneración y el cáncer. Estos procesos patológicos también se encuentran relacionadas con acumulación de daño al DNA y con inestabilidad genómica. Por lo tanto es importante estudiar la relación entre daño al DNA y la autofagia. La autofagia se puede activar en presencia de agentes de daño al DNA que incluyen radiación ionizante, etopósido, camptotecina, entre otros; pero el mecanismo por el cual se da esta activación y la función que ésta tiene es desconocida. Además, la supresión de la autofagia resulta en inestabilidad cromosómica que puede resultar en activación de oncogenes y progresión tumoral.

Las rupturas de cadena sencilla en el DNA son una de las lesiones más comunes en el genoma. Se ha encontrado relación entre ellas y enfermedades como las neurodegenerativas y el cáncer. La ausencia de FIP200 (una proteína esencial de la autofagia) en fibroblastos embrionarios de ratón provoca acumulación de daño al DNA cuando las células son tratadas con camptotecina, que es un inhibidor de la topoisomerasa I que provoca rupturas de cadena sencilla. Estas células no son capaces de reparar el DNA y son más susceptibles a la muerte celular. En el presente trabajo, se postuló que las rupturas de cadena sencilla inducidas por Irinotecan (un derivado de la camptotecina) activarían a la autofagia de forma temprana durante el daño al DNA en células normales como los fibroblastos; sin embargo, esta respuesta podría variar en un tipo celular diferente como es la línea celular cancerosa A549 de adenocarcinoma de pulmón.

Se evaluó el daño al DNA inducido por Irinotecán (un derivado de camptotecina) y se encontró que la dosis y el tiempo de exposición necesarios para generar y reparar las rupturas de cadena sencilla en el DNA es similar entre los fibroblastos y las células epiteliales cancerosas A549. Sin embargo, al comparar el nivel de autofagia se encontró que las células epiteliales cancerosas A549 tienen una autofagia basal mayor que los fibroblastos. En los fibroblastos, la autofagia se activa desde el inicio de la exposición a Irinotecán y continúa activa durante la reparación del daño. En cambio, en las A549, la autofagia no aumenta durante el daño al DNA ni durante la reparación de éste. Finalmente, nosotros proponemos que la autofagia es esencial tanto para la protección del DNA, como para la reparación adecuada del daño a éste.

## ABSTRACT

---

Macroautophagy (referred as autophagy hereafter) is an evolutionarily conserved process in which some macromolecules and organelles of eukaryotic cells are degraded through the fusion of double-membrane vesicles called autophagosomes with the lysosomes. This catabolic pathway is misregulated in various pathological conditions like neurodegeneration, and cancer. These diseases are also related to an accumulation of DNA damage and therefore, genome instability. Autophagy can be activated in presence of DNA damaging agents like ionizing radiation, etoposide, camptothecin and temozolamide; but the underlying mechanism and the function of this activation is still unknown. Moreover, autophagy suppression results in chromosomal instability, that could lead to oncogenes activation and tumor progression.

DNA single strand breaks are one of the most common genomic lesions. A link between this kind of damage and diseases as neurodegenerative disorders and cancer has been found. Cells without FIP200 (an essential autophagy protein) accumulate major levels of DNA damage generated by camptothecin (a topoisomerase I blocker that produces single strand breaks). These cells also fail to repair the DNA and consequently, have increased sensitivity to cell death. In this work we hypothesize that single strand breaks would activate autophagy during early DNA damage in normal cells (mouse embryonic fibroblasts) and that this response could vary in a cancer cell line (A549 from lung adenocarcinoma).

The evaluation of DNA damage induced by Irinotecan (a camptothecin derivative) at a sublethal dose led to find no difference between the dose and exposure time required to generate DNA single strand breaks and to repair them in both fibroblasts and A549. However, when autophagy levels were compared between both cell lines, it was found that the cancerous cells A549 had a higher basal autophagy than fibroblasts. While fibroblasts activated autophagy from the first time of exposure to Irinotecan and it continued active during DNA repair; the cell line A549 did not increase autophagy neither during DNA damage nor during DNA repair. We propose that autophagy is essential both to the protection of the DNA and to its correct repair when damaged.

## II. ABREVIATURAS

---

<b><math>\gamma</math>H2A.X</b>	Miembro X de la familia de las histonas H2A fosforilado (Phosphorylated H2A histone family member X)
<b>3-MA</b>	3-Metil adenina
<b>A549</b>	Línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano
<b>AMPK/PRKA</b>	Proteína quinasa activada por AMP (Protein Kinase AMP-Activated)
<b>ATG</b>	Proteína relacionada con autofagia (Autophagy related)
<b>ATM</b>	Quinasa de serinas/treoninas de Ataxia Telangiectasia Mutante (Ataxia Telangiectasia Mutated Serine/Threonine Kinase)
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato (Adenosine Triphosphate)
<b>ATR</b>	Quinasa de serinas/treoninas de la proteína relacionada con Ataxia Telangiectasia y Rad3 (Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related Protein Serine/Threonine Kinase)
<b>BECN1</b>	Proteína Beclin 1
<b>BER</b>	Reparación por escisión de bases (base excision repair)
<b>CMA</b>	Autofagia mediada por chaperonas (Chaperone-mediated autophagy)
<b>CQ</b>	Cloroquina (chloroquine)
<b>DAPI</b>	4', 6-diamino-2-fenilindol (4',6-Diamidino-2-Phenylindole)
<b>DDR</b>	Respuesta al daño al DNA (DNA Damage Response)
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
<b>DMEM/F12</b>	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco con la mezcla de nutrientes F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)

<b>DSBs</b>	Rupturas de cadena doble en el DNA (Double Strand Breaks)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>FIP200/RB1CC1</b>	RB1-inducible coiled-coil protein, también llamada FIP200 (200 KDa FAK Family Kinase-Interacting Protein)
<b>GABARAP</b>	Proteína asociada al receptor de tipo A del ácido <i>gamma</i> amino butírico (Gamma-Aminobutyric Acid type A Receptor-Associated Protein)
<b>GLUT/SLC2A</b>	Transportador de glucosa, familia de transportadores de solutos 2 (Solute Carrier Family 2)
<b>HR</b>	Recombinación homóloga (homologous recombination)
<b>LC3/MAP1LC3</b>	Cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada a microtúbulo (Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3)
<b>LC3-PE/LC3-II</b>	LC3 lipidado con fosfatidiletanolamina (PE, phosphatidylethanolamine)
<b>LMPA</b>	Agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point Agarose)
<b>MEFs</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón (mouse embryonic fibroblasts)
<b>mTORC1</b>	Complejo 1 de MTOR, formado por MTOR, MLST8 (o GβL), AKT1S1/PRAS40 y RPTOR
<b>NHEJ</b>	Unión de extremos no homólogos (non-homologous end joining)
<b>NMPA</b>	Agarosa de punto normal de fusión (Normal Melting Point Agarose)
<b>NSCs</b>	Células troncales neuronales (neural stem cells)
<b>p62/SQSTM1</b>	Proteína Secuestrosoma 1
<b>PARP1</b>	Poli-ADP Ribosa polimerasa 1 (Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1)
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino (Phosphate buffered saline)
<b>PVDF</b>	Membrana de transferencia de fluoruro de polivileno (polyvinylidene difluoride transfer membrane)
<b>rcf</b>	Fuerza centrífuga relativa (relative centrifugal force)
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
<b>SCAN1</b>	Ataxia espinocerebelosa con neuropatía axonal 1 (spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy 1)

<b>EC / SCGE</b>	Ensayo cometa, también llamado electroforesis en gel de células individuales (Comet assay / Single Cell Gel Electrophoresis)
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate)
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
<b>SSBR</b>	Reparación de rupturas de cadena sencilla (SSB Repair)
<b>SSBs</b>	Rupturas de cadena sencilla en el DNA (Single Strand Breaks)
<b>TDP1</b>	Tirosil fosfodiesterasa de DNA 1 (Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)
<b>TOP1</b>	Topoisomerasa 1 de DNA (DNA topoisomerase 1)
<b>Treh</b>	Trehalosa (trehalose)
<b>Vps34/PIK3C3</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa de la clase 3 (Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3)
<b>WT</b>	Organismo o células con alelos silvestre (Wild type)

### III. INTRODUCCIÓN

---

#### 1. Autofagia

A través del tiempo, las células eucariontes han evolucionado para adaptarse a diversos cambios en las condiciones ambientales.; ya sean cambios físicos como la temperatura y la luz ultravioleta, químicos como las concentraciones iónicas, el pH, las especies reactivas de oxígeno, la escasez de nutrientes, y cambios biológicos como señales extracelulares entre las que están neurotransmisores, citosinas y patógenos (Hughes & Rusten 2007; Kroemer et al. 2010). La respuesta celular a estos factores determina si la célula puede o no funcionar correctamente y sobrevivir.

Una de las vías que median la adaptación al estrés y el control del daño celular es la autofagia. Ésta consiste en la degradación de macromoléculas intracelulares dentro de los lisosomas, entre otros fines para obtener sus componentes básicos y reutilizarlos como nutrientes (Kim & Lee 2014). La autofagia constituye uno de los principales mecanismos protectores de la célula, pues le permite sobrevivir a múltiples tipos de estrés, así como defender al organismo en contra de enfermedades degenerativas, inflamatorias, infecciosas y neoplásicas (Kroemer et al. 2010). Por otra parte, la autofagia también regula el metabolismo energético gracias al reciclaje de proteínas, lípidos y carbohidratos, y permite la sobrevivencia celular en condiciones de deficiencia de nutrientes, crecimiento celular sostenido y durante la homeostasis de los organismos.

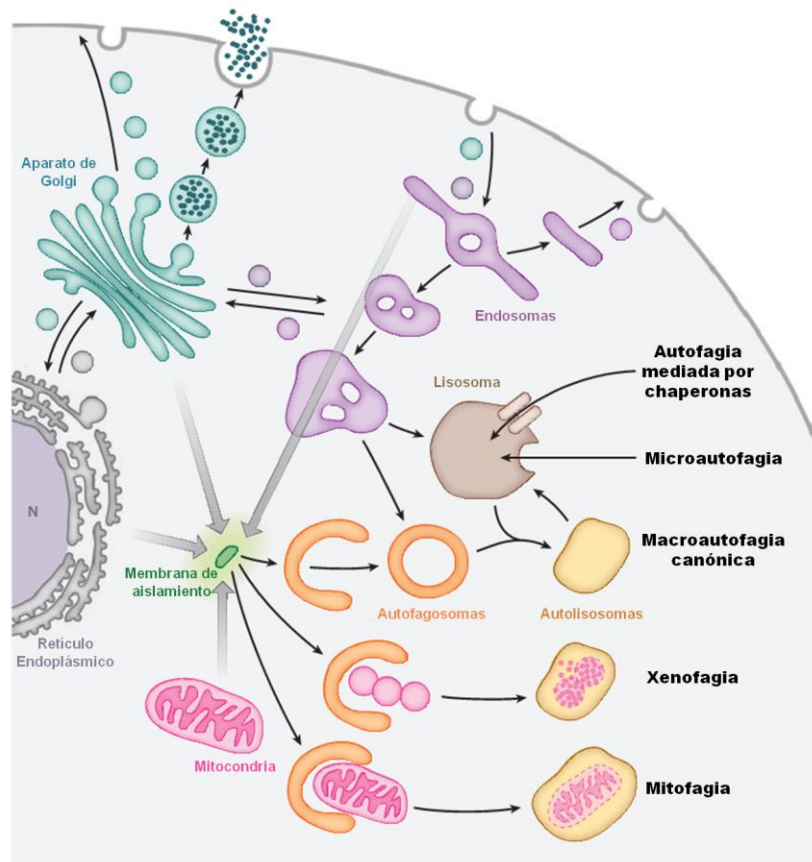
Además de la respuesta a diversos tipos de estrés, la autofagia se encuentra involucrada en la remodelación del organismo durante el desarrollo y la diferenciación celular, en la degradación de proteínas intracelulares, en el recambio membranal y de organelos como las mitocondrias y los peroxisomas, que ocurre en condiciones basales, y en el control de muerte celular de tipo II (autofágica o no apoptótica) (Zappavigna *et al.* 2013).

##### 1.1. Tipos de autofagia.

Han sido descritos tres tipos distintos de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia (Figura 1). Éstas se diferencian en la forma en la que el material que será degradado es transportado dentro de los lisosomas, así como la regulación de cada una y el tipo de material que será digerido.

La **microautofagia** fue descrita en levadura, y está involucrada en la asimilación y degradación de ciertas regiones del citosol, que incluyen proteínas y organelos

citoplásmicos, de forma directa por los lisosomas sin necesidad de la formación de autofagosomas (encontrados en la macroautofagia). La vacuola, ya sea por invaginación o protrusión, rodea al citoplasma y forma una vesícula en su interior que contiene el material a ser degradado. La microautofagia permite el recambio de proteínas de vida media larga en condiciones basales, así como la degradación de mitocondrias, peroxisomas y de segmentos del núcleo (Mijaljica *et al.* 2011; Reggiori *et al.* 2012). En mamíferos se ha observado que endosomas tardíos invaginan material citoplásmico, por lo que se le denomina microautofagia endosomal (Endosomal Microautophagy, E-MA) (Sahu *et al.* 2011).



**Figura 1. Distintos tipos de autofagia.** Cada uno varía en la forma en la que el material es introducido al lisosoma: a través de chaperonas (autofagia mediada por chaperonas) y de la formación de vesículas directamente del lisosoma (microautofagia) o de vesículas de doble membrana que después se fusionan con el lisosoma (macroautofagia). La macroautofagia puede ser específica de mitocondrias (mitofagia) o de microorganismos (xenofagia), entre otras. Esta imagen fue modificada de Mizushima *et al.* 2011.

La **autofagia mediada por chaperonas** (CMA, chaperone-mediated autophagy) se distingue por su capacidad de seleccionar un grupo particular de proteínas citoplásmicas que son translocadas a través de la membrana lisosomal sin necesidad de la invaginación de esta membrana o la formación de vacuolas. Todos sus sustratos dependen de un motivo relacionado con el pentapéptido KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), que es reconocido por la chaperona Hsc70 que forma parte de un complejo. El complejo de la chaperona y la proteína



interactúan con el receptor LAMP-2A de la membrana lisosomal, que al multimerizarse forma parte de un complejo que empuja a la proteína al lumen lisosomal. En condiciones de estrés por ausencia de nutrientes, los niveles de CMA aumentan cuando los niveles de macroautofagia comienzan a disminuir (Zappavigna *et al.* 2013).

La **macroautofagia** está caracterizada por el secuestro de material citoplásmico dentro de los autofagosomas para posteriormente ser degradado por lisosomas. Es la forma mejor descrita de la autofagia y es la responsable de la degradación tanto de proteínas solubles como de organelos bajo condiciones de estrés. Los autofagosomas presentan dos membranas y contienen organelos citoplásmicos o citosol que les permite ser distinguidos de otros tipos de vesículas como los endosomas y los lisosomas a través de microscopía electrónica de transmisión. La fusión entre los autofagosomas y los lisosomas genera autolisosomas, en los que tanto la membrana interna del autofagosoma como su contenido es degradado por las hidrolasas lisosomales (Kroemer *et al.* 2009).

En un principio se pensó que la macroautofagia podía ocurrir de forma inespecífica, que consistía en engullir un fragmento del citoplasma y degradar todo su contenido; sin embargo, ahora sabemos que es específica y suele dársele el nombre de acuerdo al cargo. En esta última, el autofagosoma se forma alrededor de una estructura en particular, ya sea alrededor de agregados proteicos (agrefagia), peroxisomas (pexofagia), ribosomas (ribofagia), retículo endoplásmico (reticulofagia), triglicéridos y colesterol (lipofagia), mitocondrias (mitofagia) o de microorganismos intracelulares que sean producto de una infección (xenofagia), entre otros (Stolz *et al.* 2014). La selección del material a degradar se realiza a través de proteínas adaptadoras llamadas receptores autofágicos, que interactúan tanto con el cargo como con el autofagosoma. Este trabajo se centra en este tipo de autofagia.

### *1.2. Mecanismos moleculares y de regulación de la autofagia.*

La macroautofagia, o autofagia como será llamada a partir de ahora, es controlada desde su iniciación hasta su término por numerosos componentes regulatorios; y en la actualidad se conocen más de treinta proteínas relacionadas con la autofagia (ATG). La autofagia se divide en cinco fases principales: iniciación, nucleación, elongación, fusión y degradación, y término (Figura 2).

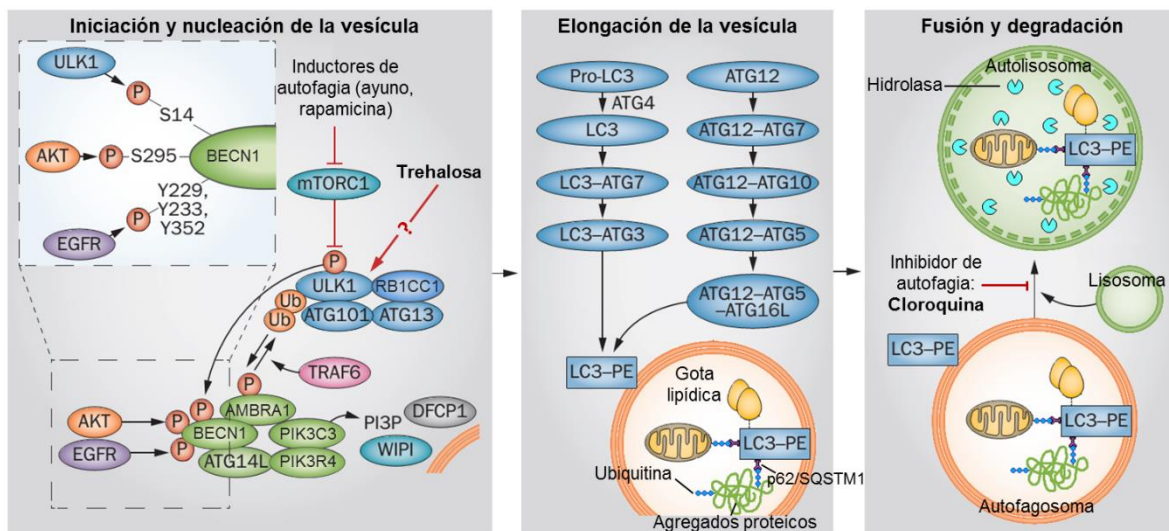
#### Iniciación de la autofagia.

La autofagia puede iniciar por diversas causas, como la presencia de sustancias como la rapamicina o la ausencia de energía o de nutrientes. El complejo 1 de MTOR (mTORC1) se encuentra conformado por MTOR, MLST8 (o GβL), AKT1S1/PRAS40 y RPTOR (regulatory-associated protein of TOR); y es el único complejo de MTOR que es afectado por la rapamicina. Cuando la célula tiene suficientes nutrientes y energía, mTORC1 inhibe la iniciación de la autofagia a través de la fosforilación directa de ATG13 y de ULK1. Por otra parte, cuando existe ausencia de nutrientes o se bloquea al mTORC1 a través de la

rapamicina, ULK1 y ATG13 se desfosforilan, y entonces inicia la autofagia (Alers et al. 2012).

La proteína AMPK es una cinasa que censa la energía de la célula, y cuando hay disminución en ésta, esta cinasa provoca la inducción de la autofagia a través de la inhibición de mTORC1 por la fosforilación de RPTOR (Gwinn et al. 2008). También activa directamente a ULK1 por fosforilación y por ende, se inicia la autofagia (Kim et al. 2011).

La proteína ULK1 forma un complejo con las proteínas RB1CC1/FIP200, ATG101 y ATG13, y cuando la autofagia inicia, este complejo llamado ULK se libera del bloqueo continuo de mTORC1 y se activa. Entonces, la proteína ULK1 se autofosforila, y fosforila a FIP200 y a ATG13, lo que permite la total activación de este complejo (Alers et al. 2012; Kim & Lee 2014; Mizushima et al. 2011).



**Figura 2. Fases principales de la autofagia y los mecanismos moleculares que median su regulación.** Las fases de la autofagia son la iniciación, la nucleación, la elongación, la fusión y la degradación, y el término. La autofagia requiere de la formación del complejo ULK1 y el complejo VPS34/PIK3C3 para la iniciación de la formación del autofagosoma. Posteriormente requiere de la conjugación de LC3-PE catalizado por los sistemas de ATG7 y ATG3, así como ATG12-ATG5 por la acción de ATG7 y ATG10, que luego interactúa de manera no covalente con ATG16L para la elongación del autofagosoma alrededor del cargo a degradar, mediado por la interacción de un receptor autofágico (por ejemplo, p62/SQSTM1) con la proteína LC3-PE o LC3-II. Finalmente, la vesícula o autofagosoma se fusiona con un lisosoma y su contenido, incluyendo la membrana interna del autofagosoma, el receptor autofágico y el cargo, se degrada a través de hidrolasas en el autolisosoma. Esta imagen fue modificada de Kim & Lee 2014.

### Nucleación de la maquinaria molecular para la formación del autofagosoma.

Para que se forme un autofagosoma es necesario reclutar complejos de proteínas en la superficie de membranas internas de la célula, como el retículo endoplásmico, aunque puede iniciar en otros organelos. A esta etapa se le llama nucleación. En vertebrados, el complejo ULK1 activado en la etapa de iniciación fosforila a AMBRA1. Posteriormente, esta proteína ya fosforilada permite reclutar al complejo VPS34/PIK3C3, formado por BECN1, VPS34/PIK3C3, PIK3R4/VPS15 y ATG14L. El complejo ULK mejora la actividad del complejo PIK3C3 a través de la fosforilación de BECN1. Finalmente, la proteína PIK3C3

produce fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) que permite la nucleación de la maquinaria molecular para formar una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma (Kim & Lee 2014; Mizushima *et al.* 2011).

#### Elongación del autofagosoma.

La formación y expansión de los autofagosomas se da a partir de una estructura membranosa llamada fagóforo o membrana de aislamiento y se encuentra mediada por proteínas ATG. Los primeros complejos en actuar se agrupan en dos sistemas que se conjugan con un mecanismo similar a los de ubiquitinación. El primer sistema está formado por las proteínas ATG12, ATG5, ATG7 y ATG10. ATG12 es similar a la ubiquitina y es activada por ATG7 (enzima de tipo E1), que después transfiere ATG12 a ATG10 (enzima de tipo E2). Finalmente, ATG10 transfiere ATG12 a ATG5, que se unen covalentemente entre ellas (Mizushima *et al.* 1998). Una vez conjugadas, interactúan de manera no covalente con otra proteína llamada ATG16L para formar multímeros del complejo ATG12-ATG5/ATG16L que se transloca al fagóforo para reclutar al resto de la maquinaria de elongación (Fujita *et al.* 2008).

El segundo sistema tiene como actor principal a LC3 (MAP1LC3, Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3), que se lipida. En esta conjugación está involucrada nuevamente la proteína ATG7, además de proteínas exclusivas de este sistema como ATG4 y ATG3. La proteasa ATG4 corta el extremo carboxilo de pro-LC3, y lo convierte así en LC3-I. ATG7 (la misma enzima de tipo E1 que participa en el complejo anteriormente descrito) interactúa con LC3-I y lo transfiere a ATG3 (enzima de tipo E2). Posteriormente, ATG3 transfiere el LC3-I a la fosfatidiletanolamina (PE) gracias a la ayuda del primer conjugado ATG12-ATG5/ATG16L (que actúa como enzima de tipo E3), quedando así LC3 anclada a la membrana del fagosoma en formación. De esta forma se genera la forma lipídica LC3-PE, también conocida como LC3-II, que participa en la elongación de los autofagosomas guiando la curvatura de la membrana alrededor del material a engullir (Kabeya *et al.* 2000; Tanida *et al.* 2004).

El complejo ATG12-ATG5/ATG16L no tiene una enzima que lo descomponga y se produce de forma constitutiva; su localización en los fagóforos es lo que se induce cuando se activa la autofagia. Una vez que se acumula LC3-II en el fagóforo en elongación, el complejo ATG12-ATG5/ATG16L se desprende de la membrana del fagóforo, por lo que no se encuentra en los autofagosomas maduros (Mizushima *et al.* 1998). En cambio, LC3-II permanece anclado en la membrana del fagóforo hasta la maduración del autofagosoma, es decir, cuando se cierra la vesícula alrededor del cargo, formando una vesícula de doble membrana. La detección de LC3-II sirve como marcador de la inducción de la autofagia y permite detectar autofagosomas. La proteína LC3-II puede ser desconjugada de la PE por la proteasa ATG4 (Hughes & Rusten 2007; Kim & Lee 2014; Mizushima *et al.* 2011). Así, el LC3-II en la membrana externa del autofagosoma es cortado por ATG4 y el de la membrana interna es degradado por enzimas lisosomales.

Durante la autofagia, los agregados proteicos, los patógenos intracelulares u organelos a degradar, son marcados previamente y reconocidos a través de proteínas adaptadoras

llamadas receptores autofágicos. Éstas se unen simultáneamente con el cargo y con proteínas asociadas al autofagosoma como LC3 y GABARAP (gamma aminobutyric acid receptor associated protein) (Khaminets *et al.* 2016). Algunos cargos y sus respectivas proteínas adaptadoras se encuentran descritos en la tabla 1.

La proteína p62 (secuestrosoma 1; SQSTM1) funciona como proteína adaptadora para material a degradar marcado con ubiquitina, que puede ser ácidos nucleicos, cuerpos medios durante la citocinesis, agregados proteicos, gránulos de estrés, mitocondrias despolarizadas, etc. Esta proteína se une directamente a las ubiquitinas que marcan a los diferentes cargos, y a LC3 y otros homólogos en mamíferos de ATG8 (GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2); y así se guía la dirección de la elongación del fagóforo alrededor del material que será degradado para introducirlo al autofagosoma (Pankiv *et al.* 2007; Stolz *et al.* 2014).

**Tabla 1. Ejemplos de proteínas adaptadoras ante diferentes tipos de autofagia selectiva.** Modificada de Khaminets *et al.* 2016.

Vía autofágica	Proteína adaptadora	Cargo / Sustrato
<b>Dependiente de ubiquitina</b>		
Agrefagia	p62, NBR1, OPTN, CUE5, TOLLIP	Agregados proteicos
Mitofagia	p62, OPTN, NDP52, TAX1BP1	Mitocondrias
Eliminación del cuerpo medio	p62, NBR1	Cuerpo medio (citocinesis)
Eliminación de ácidos nucleicos	p62, NDP52	Ácidos nucleicos
Proteafagia	RPN10	Proteasomas
<b>Independientes de ubiquitina</b>		
Mitofagia	NIX, BNIP3, FUNDC1, Atg32	Mitocondrias
Nucleofagia	Atg39	Membrana nuclear
<b>Indefinido</b>		
Granulofagia	-	Gránulos de estrés

#### Fusión y degradación de la vesícula.

Los autofagosomas maduros se fusionan con los lisosomas para formar autofagolisosomas (autolisosomas); y dentro de estas estructuras, los materiales u organelos transportados por autofagia son digeridos por las enzimas lisosomales.

#### Terminación de la autofagia.

La terminación de la autofagia se logra gracias a la reactivación del complejo mTOR1 por el aumento de nutrientes generado por los autolisosomas; o bien, a partir de la finalización del estímulo de estrés que desencadena a la autofagia (Kim & Lee 2014). El destino de los productos degradados depende del tipo de cargo llevado al autolisosoma y del estímulo de activación de la autofagia, por lo que puede ser modulado. La degradación de proteínas genera aminoácidos libres que son transferidos de vuelta al citoplasma para reactivar a mTORC1 y, por tanto, inhibir autofagia. En la mayoría de las ocasiones, las biomoléculas obtenidas como producto de la autofagia son recicladas hacia las vías biosintéticas; sin embargo, bajo un estrés metabólico, el cargo degradado puede ser catabolizado para promover la síntesis de ATP (Liu & Ryan 2012; Rabinowitz & White 2010). Los productos

de la digestión lisosomal que no pueden ser degradados y reciclados hacia el citoplasma, permanecen en una estructura membranosa cerrada llamada cuerpo residual (Mescher 2013 fig. 2-17). En algunas ocasiones, el cargo es secretado.

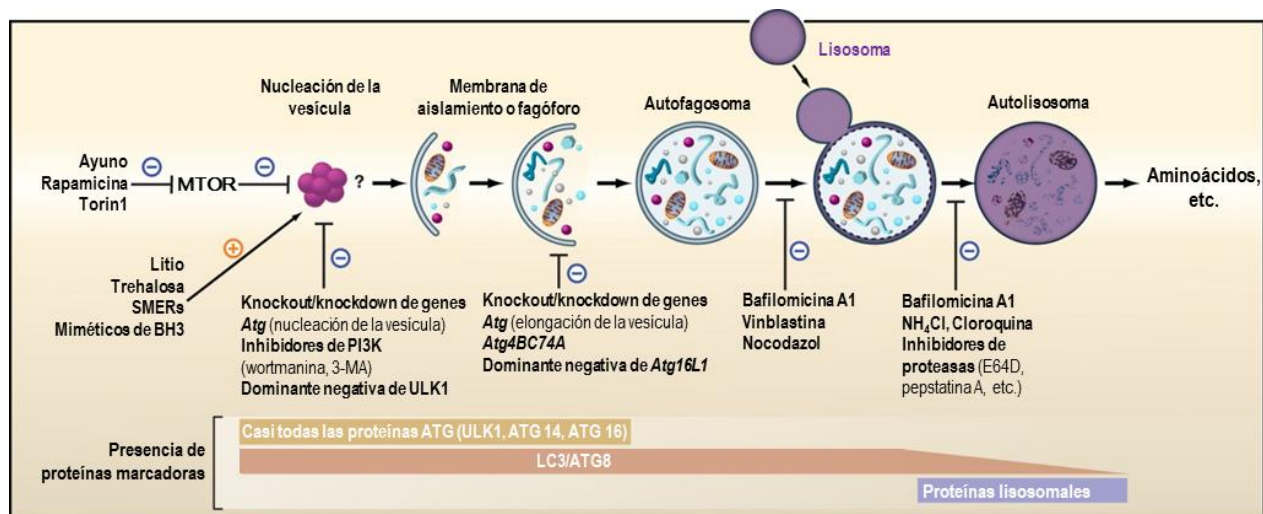
**Tabla 2. El destino del cargo autofágico depende de la situación metabólica de la célula.**

Biomolécula	Producto de degradación	Ausencia de nutrientes	Ausencia de energía
Proteínas	Aminoácidos	Síntesis de proteínas	Ciclo de Krebs
Lípidos	Ácidos grasos	Síntesis de lípidos	$\beta$ -oxidación
Carbohidratos	Monosacáridos	Glucólisis / PPP	
Ácidos nucleicos	Nucleósidos	Síntesis de ácidos nucleicos	PPP / Ciclo de Krebs / Gluconeogénesis

PPP: vía de las pentosas fosfato (pentose phosphate pathway). Obtenido de Rabinowitz & White 2010.

### 1.3. Monitoreo de la autofagia

En la actualidad se conocen múltiples formas de monitorear la autofagia, e inclusive se puede diferir entre las distintas fases ya mencionadas. Sin embargo, es importante que se usen de manera coordinada varias de las proteínas marcadoras, así como varios métodos para determinar si el aumento en cierta proteína se debe a un aumento real en la degradación por la vía autofágica, o bien, por un bloqueo en la vía que no permite la degradación de los componentes (Figura 3).



**Figura 3. Dinámica de expresión de las proteínas autofágicas que sirven como marcadores; así como la regulación artificial que se puede llevar a cabo en las distintas fases de la autofagia.** La mayoría de las proteínas relacionadas con la autofagia (ATG) se encuentran involucradas en las primeras etapas de la autofagia, pero no en las últimas. LC3, por el contrario, puede ser utilizado como marcador autofágico pues es posible detectarlo a partir de la formación del autofagosoma y hasta la degradación de su contenido. Moléculas pequeñas potenciadoras (Small-Molecule Enhancers; SMERs); 3-metil adenina (3-Methyladenine; 3-MA). Modificado de Mizushima *et al.* 2010.

Uno de los métodos más utilizados para monitorear la autofagia consiste en cuantificar el aumento de la cantidad de autofagosomas por célula; sin embargo, esta técnica es

insuficiente para determinar que existe una adecuada actividad autofágica pues es posible que el flujo posterior se encuentre interrumpido y que sea ésta, la razón por la que aumentan. Por lo tanto, es necesario monitorear también el flujo autofágico (Klionsky *et al.* 2016; Mizushima *et al.* 2010).

#### Monitoreo del número de autofagosomas.

Se pueden utilizar varios métodos para lograrlo, entre los que se encuentra la microscopía de fluorescencia y los ensayos bioquímicos. En la *microscopía de fluorescencia* se utilizan anticuerpos que detectan a la proteína LC3. Esta proteína se encuentra difusa en el citoplasma en ausencia de autofagia; y por lo tanto, en las micrografías se observa de esta forma. Sin embargo, cuando es procesada y anclada a la membrana del autofagosoma, se observa en forma de estructuras punteadas que representan principalmente autofagosomas. Para este fin, también se pueden utilizar células que expresen la construcción GFP-LC3 (*Green Fluorescent Protein*) y que, por lo tanto, permitan observar el cambio en el patrón de LC3 a través de la autofluorescencia de esta proteína (Mizushima *et al.* 2010).

La proteína LC3 también se puede observar a través de *ensayos bioquímicos* como el Western blot por medio del uso de anticuerpos. El peso molecular real de LC3-II es mayor que el de LC3-I; a pesar de esto, la fosfatidiletanolamina y su hidrofobicidad generan que migre más rápido y, en consecuencia, aparenta un menor peso molecular en la técnica. La cantidad de LC3-II correlaciona usualmente con el número de autofagosomas contabilizados por los métodos ópticos (Mizushima *et al.* 2010).

#### Monitoreo del flujo autofágico.

Para confirmar que la autofagia es funcional, es necesario verificar que el flujo autofágico siga y que el aumento del número de autofagosomas o de la proteína LC3 no se debe al bloqueo de la degradación. Para esto existen varios métodos entre los que destaca el ensayo de recambio de LC3 y otros sustratos como p62. Este ensayo, uno de los métodos más usados para medir el flujo autofágico, consiste en tratar a las células con agentes lisosomotrópicos como la cloroquina o la bafilomicina A (Figura 3), que provocan que la degradación de LC3 se vea interrumpida y, por tanto, se acumule. La diferencia entre la cantidad de LC3-II de las muestras en presencia y ausencia del agente lisosomotrópico, representa la cantidad de LC3 que es entregado a los lisosomas para su degradación.

Además, la desaparición total de LC3 es un buen indicador de flujo autofágico, pues la cantidad de éste disminuye después de periodos largos de autofagia. Actualmente se sabe que la proteína p62 es degradada como consecuencia de la autofagia selectiva. Por lo tanto, la expresión celular total de la proteína p62 correlaciona de forma inversa con la actividad autofágica (Mizushima *et al.* 2010); aunque no siempre existe una clara correlación entre el aumento de LC3-II y la disminución de p62 (SQSTM1), pues en ocasiones se induce su expresión (Klionsky *et al.* 2016).

#### 1.4. Manipulación de la autofagia

Como se puede observar en la figura 3, la autofagia puede ser regulada artificialmente a través de múltiples moléculas, en todas las fases que presenta. Su manipulación permite entender por completo a este proceso biológico; sin embargo, el principal problema con los inductores que se conocen actualmente, es que no son específicos de ella.

##### Inducción de la autofagia.

En la actualidad existe un interés creciente en encontrar distintos inductores, con objetivos de investigación, aunque también como terapéuticos potenciales. El inductor más conocido es el ayuno o la ausencia de aminoácidos y factores de crecimiento. Este método funciona tanto *in vitro* como *in vivo*; sin embargo, algunas líneas celulares tumorales son resistentes a la autofagia inducida por ayuno. Otro método consiste en la modulación de las vías de señalización sensibles a nutrientes que incluyen al complejo mTOR. La rapamicina inhibe a mTOR, y activa la autofagia tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, tanto el ayuno como la rapamicina no son inductores específicos de autofagia; pues afectan a otras respuestas celulares como la síntesis de proteínas y el metabolismo celular (Mizushima *et al.* 2010).

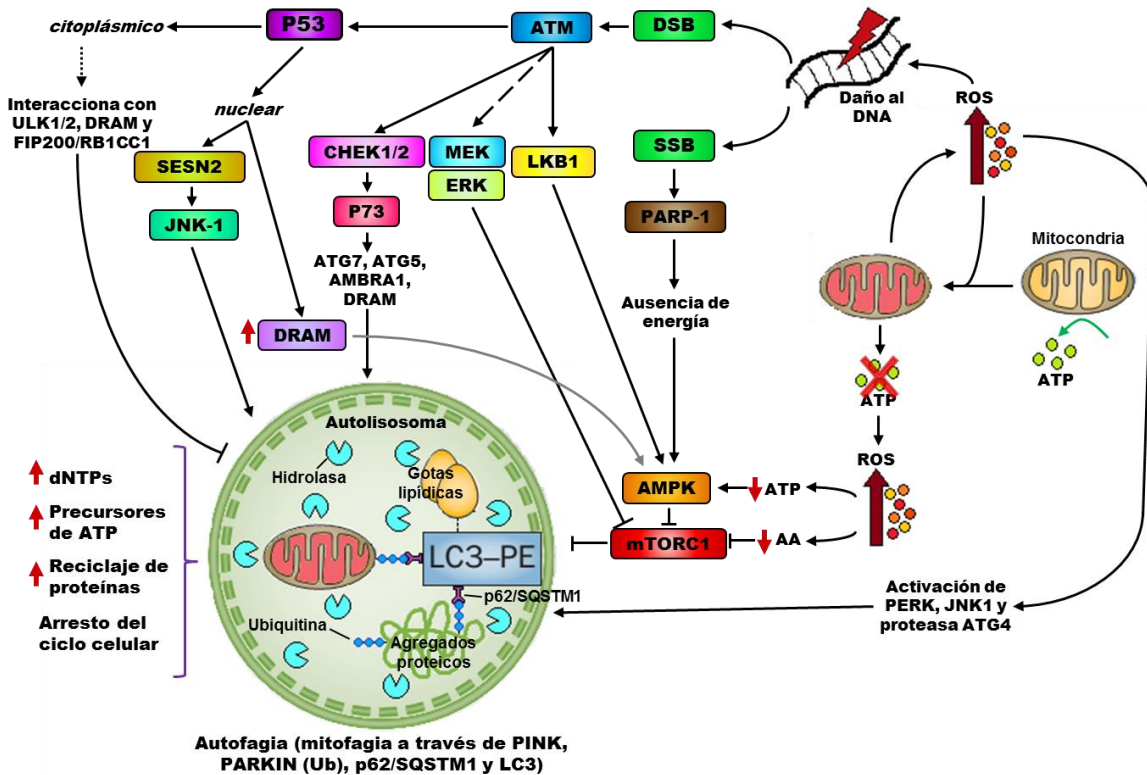
Por otra parte, existen inductores de autofagia independientes del complejo mTOR, entre los que destaca la trehalosa. Este compuesto es un disacárido presente en muchas especies no mamíferas, y protege a las células que la presentan de muchos tipos de estrés ambiental como el calor, el frío, la deshidratación y la oxidación al prevenir la desnaturalización de las proteínas. Uno de sus principales efectos protectores consiste en su propiedad como chaperona química, pues permite el plegamiento correcto de las proteínas a través de interacciones directas entre ellas y la trehalosa. También se ha observado que previene los agregados de  $\beta$ -amiloide asociados con la enfermedad de Alzheimer (Sarkar *et al.* 2007). Estas funciones se deben a su capacidad de inducir autofagia en muchos tipos celulares, a través de la inhibición de transportadores de hexosas como los componentes de la familia GLUT/SLC2A1 (DeBosch *et al.* 2016).

## 2. La autofagia y el daño al DNA

Durante la respuesta a estrés subletal, las células se someten a cambios rápidos para adaptar su metabolismo y protegerse contra un daño potencial. La autofagia es inducida por diferentes estímulos de estrés entre los que se encuentran los causados por ausencia de nutrientes y energía, estrés oxidante, daño mitocondrial y daño al DNA.

Un inductor conocido de autofagia es el estrés oxidante. Se ha visto, por ejemplo, que el peróxido de hidrógeno exógeno puede activar autofagia a través de PERK, de la oxidación y activación de la proteasa ATG4 que acelera la producción de LC3-I, o a través de la inhibición directa o indirecta de MTOR. En esta última, la inhibición puede llevarse a cabo como resultado de daño al DNA, a través de la activación de PARP1, o bien, por la

activación de ATM y la activación subsecuente de LKB1 y AMPK (Czarny *et al.* 2015; Kroemer *et al.* 2010). Una de las consecuencias más conocidas de la presencia de especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) es el daño al DNA. Al ocurrir éste, se pueden expresar los genes proautofágicos inducidos por P53. La proteína antitumoral P53 presenta un efecto dual en la autofagia, pues actúa como un regulador positivo a través de su actividad transcripcional (nuclear) y como un regulador negativo por sus funciones citoplásmicas, pues interactúa con FIP200/RB1CC1 y por tanto, la inhibe (Figura 4) (Yu *et al.* 2013).



**Figura 4. Respuesta autofágica al estrés oxidante provocado por especies reactivas de oxígeno (ROS), por daño al DNA o por fallo mitocondrial.** Durante la producción de energía en forma de ATP a través de la fosforilación oxidante, las mitocondrias generan ROS que pueden causar daño a través de la oxidación de lípidos, proteínas y del daño al DNA (Reggiori *et al.* 2012). Una mitocondria dañada aumenta la producción de ROS, y disminuye la síntesis de ATP y por tanto, la disponibilidad de aminoácidos (AA). Ambas consecuencias inducen autofagia a través del complejo mTOR. Por otra parte, las ROS generan radicales libres que pueden generar daño al DNA en forma de rupturas de cadena sencilla (Single-Strand Breaks; SSBs) o de cadena doble (Double-Strand Breaks; DSBs). Ambas desencadenan una cascada de señalización que induce autofagia. La proteína P53 tiene un papel dual en la autofagia, que depende de su ubicación intracelular; cuando es citoplásmica la inhibe, mientras que cuando presenta su actividad transcripcional, la induce. Modificado de Kim & Lee 2014; Kroemer *et al.* 2010 y Vessoni *et al.* 2013.

Además del estrés oxidante exógeno, también se puede producir estrés de forma endógena a través de las ROS generadas por la respiración metabólica, y por la presencia de mitocondrias dañadas; por lo que las células deben deshacerse de ellas a través de la mitofagia. El reconocimiento de las mitocondrias despolarizadas requiere de la cinasa mitocondrial PINK1. Esta proteína facilita el reclutamiento de la ubiquitin-ligasa PARK2, que ubiquitina a proteínas mitocondriales incluida VDAC1 y que finalmente permite el



reconocimiento a través de los diferentes adaptadores como p62 (tabla 1) y por tanto, la remoción por autofagia de la mitocondria dañada (Kroemer *et al.* 2010).

### *2.1. El daño al DNA y su reparación*

Los genomas de todos los organismos eucariontes se encuentran expuestos a muchas moléculas dañinas producidas de forma endógena, a través de la respiración mitocondrial principalmente; o bien, de forma exógena a través de agentes físicos, químicos y biológicos como la luz ultravioleta, la radiación ionizante, los metales pesados, los contaminantes en el ambiente, las drogas quimioterapéuticas y las respuestas inflamatorias. Existe un espectro muy amplio de lesiones formadas en el DNA, desde la modificación de bases nitrogenadas, aductos de proteínas-DNA, sitios sin bases nitrogenadas, hasta rupturas de la cadena; sin embargo, los tipos de daño más comunes son la oxidación de bases nitrogenadas y las rupturas de cadena simple (Wilson III & Iyama 2013).

Si existe daño persistente al DNA se puede inducir mutagénesis así como rearrreglos cromosómicos que forman parte de la inestabilidad genómica. Esta última es un paso esencial en el desarrollo del cáncer (Abbas *et al.* 2013) y contribuye además al envejecimiento y a las enfermedades relacionadas con éste (Lombard *et al.* 2005). El daño al DNA también promueve muerte celular que podría estar relacionada con patologías como las neurodegenerativas (Chow & Herrup 2015).

### *2.2. Rupturas de cadena sencilla de DNA y los mecanismos celulares de reparación*

Todas las lesiones en el DNA generan una respuesta celular específica con una maquinaria celular especializada en repararla. Sin embargo, este trabajo sólo hablará de las rupturas de cadena sencilla (Single Strand Breaks, SSBs) y la reparación de éstas, debido a que son las lesiones del DNA más comunes producidas de forma intracelular, y se ha estimado que se producen decenas de miles en cada célula por día (Wilson III & Iyama 2013).

Al generarse un daño de este tipo en el DNA, es necesaria una señal rápida y precisa que se lleva a cabo a través de una cascada de reacciones de fosforilación y desfosforilación. En el caso de la respuesta a las SSBs, se requiere a la proteína ATR (Ataxia telangiectasia and RAD3 related), que al formar un complejo con la proteína ATRIP (Ataxia telangiectasia mutated and RAD3-related protein, interacting protein), reconoce DNA de una sola hebra, que se encuentra cubierto por la proteína RPA (replication protein A). También hay otras proteínas que reconocen a la proteína RPA como el complejo 9-1-1 y RADd17. ATR además es capaz de interactuar con proteínas del control del ciclo celular, con p53, con desacetilasas de histonas y con distintos factores de transcripción de genes de la reparación del DNA que regulan la respuesta general de la célula al daño (Czarny *et al.* 2015).

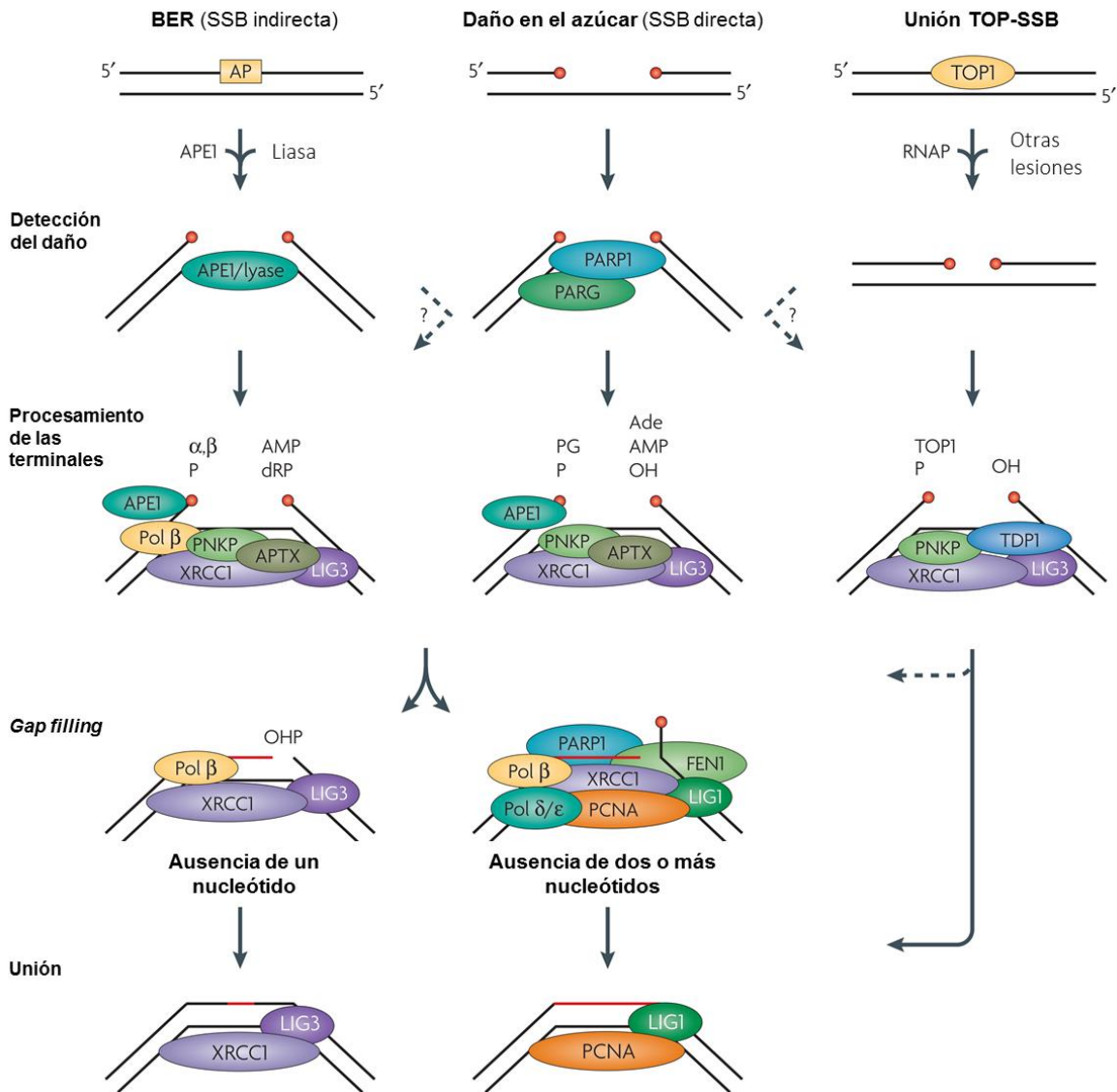
Las SSBs pueden aparecer como consecuencia directa de reacciones entre la desoxirribosa y ROS endógenos. También pueden ocurrir directamente por la oxidación del azúcar; o bien, de forma indirecta a través de la reparación por escisión de bases (base-excision repair, BER) de bases oxidadas, sitios abásicos y de bases alteradas de otras maneras. Otra forma de producción de esta clase de daño es a través de intermediarios catalíticos de proteínas como la topoisomerasa 1 (TOP1) que forma un complejo con el DNA que permite liberar la tensión provocada por la replicación y la transcripción. Existen compuestos como la camptotecina que se unen a la topoisomerasa 1 y de esta manera generan estrés genotóxico a través de múltiples SSBs. Si las rupturas ocasionadas por la TOP1 se encuentran cercanas a polimerasas de DNA o RNA, así como a otros tipos de lesiones, cuando la célula está duplicando su material genético, entonces las rupturas de cadena sencilla se pueden convertir en rupturas de cadena doble (double-strand breaks, DSBs) (Caldecott 2008).

Las rupturas que se generan de forma directa a través de la oxidación de la desoxirribosa o a través de forma indirecta por la reparación de tipo BER, son reconocidas por miembros de la familia de PARP (poli ADP-ribosa polimerasa), que construyen cadenas de poli-ADP-ribosa en estas regiones para reclutar a otras proteínas de respuesta al daño, o bien, se modifica a si misma o a otras proteínas con cadenas ramificadas de ADP-ribosa. Esta respuesta es transitoria, pues PARP se disocia rápidamente del DNA y las cadenas de ADP-ribosa son degradadas por la proteína PARG (poli-ADP-ribosa glicohidrolasa). La proteína más importante reclutada por las cadenas de ADP ribosa es la proteína XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), que funciona como un andamio que interactúa, estabiliza y estimula a muchos componentes enzimáticos del proceso de reparación de rupturas de cadena sencilla (SSBR) (revisado en Wilson III & Iyama 2013).

El extremo 3' y 5' de todas las rupturas de cadena sencilla se encuentra alterado y debe ser convertido a 3'-hidroxil (3'-OH) y 5'-fosfato (3'-P) para permitir que ocurra la reparación del DNA. Este es el paso más diverso a nivel enzimático en toda la SSBR, como se observa en la figura 5. El procesamiento de las terminales del DNA es la fase crucial de la reparación, pues los extremos anormales son particularmente citotóxicos. Debido a que en el presente trabajo se utiliza un derivado de camptotecina, únicamente se abordará el tratamiento de las terminales provocadas por la unión de la TOP1 con el DNA (revisado en Wilson III & Iyama 2013).

La topoisomerasa 1 es la responsable de la relajación de estructuras de alto orden en el DNA durante la transcripción y la replicación, a través de la generación de rupturas de cadena sencilla. Durante este mecanismo, TOP1 forma un complejo estable con el DNA llamado TOP1cc (TOP1 cleavage complex). En éste, TOP1 queda unido covalentemente al extremo 3' de la ruptura del DNA. La unión persistente del complejo TOP1cc (TOP-SSB) es dañina para las funciones celulares normales, ya que no permite la replicación ni la transcripción. TDP1 (Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1) es la proteína responsable de remover al complejo a través de la hidrólisis del enlace fosfodiéster entre el DNA y el residuo catalítico de TOP1. Este corte deja un fosfato en el extremo terminal 3', que es convertido a un grupo OH por PNKP. Esta proteína también fosforila al hidroxilo en 5' generado por la

TOP1; y de esta forma, facilita el *gap filling* y la unión llevada a cabo por la POL  $\beta$  y el complejo XRCC1-LIG3 $\alpha$  (figura 5) (revisado en Wilson III & Iyama 2013).



**Figura 5. Reparación de las rupturas de cadena sencilla.** La maquinaria a utilizar para reparar la ruptura depende del tipo de terminal encontrado en el DNA, y la reparación de cada una de éstas requiere de proteínas como PNKP, XRCC1, LIG3 y POL $\beta$ , siempre presentes en esta reparación. Modificado de Caldecott, 2008.

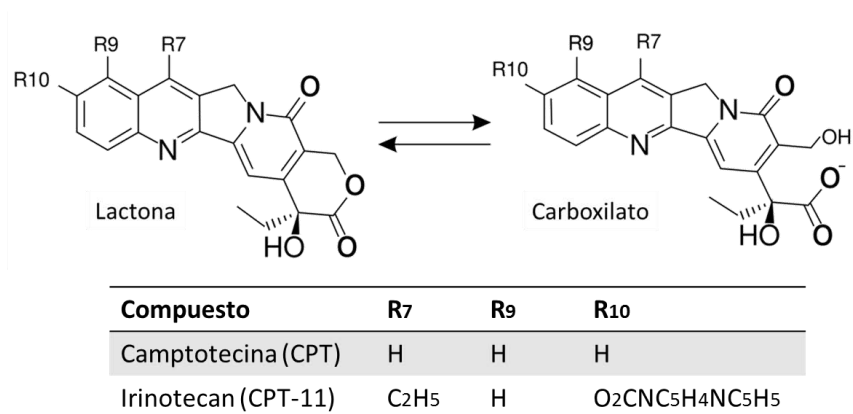
### 2.3. Monitoreo del daño al DNA

El Irinotecán es un derivado artificial de la camptotecina (figura 6). La camptotecina es un alcaloide que fue obtenido por primera vez en 1966 del árbol chino *Camptotheca acuminata*. Es conocida por su actividad anticancerígena que resulta de su habilidad para bloquear a la DNA topoisomerasa I (Sørbotten & Kruszewski 2013). También es un compuesto

fluorescente por los ciclos aromáticos que tiene, y gracias a esta propiedad, se puede detectar su ubicación en las células (Pasqua *et al.* 2004).

La electroforesis en gel de células individuales, también llamada ensayo cometa, es un método sensible, rápido y confiable para observar rupturas de cadena sencilla y doble, sitios álcali-lábiles, y otros tipos de daño en células eucarióticas individuales. Al variar las condiciones de lisis y de electroforesis, cambia la sensibilidad de la técnica. Cuando se utilizan condiciones neutras se pueden detectar rupturas de cadena doble; sin embargo, en el ensayo cometa con soluciones de pH 13, la sensibilidad permite observar sitios álcali-lábiles, así como rupturas de cadena sencilla. La sensibilidad del ensayo puede ser de hasta cientos de rupturas por célula (Rojas *et al.* 1999).

En esta tesis, se siguió el método descrito por el grupo de investigación de la Dra. Mahara Valverde (Rojas *et al.* 1999). En el ensayo, las células tratadas son suspendidas en agarosa de bajo punto de fusión, y son, posteriormente, colocadas sobre una laminilla previamente cubierta con agarosa normal. Sobre esta laminilla, las células son lisadas en una solución con detergente, y posteriormente son incubadas con el buffer de electroforesis para permitir el desenrollamiento del DNA. Después, se lleva a cabo la electroforesis que resulta en la migración de los pequeños fragmentos del DNA roto a través del campo eléctrico. Finalmente, las laminillas son neutralizadas y teñidas con un fluorocromo.



**Figura 6. La camptotecina y su derivado, el Irinotecán.** Estructura química de la camptotecina y su análogo. El Irinotecán mantiene la estructura que le da la función a la camptotecina. Modificado de Sørbotten & Kruszewski, 2013.

La principal ventaja de utilizar esta técnica es observar directamente el daño que se encuentra en el DNA, en lugar de la respuesta a éste que se analiza en otras técnicas; pues el resultado puede encontrarse afectado en las células cancerosas o como consecuencia de los tratamientos dados.

#### 2.4. La autofagia y la respuesta al daño al DNA

La respuesta de daño al DNA se encuentra relacionada con la reparación de las lesiones en el material genético, la regulación del ciclo celular y la apoptosis; adicionalmente, se cree

que la autofagia también tiene un efecto en la respuesta al daño. La autofagia se puede activar en presencia de agentes de daño al DNA, que incluyen radiación ionizante (RI), etopósido, camptotecina, tomazolomida, entre otros; pero el mecanismo por el cual se da esta activación y la función que tiene son desconocidos. Además, la supresión de la autofagia resulta en inestabilidad cromosómica, que puede resultar en activación de oncogenes y progresión tumoral (Czarny *et al.* 2015).

El grupo de Bae y Guan en el 2011 describió que la supresión de la autofagia por la eliminación de FIP200/RB1CC1 no permite la reparación del daño y aumenta la muerte celular posterior a los tratamientos con agentes genotóxicos como irradiación, etopósido y camptotecina. Además, estas células sin FIP200 son más sensibles a la camptotecina. Por otra parte, se encontró que la proteína p62/SQSTM1 contribuye al fenotipo encontrado por la ausencia de FIP200/RB1CC1, pues su silenciamiento restaura el fenotipo normal de reparación de la célula; pero la causa de esto es desconocida. La inhibición de la autofagia con el uso de la 3-Metiladenina (3-MA, un inhibidor de las cinasas de fosfatidil inositol 3, PI3K) también disminuye la eficiencia de reparación después de la irradiación (Bae & Guan 2011).

En el 2015, Gillespie y Ryan utilizaron el sistema Cre-lox para generar fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) sin la proteína ATG7, necesaria para la autofagia (MEF<sup>Atg7<sup>-/-</sup></sup>). Posteriormente trataron a las células con radiación *gamma* y analizaron su capacidad de reparación. Al hacer esto, observaron que en las células MEF<sup>Atg7<sup>-/-</sup></sup>, la reparación de rupturas de cadena doble a través de la unión de extremos no homólogos (non-homologous end joining, NHEJ) no era afectada, pero la recombinación homóloga (homologous recombination, HR) sí; y por esta razón, estas células eran más sensibles a la camptotecina. Además, las células MEF<sup>Atg7<sup>-/-</sup></sup> tenían desregulación en la actividad de la cinasa CHEK1 (Checkpoint kinase-1) que resultó en su falta de activación en respuesta al daño al DNA. El grupo de Gillespie y Ryan también encontraron que al inhibir la NHEJ en las células MEF<sup>Atg7<sup>-/-</sup></sup>, aumentaba tanto el daño genómico como la muerte celular después de someter las células a irradiación  $\gamma$ , o bien, a tratamiento con etopósido (Gillespie & Ryan 2016; Liu *et al.* 2015).

A partir de los trabajos de Bae y Guan (2011) y de Gillespie y Ryan (2016) se puede concluir que la autofagia es necesaria para la reparación adecuada del daño el DNA, pues su ausencia provocada por la eliminación de genes necesarios para ella genera mayor sensibilidad en las células y acumulación de daño. Sin embargo aún se desconoce de qué forma la autofagia permite la reparación del daño.

Se ha observado que a pesar de que hacer mutaciones nulas de genes necesarios para la autofagia como *Fip200/RB1CC1*, *Atg7* y *Atg5* provee de mucha información con respecto a las distintas funciones que tienen estos genes, no siempre es una función compartida con la autofagia, pues en muchos casos éstas tienen funciones independientes. En 2016, se describió que al realizar distintas mutaciones nulas de genes de autofagia como *Atg5*, *Atg16L1* y *Fip200/RB1CC1*, que participan en distintas fases de la formación del autofagosoma, se ve aumentada la cantidad de mitocondrias y se observa autofagia deficiente en células troncales neuronales (NSCs, neural stem cells); sin embargo, sólo la

eliminación de *Fip200/RB1CC1* afecta la renovación y la diferenciación de las NSCs a través de diferencias en la agregación de p62/SQSTM1. Esto indica que la proteína FIP200 tiene actividades externas a las que ejerce como parte de la iniciación de la vesícula autofágica (Wang *et al.* 2016).

En 2013, el grupo de investigación de Maskey reportó algo similar. En este trabajo observaron que el uso de concentraciones subletales de agentes de daño al DNA como el etopósido y el cisplatino, genera la expresión de la proteína ATG5 que forma parte de la fase de elongación del autofagosoma. Después de esta inducción de daño, ATG5 se transloca al núcleo, donde interactúa con SURVIVIN/BIRC5, una proteína inhibidora de la apoptosis y relacionada con la división celular. Consecuentemente, ocurre una catástrofe mitótica que lleva a defectos en la segregación cromosómica por errores en la alineación de los cromosomas. La inhibición de la autofagia a través de fármacos como 3-MA o el uso de un ATG5 mutante incapaz de asociarse a ATG12, no previene el efecto de ATG5, indicando así, una función independiente de la autofagia de esta proteína (Maskey *et al.* 2013). Por esta razón, se tiene que ser precavido al momento de establecer que la eliminación de un gen relacionado con la autofagia implica que la autofagia se encuentra involucrada en el proceso. Para esto es necesario estudiar la dinámica que la autofagia tiene durante la generación de daño al DNA.

A pesar de que en estos trabajos previos se ha visto que la autofagia se encuentra relacionada con el daño al DNA y es activada de forma posterior al daño, no se ha estudiado ni analizado la dinámica que tiene la autofagia en este proceso de activación. En el presente trabajo, se estudió la dinámica que tiene la autofagia al someter a las células a un estrés genotóxico causado por el Irinotecán.

### **3. Modelos de estudio**

El papel de la autofagia en los tejidos y las células normales es complejo y además, depende del tejido donde es encontrado, no sólo por los requerimientos particulares de autofagia basal sino por los substratos que requieren eliminación por la vía autofágica; sin embargo, la función de la autofagia en estas células es de sobrevivencia pues se encarga del control de calidad de proteínas y organelos, además de la degradación de múltiples componentes celulares. El mal funcionamiento de la autofagia se ha asociado a diferentes patologías como el cáncer; pero en éste se ha determinado que el rol de ésta es contexto-dependiente pues se ha reportado que tanto puede inhibir como promover la proliferación y carcinogénesis de las células cancerosas en distintos modelos. El gen *BECN1* se encuentra mutado entre el 40 y el 75% de los cánceres de próstata, mama y ovario; y las mutantes heterocigas de ratón en *Becn1* desarrollan tumores de pulmón e hígado; no obstante, mutantes en otros genes como *Atg5* o *Atg7* producen sólo tumores benignos. Por otra parte, se ha visto que las células cancerosas son más dependientes de la autofagia

que las células normales, pues les permite sobrevivir a los microambientes tóxicos generados por la carcinogénesis (White 2015).

Para tener una visión más completa de la dinámica de la autofagia al momento de inducir daño con Irinotecán, en este trabajo se estudiaron dos tipos celulares distintos: una línea epitelial tumoral de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) y fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, Mouse Embryonic Fibroblasts) obtenidos como cultivo primario de embriones de ratón CD1 de 13 días de gestación.

### 3.1. Fibroblastos embrionarios de ratón

Los fibroblastos embrionarios de ratón obtenidos de cultivos primarios se establecen y se mantienen fácilmente, proliferan velozmente, y como resultado, se puede obtener un alto número de células a partir de un solo embrión en pocos días. Estas células pueden ser utilizadas como normales o *wild type* (WT) para facilitar la comparación entre diferentes tratamientos. Han sido utilizadas para el estudio de muchos fenómenos celulares usando técnicas bioquímicas y de microscopía. Los fibroblastos son un tipo celular derivado del mesodermo que se encuentra relativamente indiferenciado, y es muy abundante en el tejido conectivo (Garfield 2010).

### 3.2. Línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549

La línea celular A549 es una línea derivada de adenocarcinoma de pulmón humano. Está formada por células epiteliales adherentes provenientes de un hombre de 58 años (ATCC *sin fecha*-a). Proviene de un tumor primario y presenta mutaciones en el gen *KRAS*, así como en *CDKN2A*, lo que le permite mantener su alta tasa de proliferación (ATCC *sin fecha*-b). Sin embargo, no hay mutaciones reportadas en la respuesta al daño al DNA o bien, en la vía autofágica (“COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer” *sin fecha*; Forbes *et al.* 2015).

<https://www.atcc.org/Products/All/CRM-CCL-185.aspx>

## IV. JUSTIFICACIÓN

---

La integridad del genoma se encuentra continuamente amenazada, pues se es común que se genere daño en el DNA de cada célula diariamente; sobre todo en células con una tasa proliferativa alta y que se encuentren más expuestas al ambiente como son las células epiteliales. Si la maquinaria de reparación del DNA no actúa correctamente, se pueden generar mutaciones que lleven potencialmente a inestabilidad genómica, y, en consecuencia, favorecer el desarrollo del cáncer. La persistencia en este tipo de lesiones puede también llevar a senescencia celular y procesos crónicos de inflamación, que resultan en la degeneración del tejido y acelera patologías asociadas con el envejecimiento (Reinhardt & Schumacher 2012).

En los tejidos y órganos de los mamíferos adultos, existen dos tipos importantes de células. Las células mitóticas que son aquellas que mantienen su capacidad de dividirse; y las células post-mitóticas que pierden la capacidad de entrar en el ciclo celular debido a su diferenciación. Un ejemplo de estas últimas son las neuronas. En los últimos años, se ha encontrado que las vías de reparación del DNA tienen un papel muy importante en la preservación de la viabilidad celular y en la función del sistema nervioso. Además, se ha visto que muchos desórdenes neurodegenerativos se encuentran relacionados a defectos en la reparación de las rupturas de cadena simple y de cadena doble; por lo que es muy importante entender cómo estas vías funcionan tanto en células mitóticas como en células post-mitóticas (Wilson III & Iyama 2013). En enfermedades como el Parkinson (Xilouri *et al.* 2016) y el Alzheimer (Yoon & Kim 2016; Zare-shahabadi *et al.* 2015) se ha observado relación entre el daño oxidante en el DNA y la acumulación de agregados proteicos como consecuencia de defectos en la autofagia; y en estas enfermedades, la autofagia es benéfica.

La autofagia no está afectada únicamente en la neurodegeneración; también se ha encontrado relacionada con procesos carcinogénicos. Entre el 40 y el 75% de los casos de cáncer esporádico de mama, ovario y próstata tienen una delección monoalélica de *BECN1*, que codifica para otra proteína necesaria para la autofagia. Y éste no es el único gen autofágico que se encuentra afectado en diversos tipos de cánceres; también destacan *UVRAG*, *ATG2b*, *ATG5* y *ATG9B* (Vessoni *et al.* 2013).

La autofagia juega un papel central en la regulación de la respuesta al daño; y cuando ésta no funciona adecuadamente, se relaciona con un aumento en la susceptibilidad de las células a agentes genotóxicos, que podría favorecer la terapia oncológica en tales casos. El estrés genotóxico que lleva a la activación de las vías de reparación del DNA, puede activar a la autofagia como una respuesta temprana adaptativa (Czarny *et al.* 2015).



Aunque estas evidencias podrían sugerir que la autofagia sea utilizada como un blanco de la terapia oncológica, es importante destacar el rol contexto-dependiente de ésta en el cáncer. Por una parte, su relación con la respuesta al daño al DNA puede ayudar a inducir apoptosis, o a reparar el daño, y de esta manera, evitar la inestabilidad genómica. Por otra parte, su función de respuesta al estrés podría favorecer la supervivencia de células en condiciones desfavorables, e inclusive durante los tratamientos contra el cáncer (Czarny *et al.* 2015).

Por este motivo, es necesario entender cómo funciona la autofagia y en qué momento de la respuesta al daño es activada, para poder desarrollar terapias contra las enfermedades asociadas a esto como son la neurodegeneración y el cáncer.

## V. HIPÓTESIS

---

La reparación de rupturas de cadena sencilla en el DNA se favorece con la activación temprana de la autofagia en respuesta al daño; esta función se pierde en células cancerosas.

## VI. OBJETIVOS

---

### Objetivo general

Identificar la dinámica de la autofagia durante la generación de rupturas de cadena sencilla en el DNA y su reparación en fibroblastos embrionarios de ratón y en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

### Objetivos particulares

1. Determinar el grado de ruptura del DNA provocado por Irinotecán a través del Ensayo Cometa o *electroforesis en gel de células individuales*.
2. Evaluar la generación y la reparación de las rupturas de cadena sencilla en el DNA provocadas por el Irinotecán en los fibroblastos embrionarios de ratón y en la línea celular A549 bajo las condiciones experimentales adecuadas.
3. Establecer la dinámica de la autofagia durante el daño y la reparación del DNA y contrastar lo encontrado entre ambos tipos celulares.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

---

Los detalles sobre la preparación y composición de medios y soluciones (nombres en negritas y cursivas) se describen en los anexos, así como las marcas y los números de catálogos de todos los materiales utilizados.

### 1. Cultivos celulares

#### 1.1. *Mantenimiento de los fibroblastos embrionarios de ratón (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) y de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549*

Para realizar el cultivo primario de MEFs, se utilizaron embriones de ratón CD1 de 13 días de gestación, aproximadamente. Ya que los fibroblastos se encontraron confluentes después de su primer pase, fueron expandidos y congelados en el segundo pase. A partir de estos viales, se realizaron los experimentos posteriores. El medio utilizado para los MEFs es **medio de cultivo completo DMEM**.

Las células A549 fueron obtenidas por donación de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Estas células fueron sembradas y tratadas con el **medio de cultivo completo DMEM F12**.

#### Congelación

1. Preparar **medio de congelación** y mantenerlo en hielo.
2. Aspirar el medio usando la bomba de vacío.
3. Lavar con **PBS**.
4. Añadir 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% a cada plato de 10 cm e incubar de 3 a 5 minutos a 37°C.
5. Agregar 4 mL de medio completo para inactivar a la tripsina y suspender las células a través de pipeteo.
6. Transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 mL y de éste, tomar 20 µL.
7. Mezclar los 20 µL de suspensión celular con 20 µL de azul de tripano 0.4%, y cuantificar la viabilidad (VI. Material y métodos. 7. Cuantificaciones y estadística. 7.1. Cuantificación de células y viabilidad por exclusión de azul de tripano) y la densidad celular en una cámara de Neubauer.
8. Mientras se realiza el conteo, centrifugar el tubo de 15 mL a 300 rcf por 5 minutos.
9. Aspirar el sobrenadante.
10. Resuspender el pellet en suficiente medio de congelación a 4°C para obtener una concentración entre 1 a 5x10<sup>6</sup> células por mL. Mezclar pipeteando con suavidad.

11. Colocar 1 mL de medio en cada vial previamente marcado y mantenerlos en hielo.
12. Guardar inmediatamente a -70°C toda la noche.
13. Transferir los viales a nitrógeno líquido para su almacenamiento.

#### Descongelación

1. Obtener el vial de las células del tanque de nitrógeno líquido.
2. Descongelar en baño María a 37°C.
3. Cuando todavía quede un poco de hielo en el vial, transferir el volumen completo a un tubo de 15 mL con 9 mL del medio adecuado para las células.
4. Mezclar y centrifugar a 300 rcf por 5 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y sembrar en una caja de 10 cm con 8 mL de medio para obtener una confluencia uniforme.

#### Mantenimiento del cultivo

1. Aspirar el medio usando la bomba de vacío.
2. Lavar con PBS.
3. Añadir el volumen de tripsina correspondiente al tamaño del plato o pozo e incubar de 3 a 5 minutos a 37°C.
4. Agregar el volumen adecuado de medio completo para inactivar a la tripsina y suspender las células a través de pipeteo.
5. Transferir las células a un tubo estéril de 15 mL y tomar 20 µL de la suspensión celular.
6. Mezclar los 20 µL de suspensión celular con 20 µL de azul de tripano al 0.4%, y cuantificar la viabilidad y la densidad celular en una cámara de Neubauer.
7. Mientras se realiza el conteo, centrifugar el tubo de 15 mL a 300 rcf por 5 minutos.
8. Aspirar el sobrenadante.
9. Resuspender el pellet en medio suficiente para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  células por mL.
10. Tomar los µL de suspensión celular para lograr la concentración final de células adecuada para el total del experimento y diluir en el volumen de medio correspondiente.

<b>Placa</b>	<b>µL de tripsina</b>	<b>mL de medio</b>	<b># células a sembrar</b>
15 cm	2000	20	$2 \times 10^6$
10 cm	1000	8	$1 \times 10^6$
6 cm	800	5	$5 \times 10^5$
3 cm	500	2	$3 \times 10^5$
6 pozos (por pozo)	500	2	$2.5 \times 10^5$
12 pozos (por pozo)	200	1	$5 \times 10^4$

## 2. Inducción de daño con Irinotecán y evaluación por Ensayo Cometa

### 2.1. Daño al DNA provocado por Irinotecán

1. Escoger el tamaño de la placa que se requiere para el análisis y se cultiva hasta llegar a la confluencia requerida.
2. Hacer una dilución 200  $\mu$ M de Irinotecán en el PBS requerido.
3. Aspirar el medio y lavar con PBS.
4. En un tubo, mezclar en proporción 1:1 el medio requerido con la solución de Irinotecán 200  $\mu$ M, para lograr una solución final 100  $\mu$ M.
5. Añadir el volumen requerido a las células que serán tratadas. Los controles fueron realizados añadiendo PBS con medio en proporción 1:1.

Análisis	Placa	Confluencia	$\mu$ L Irinotecán por mL de PBS/DMEM para una solución 200 $\mu$ M	mL de Irinotecán 200 $\mu$ M en PBS/DMEM (1:1)
Western blot	10 cm	90%	6.2268	2.5
	6 pozos	90%		1
Ensayo cometa y viabilidad	12 pozos	90%		0.5

6. Incubar a 37°C por 2 horas\*.
7. Retirar el medio y lavar con PBS.
8. Para permitir la reparación, añadir medio completo durante las horas de reparación especificadas\*.
9. Retirar el medio y lavar con PBS.
10. Añadir tripsina e incubar 5 minutos.
11. Colocar las células en tubos Eppendorf de 1.5 o 2 mL con 1 mL de medio\*\*.
12. Centrifugar a 300 rcf durante 5 minutos y aspirar el sobrenadante.
13. Resuspender pellet en 45-60  $\mu$ L de PBS.
14. Tomar 10  $\mu$ L y cuantificar la densidad y la viabilidad celular con 10  $\mu$ L de azul de tripano 0.4% en cámara de Neubauer.
15. Mantener en hielo.

\*El tiempo de incubación varía dependiendo del experimento.

\*\*A partir de este paso, sólo para ensayo cometa.

### 2.2. Ensayo cometa

#### Preparación de laminillas

1. Colocar los portaobjetos y cubreobjetos a utilizar en metanol 99.8% un día antes del ensayo.
2. Flamear los portaobjetos y cubreobjetos el día del ensayo y etiquetar según los tratamientos con lápiz o un plumón especial.
3. Fundir la **agarosa NMPA** en el microondas evitando que hierva, y dejar enfriar hasta que sea tolerable al contacto directo con la piel.
4. Vaciar la agarosa en un tubo Falcon de 50 mL.
5. En el tubo, sumergir el portaobjetos hasta el biselado; retirar del tubo y limpiar la agarosa del lado no biselado.

6. Dejar reposar horizontalmente a temperatura ambiente hasta que la agarosa no sea visible.

#### Preparación de las células

1. Calentar la **agarosa LMPA** a 70°C en baño María para fundirla, y posteriormente, mantener a 37°C.
2. En un tubo Eppendorf de 700 µL, verter 90 µL de agarosa LMPA, y añadir de 15 a 35 µL de suspensión celular dependiendo de la cantidad de células (para 50 células aproximadamente en un cuadro de la cámara de Neubauer, añadir 30 µL de la solución celular, que equivale a 15000 células por cubreobjetos).
3. Colocar la solución sobre el portaobjetos y con cuidado, poner el cubreobjetos sobre ella.
4. Dejar reposar el portaobjetos sobre una placa de aluminio sobre hielo durante dos minutos en oscuridad\*.
5. Retirar del hielo e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos.
6. Retirar el cubreobjetos deslizándolo de forma horizontal.

\*Todo el ensayo cometa se realiza en oscuridad para evitar que se genere daño al DNA debido a la exposición a la luz.

#### Lisis, electroforesis y neutralización

1. Colocar **buffer de lisis alcalina** hasta cubrir la laminilla e incubar durante 1 hora a 4°C en oscuridad (asegurar que la laminilla esté cubierta todo el tiempo).
2. Retirar el buffer de lisis y limpiar la laminilla en la parte inferior.
3. Realizar dos lavados de 15 minutos con **buffer de electroforesis alcalina** a 4°C cubriendo la laminilla con éste y dejándolo incubar en oscuridad a temperatura ambiente.
4. Correr las laminillas en la cámara de electroforesis en oscuridad durante 20 minutos con un voltaje de 25 V y un amperaje entre 230 a 300 mA. Para esto utilizar **buffer de electroforesis alcalina** a 4°C. A la cámara de electroforesis (SIGMA-ALDRICH Z33818 (SHU13)) se le coloca un volumen de 400 mL.
5. Retirar las laminillas del buffer de electroforesis, limpiarlas y realizar tres lavados con el **buffer de neutralización**; incubar cada lavado a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos.
6. Retirar el buffer de neutralización, y agregar etanol al 96% hasta cubrir las laminillas durante 5 minutos.
7. Retirar el etanol y dejar secar en charola limpia en la oscuridad.
8. Mantener las laminillas en oscuridad. Las laminillas pueden permanecer de esta manera hasta 15 días. Antes de revelarlas, lavar una vez con PBS 1X.

#### Revelado de laminillas

1. Cubrir la laminilla con aproximadamente 700 µL de la **solución de Sybr® Green** 1:10,000.
2. Incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

3. Observar al microscopio, fotografiar y cuantificar la longitud, el área y la cantidad de DNA en la cola.

### 3. SDS-PAGE / Western blot

#### 3.1. Preparación de las células

1. Después de realizar los tratamientos necesarios, lavar las células con PBS.
2. Aspirar el PBS.
3. Despegar las células de la caja. Para despegar las células se pueden utilizar dos métodos:
  - a. Tripsinización:
    - i. Añadir tripsina-EDTA al 0.25% en el volumen proporcional a la placa e incubar de 3-5 minutos a 37°C.
    - ii. Añadir medio completo en proporción 3:1 con la tripsina y despegar las células con la pipeta.
    - iii. Transferir las células a un tubo Eppendorf.
    - iv. Centrifugar 5 minutos a 300 rcf.
    - v. Retirar el PBS y mantener en hielo.
  - b. Raspando:
    - i. Añadir **PBS 1X** frío en un volumen proporcional a la caja.
    - ii. Raspar las células con la espátula hasta despegarlas.
    - iii. Transferir la suspensión celular a un tubo Eppendorf de 2 mL y centrifugar 5 minutos a 300 rcf a 4°C.
    - iv. Retirar el PBS y mantener en hielo.
4. Agregar 1 mL de PBS nuevamente y centrifugar a 300 rcf a 4°C.
5. Aspirar el PBS y añadir inmediatamente el buffer de lisis.

#### 3.2. Extracción de las proteínas

1. Preparar el buffer de lisis correspondiente y añadir **inhibidor de proteasas** e **inhibidor de fosfatasas** si se analizarán proteínas fosforiladas. Estos inhibidores se añaden en proporción 1:10 para que ambos terminen a concentración 1X.
2. Añadir entre 60-100 µL de buffer de lisis al pellet de las células, dependiendo de la cantidad de células que se puede determinar por el tamaño del pellet.
3. Dependiendo del buffer, seguir los siguientes pasos:
  - a. **Buffer de SDS (a pesar de que puede provocar la degradación de algunas proteínas y la desnaturalización de la mayoría, da una mucho mayor cantidad de proteína con un menor número de células)**
    - i. Mezclar con la pipeta para lisar las células. La solución se tornará viscosa por la liberación de DNA.
    - ii. Calentar la muestra a 95°C durante 5 minutos.
    - iii. Mezclar nuevamente con la pipeta.
    - iv. Calentar nuevamente a 95°C por 5 minutos.
    - v. Mezclar por pipeteo.

- vi. Someter la suspensión celular a sonicación durante 3 minutos, dando pulsos cada 20 segundos de potencia 3, mientras los tubos se encuentran sumergidos en agua a 4°C.
- vii. Mantener en hielo (a esta temperatura, el SDS se precipita por lo que se requerirá mantener las proteínas a temperatura ambiente para la cuantificación).

b. **Buffer de Igepal/desoxicolato de sodio**

- i. Mezclar con la pipeta.
- ii. Incubar durante 15 minutos en hielo.
- iii. Lisar a las células por sonicación durante 5 minutos, dando pulsos cada 20 segundos de potencia 1.
- iv. Centrifugar a 16.1 rcf durante 10 minutos a 4°C.
- v. Recuperar el sobrenadante y colocarlo en otro tubo.
- vi. Mantener en hielo.

4. Cuantificar la concentración de proteínas leyendo a una densidad óptica de 280 nm en el NanoDrop (detallado en el anexo). Utilizar el buffer de lisis utilizado como blanco.

### 3.3. Corrida del gel y transferencia

1. Preparar el gel necesario para las proteínas a analizar según la siguiente tabla:

	Gel concentrador (mL)	Gel separador 10% (mL)	Gel separador 15% (mL)
Agua bidestilada	2.25	4	2.3
Acrilamida 30%	0.67	3.3	5
Buffer*	1	2.5	2.5
SDS 10%	0.04	0.1	0.1
Persulfato de amonio 10%	0.04	0.1	0.1
TEMED	0.004	0.004	0.004
Proteínas a analizar	Todas	p62/SQSTM1, BECN1	LC3, $\gamma$ H2A·X

\*Gel concentrador: Tris 0.5 M (pH=6.8) // Gel separador: Tris 1.5 M (pH=8.8)

- 2. Realizar los cálculos adecuados para en tubos Eppendorf de 700  $\mu$ L, tener lo correspondiente en volumen a 30  $\mu$ g (para observar p62/SQSTM1) o 50  $\mu$ g (para observar LC3) de proteína; y que el volumen final de todas las muestras sea el mismo, completando con buffer de lisis hasta el volumen más alto de proteína.
- 3. En un tubo Eppendorf de 700  $\mu$ L, colocar el volumen de buffer de lisis adecuado para llevar cada muestra a un volumen final igual.
- 4. Agregar el **buffer de carga 5X** (95% buffer de carga, 5%  $\beta$ -mercaptoetanol), en proporción 1:4 con el volumen de proteína más alto.
- 5. Finalmente, colocar el volumen correspondiente de muestra para tener de 30  $\mu$ g a 50  $\mu$ g dependiendo de la proteína a analizar.
- 6. Incubar a 95°C durante 5 minutos.
- 7. Centrifugar rápidamente y colocar en hielo.
- 8. Cargar el gel con las muestras e incluir en uno de los carriles el marcador de peso.



9. Correr el gel a 100-120 V durante 3 horas aproximadamente para LC3 y a 150 V durante 1.5 horas aproximadamente para p62 en **buffer de corrida Tris-Glicina 1x**. La corrida se deja hasta que el frente de corrida alcance el borde del gel.
10. Cortar una membrana de fluoruro de polivileno (PVDF) del tamaño adecuado para cubrir al gel, e incubarla por al menos 1 minuto en metanol 99.8%.
11. Mantener todas las esponjas y la membrana en **buffer de transferencia Tris-Glicina 1x** a 4°C hasta el momento de ser utilizados para la transferencia.
12. Transferir las proteínas a la membrana de PVDF entre 60 a 90 mins a 400 mA en **buffer de transferencia Tris-Glicina 1x** a 4°C o toda la noche (~12 horas) a 20 mA a 4°C.
13. Teñir la membrana con **rojo de Ponceau** para comprobar que la transferencia se llevó a cabo.
14. Lavar la membrana con buffer de transferencia por 5 minutos para quitar el rojo de Ponceau y posteriormente colocar en un tubo Falcon de 50 mL con 5 mL de TBST.

#### 3.4. Incubación de la membrana con anticuerpos

1. Hacer 3 lavados de 5 minutos con 5 mL de **TBST**.
2. Bloquear la membrana durante 1 hora con 5 mL de TBST / 3-5% p/v de leche libre de grasas (blotting-grade blocker).
3. Nuevamente, hacer 3 lavados de 5 minutos con 5 mL de TBST.
4. Añadir el anticuerpo primario disuelto en 2 mL de TBST con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) o con 1-5% de leche de bloqueo (depende de las instrucciones del anticuerpo). Los anticuerpos utilizados son los siguientes:

Anticuerpo primario	Marca* y # de Catálogo	Especie	Dilución	Anticuerpo secundario
$\alpha$ SQSTM1 / p62	CS 5114S	Conejo	1:1000 en BSA	$\alpha$ -rabbit IgG-peroxidase hecho en cabra en 3-5% de leche (SIGMA A0545) 1:10000
$\alpha$ LC3 (D11) XP®	CS 3868P	Conejo	1:1000 en BSA	
$\alpha$ LC3	MBL PD014	Conejo	1:1000 en leche 1%	
$\alpha$ p44/42 MAPK (ERK ½)	CS 9102	Conejo	1:1000 en BSA	$\alpha$ -mouse IgG-peroxidase hecho en cabra en 3-5% de leche (SIGMA A3682) 1:10000
$\alpha$ BECN1	CS 3738	Conejo	1:1000 en BSA	
$\alpha$ $\gamma$ H2A·X	Ab 26350	Ratón	1:1000 en BSA	
$\alpha$ SQSTM / p62	Ab 56416	Ratón	1:1000 en BSA	
$\alpha$ TUBULIN alpha (DM1A)	CS 38735	Ratón	1:1000 en leche	

\* CS = Cell Signaling; Ab = Abcam; MBL = Medical & Biological Laboratories

5. Incubar el anticuerpo primario una hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C
6. Hacer 3 lavados de 5 minutos con 5 mL de TBST.
7. Incubar con el anticuerpo secundario indicado, durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Hacer 3 lavados de 5 minutos con 5 mL de TBST.
9. Mantener en refrigeración hasta el momento del revelado, en posición horizontal con el TBST cubriendo la membrana lo más posible. De esta manera se pueden mantener hasta dos horas.

### 3.5. Revelado de la membrana

1. Mezclar la solución de peróxido de hidrógeno (Immobilon™ Western HRP Substrate Peroxide Solution) con la solución de luminol (Immobilon™ Western HRP Substrate Luminol Reagent) en proporción 1:1 (aproximadamente 700 µL de cada una para una membrana completa).
2. Extraer la membrana del tubo Falcon y colocarla sobre un vidrio limpio.
3. Colocar la mezcla de las soluciones Immobilon sobre la membrana hasta cubrirla por completo sin que se derrame de la membrana e incubar por 1 min.
4. Retirar la membrana del vidrio y escurrir sobre papel filtro de forma vertical hasta retirar la mayor parte de la solución.
5. Colocar la membrana sobre film plástico y cubrirla con él, y posteriormente, situarla dentro del cassette de revelado en la posición requerida para revelar. Utilizar cinta adhesiva para fijarla en el cassette.
6. En oscuridad con luz roja, cortar una placa fotográfica al tamaño de la membrana de tal manera que dos de las aristas toquen dos de los bordes del cassette de revelado.
7. Colocar cuidadosamente la placa fotográfica sobre la membrana cubierta por plástico, sin moverla para evitar barridos en las bandas de proteínas, y cerrar el cassette.
8. Exponer inicialmente durante 1 minuto.
9. Obtener la placa y sumergirla en un contenedor con la **solución de revelador** hasta que las bandas sean visibles (1 minuto aproximadamente).
10. Enjuagar la placa fotográfica en agua bidestilada en otro contenedor.
11. Finalmente, sumergirla en un tercer contenedor con la **solución de fijación** hasta que la placa se torne transparente (1 minuto aproximadamente).
12. Enjuagar nuevamente en el agua bidestilada.
13. A partir de las bandas obtenidas en la primera placa expuesta, aumentar o disminuir el tiempo de exposición a la membrana hasta obtener la densidad de banda buscada.
14. Permitir que las placas se sequen a temperatura ambiente, y ya que se encuentren un poco secas, marcar sobre ellas el marcador de peso de la membrana dentro del cassette de revelado.
15. Etiquetar cada placa con el tipo de células, la fecha del experimento de las muestras corridas, el tiempo de la exposición a la membrana, los anticuerpos usados, y con el nombre de cada uno de los tratamientos.

## 4. Inmunofluorescencia

### 4.1. Preparación de los cubreobjetos

16. Lavar con **ácido acético al 30%** durante 15 minutos en agitación.
17. Recuperar el ácido acético, y lavar los cubreobjetos con **etanol al 70%** durante 15 minutos en agitación.
18. Lavar en **etanol al 85%** durante 15 minutos en agitación.
19. Lavar en **etanol al 90%** durante 15 minutos en agitación.

20. Lavar en etanol anhidro durante 15 minutos en agitación.
21. Colocar los cubreobjetos en una caja de Petri de plástico de 3.5 cm, mantenerlos sumergidos en etanol anhidro y sellarlos con Parafilm.
22. En esterilidad, tomar los cubreobjetos con pinzas, flamearlos en el mechero, y colocarlos en placas de 12 pozos.
23. Si las células son adherentes, sembrar células en la concentración adecuada para conseguir una confluencia de 90% en el tiempo deseado.

#### 4.2. Fijación

1. Retirar los cubreobjetos y colocarlos sobre un vidrio cubierto con parafilm, dentro de una cámara húmeda.
2. Adicionar 150  $\mu$ L de PBS 1X a 4°C (NO dejar secar los cubreobjetos).
3. Inclinar el vidrio y retirar con la pipeta el exceso de PBS.
4. Adicionar a cada cubreobjetos 130  $\mu$ L de **paraformaldehído (PFA) 4%** a temperatura ambiente.
5. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Retirar PFA y lavar con PBS 1X 3 veces (continuar a incubación, o refrigerar hasta el día siguiente).
7. Colocar dentro de la caja de cultivo y adicionar PBS hasta cubrir los cubreobjetos.
8. Refrigerar a 4°C.

#### 4.3. Incubación con anticuerpos

1. Retirar el PBS.
2. Permeabilizar con 100  $\mu$ L de **PBS/Tritón 0.5% v/v** durante 3 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar dos veces con PBS 1X.
4. Bloquear durante 1 hora con **PBS/BSA 5% p/v**.
5. Agregar 150  $\mu$ L de anticuerpo primario disuelto en **PBS/BSA 2% p/v** a cada cubreobjetos:

Anticuerpo primario	Marca y # de Catálogo	Especie	Concentración
$\alpha$ LC3	MBL PD014	Conejo	1:500 en PBS/BSA 2%
$\alpha$ $\gamma$ H2A-X	Ab 26350	Ratón	1:500 en PBS/BSA 2%

\* Ab = Abcam; MBL = Medical & Biological Laboratories

6. Incubar toda la noche en cámara húmeda a 4°C.
7. Lavar con 100  $\mu$ L de PBS 1x tres veces.
8. Agregar 150  $\mu$ L de anticuerpo secundario disuelto en PBS/BSA 2% p/v:

Anticuerpo secundario	Marca y # de Catálogo	Especie	Concentración
$\alpha$ Alexa fluor 594 goat	MPbLT A11032	Anti-ratón IgG (H+L)	1:500 en PBS/BSA 2%
$\alpha$ Alexa fluor 488 goat	MPbLT A11034	Anti-conejo IgG (H+L)	1:500 en PBS/BSA 2%

\* MPbLT = Molecular Probes by LifeTechnologies

9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Lavar con PBS.

11. Incubar con 100 mL de **DAPI** (1 µg/mL) durante 2 minutos.
12. Lavar con PBS 2 veces.
13. Guardar a 4°C en PBS en la placa de cultivo.

#### 4.4. Montaje de laminillas

1. Observar cubreobjetos al microscopio y si se ven bien, montar.
2. Agregar una gota de medio de montaje VectaShield® al portaobjetos.
3. Secar el PBS del cubreobjetos; y dejarlo caer lentamente del lado de las células sobre el VectaShield®. Tener cuidado de no formar burbujas.
4. Si se forman burbujas, golpear el cubre cuidadosamente para sacarlas.
5. Sellar las orillas con barniz transparente para uñas.
6. Esperar que el barniz seque.
7. Limpiar el cubreobjetos superficialmente con Kimwipes® y etanol 70%.
8. Almacenar en oscuridad a 4°C.
9. Observar en microscopio de fluorescencia.

## 5. Manipulación de la autofagia

### 5.1. Inhibición del flujo autofágico por cloroquina

Una hora previa a los tratamientos a observar, agregar 100 µM de **cloroquina** (el stock se encuentra a 100 mM, y se encuentra diluida en agua Milli-Q). Para los controles, añadir la misma cantidad de agua Milli-Q estéril.

### 5.2. Inducción de la autofagia por trehalosa

Dos horas previas al tratamiento, añadir 100 mM de **trehalosa** (el stock se encuentra a 1 M, y se encuentra diluida en PBS). Para los controles, añadir la misma cantidad de PBS estéril.

## 6. Adquisición de imágenes

6.1. *Microscopio*: Nikon Eclipse Ti

6.2. *Lámpara*: Nikon Intensilight C-HGFI

6.3. *Cámara*: Nikon DS-Fi

6.4. *Software*: NIS-Elements Basic Research. Advanced Solutions for your Imaging World v3.10, SP3(Build 634), LO

#### 6.4.1. Ensayo cometa

Intensidad de la lámpara: nivel 4

Exposición: 800 ms

Ganancia: 6.80x

Contraste: Enhanced

#### 6.4.2. Inmunofluorescencia

Intensidad de la lámpara: nivel 4

Exposición: 800 ms

Ganancia: 6.80x  
Contraste: Enhanced

## 7. Cuantificaciones y estadística

### 7.1. Cuantificación de células y viabilidad por exclusión de azul de tripano

Se contaron las células vivas (incoloras) y las células muertas (teñidas de azul de tripano) en al menos dos cuadros de la cámara de Neubauer. Tomando en cuenta el volumen de cada cuadro de la cámara (0.1  $\mu$ L: multiplicación por 10,000 para obtener mL), la dilución 1:1 con azul de tripano (duplicación) y el volumen de la suspensión celular, se utilizó la siguiente fórmula para calcular el número total de células, así como el número de células vivas y muertas:

$$\# \text{ de células} = \left( \frac{\# \text{ de células contadas}}{\# \text{ de cuadros contados}} \right) \times (2) \times (10,000) \times (\text{vol. en mL de la suspensión celular})$$

Para la viabilidad celular de los tratamientos con Irinotecán, se cuantificaron las células en cada uno de los sobrenadantes y lavados dados durante los tratamientos de dosis subletales, así como de las suspensiones celulares finales, y de ahí se obtuvieron los porcentajes de viabilidad.

### 7.2. Ensayo cometa

Los nucleoides observados por ensayo cometa fueron analizados a través del programa del microscopio NIS-Elements Basic Research v3.10, SP3(Build 634), y a través del software libre OpenComet (v1.3, <http://www.cometbio.org/>). Para utilizar este programa fue necesario utilizar el software ImageJ (NIH v1.47v, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Se contaron un mínimo de 50 cometas por tratamiento.

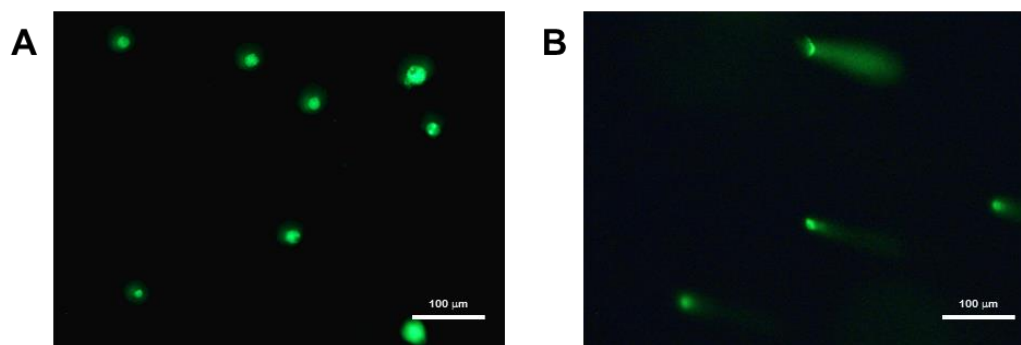
### 7.3. Estadística

Para analizar los datos del ensayo cometa se realizaron ANOVAs de una vía, y se utilizó el estadístico de Kruskal-Wallis con un valor  $P < 0.0001$ . Posteriormente, se realizaron test de comparaciones múltiples de Dunn, con un valor de significancia de  $P < 0.05$  para comparar entre los grupos, usando GraphPad Prism (v. 5.0b).

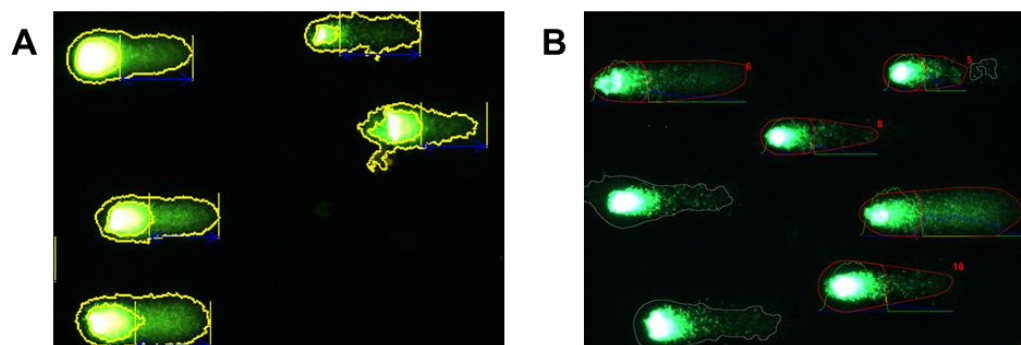
## VIII. RESULTADOS

### 1. Estandarización del Ensayo Cometa para cuantificar rupturas de DNA.

Para observar directamente las rupturas de cadena sencilla en el DNA, se decidió implementar el *ensayo cometa*, también llamado *electroforesis en gel de células individuales* (SCGE, *Single Cell Gell Electrophoresis*). Para esto, se utilizó y modificó la técnica reportada previamente por el grupo de la Dra. Mahara Valverde (Rojas *et al.* 1999) y se usó el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como agente de daño al DNA en células MEF (Figura 7).



**Figura 7. Observación de cometas por la exposición a  $H_2O_2$  10 mM.** Para estandarizar el ensayo cometa se utilizó peróxido de hidrógeno 10 mM en fibroblastos embrionarios de ratón. A. MEF control. B. MEF tratados con 10 minutos de  $H_2O_2$ .



**Figura 8. Cuantificación del área y porcentaje del DNA dañado por Irinotecán 100  $\mu$ M en la cola de los cometas de MEFs medido por NIS Elements (A) y OpenComet (B).**

Después de lograr la observación de los cometas provocados por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 7B) y de obtener controles en los que no se observara cola de cometa (Figura 7A), se procedió a buscar un método por el cual cuantificar el nivel de daño en las células (Figura 8). Para esto se recurrió al software NIS-Elements Basic Research (Material y métodos: p. 36, Figura 8A) y al software libre especializado en la medición de cometas llamado OpenComet (Material y métodos, p. 36, Figura 8B). El primero fue utilizado para la medición de experimentos en los que los cometas variaran en longitud y área visiblemente entre ellos; mientras que el segundo se utilizó para los experimentos (curvas de reparación) cuyos cometas mantenían en muchas ocasiones la misma longitud y área entre ellos, pero variaban en la intensidad de fluorescencia encontrada en las colas. Una vez que se logró cuantificar el daño al DNA en la cola de los cometas, se procedió a utilizar el Irinotecán como agente de daño.

## **2. Inducción de daño al DNA con una dosis subletal de Irinotecán.**

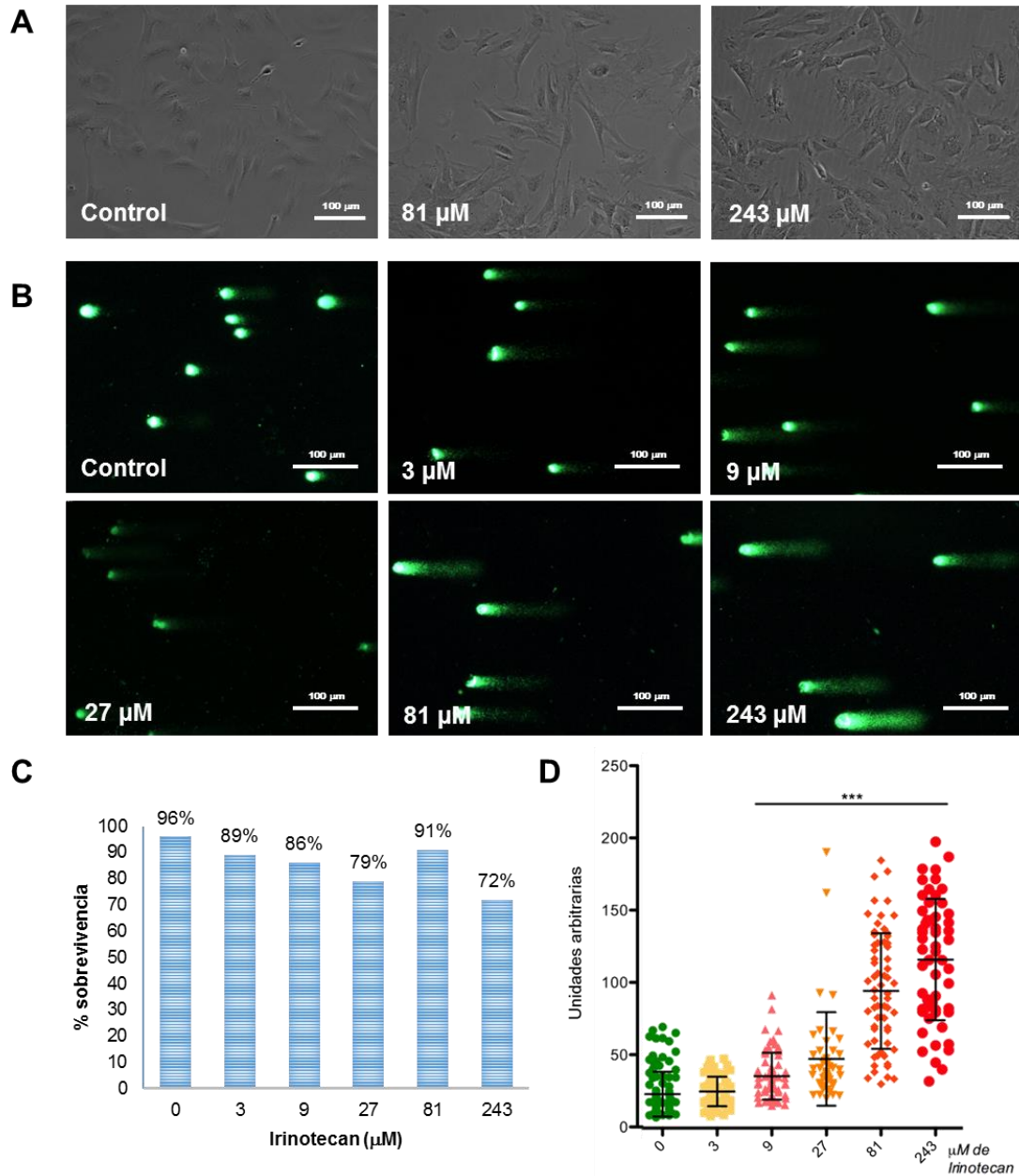
### *2.1. Fibroblastos embrionarios de ratón*

Para inducir rupturas de cadena sencilla en el DNA de los MEFs, se utilizó el Irinotecán. Para decidir qué dosis utilizar que permitiera observar tanto el daño como su reparación, se realizó una curva dosis respuesta (Figura 9). Se observaron las células bajo el microscopio para constatar que no hubiera cambios en la morfología (Figura 9A) ni que se afectara la viabilidad que se determinó por exclusión de azul de tripano (figura 9C). Además, a través del ensayo cometa, se observó el daño al DNA de las células obtenido por los distintos tratamientos (Figura 9B), y se cuantificó el área de la cola por medio del programa NIS Elements, para determinar la concentración que causara el mayor daño al DNA sin afectar la viabilidad (Figura 9D). Se determinó que la concentración de Irinotecán necesaria para ocasionar suficiente daño para ser observado en el ensayo cometa, sin afectar la viabilidad celular fue de 100  $\mu$ M por un periodo de 2 horas.

### *2.2. Línea celular A549*

En la línea celular A549 se estableció nuevamente una curva dosis respuesta. Para facilitar la comparación entre ambos tipos celulares, se utilizó la dosis subletal de los MEFs (100  $\mu$ M) y con ésta, se buscó el tiempo de exposición adecuado para dañar el DNA de las células sin afectar la sobrevivencia (Figura 10). Se tomaron micrografías de las células en contraste de fases para comprobar que no tuvieran cambios en su morfología (Figura 10A) ni que se afectara la viabilidad, que también fue medida a través de exclusión de azul de tripano (Figura 10C). Se realizó una curva exponiendo las células A549 a 100  $\mu$ M de Irinotecán durante los tiempos indicados (Figura 10B). En esta curva, se midió el área de la cola de los cometas y se graficó, y a partir de esta gráfica se determinó que el tiempo de exposición necesario para ocasionar un daño observable con una menor variabilidad en el área fue de dos horas, siendo así el mismo tiempo utilizado que en las MEFs.

### Fibroblastos embrionarios de ratón

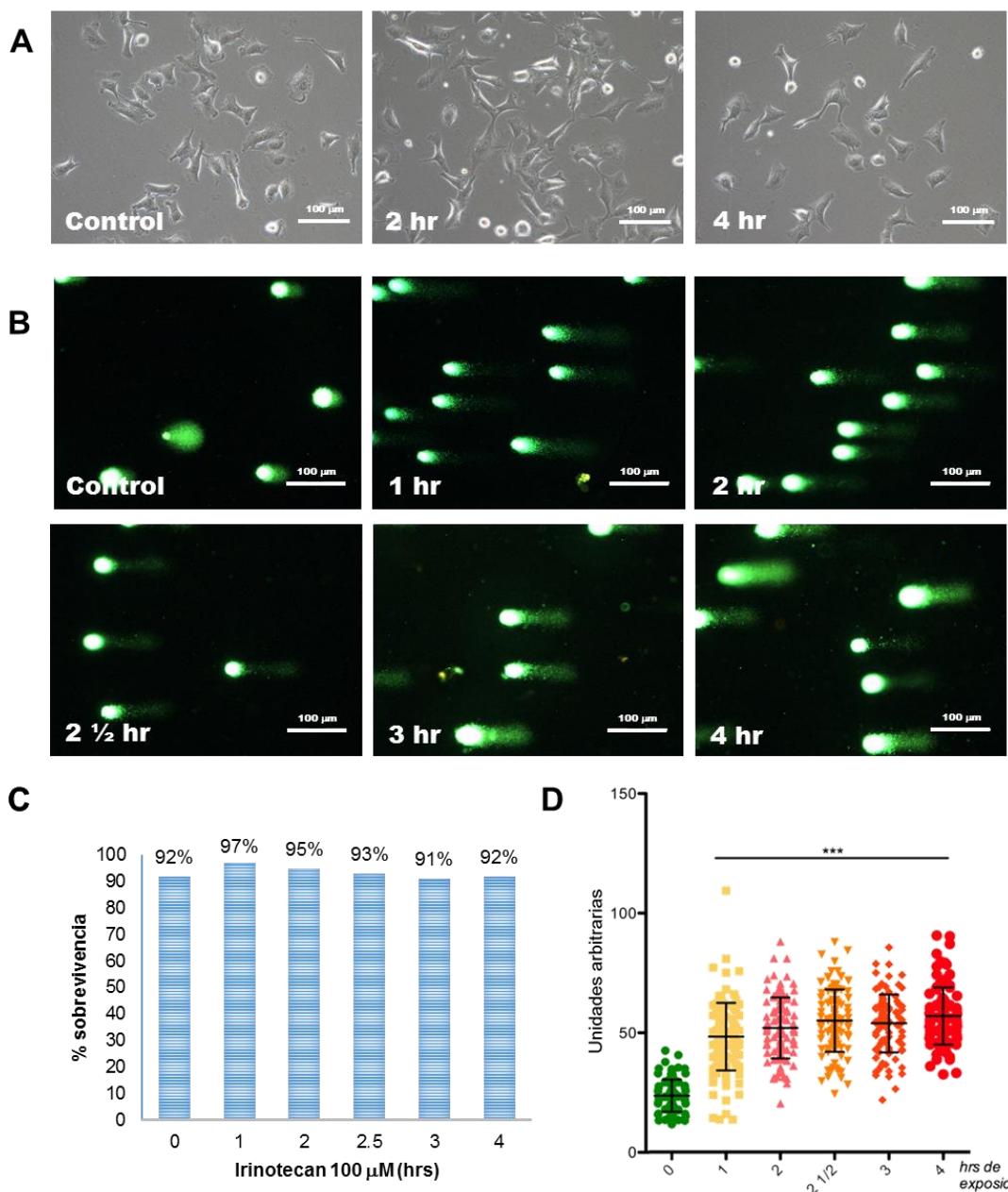


**Figura 9. La dosis subletal de Irinotecán para los MEFs es de 100 μM durante 2 horas.**

A) Micrografía de contraste de fases que muestra la morfología de las células tratadas con las dosis indicadas de Irinotecán. B) Micrografía de fluorescencia que muestra la migración del DNA roto (en forma de cometas) observados por el Ensayo Cometa alcalino de fibroblastos embrionarios de ratón tratados con las dosis indicadas de Irinotecán durante 2 horas de exposición. C) La viabilidad de los MEF se determinó por exclusión de azul de tripano después de ser tratadas o no con las concentraciones indicadas de Irinotecán por dos horas. Las células se mantuvieron viables con la dosis de Irinotecan que daña al DNA. D) Cuantificación del área de la cola del cometa con el programa NIS-Elements. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Graph Prism. Se realizó una Anova con el estadístico de Kruskal-Wallis, y después se realizó un test comparativo múltiple de Dunn para comparar los distintos tratamientos, y se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de daño y los demás tratamientos con una  $P < 0.0001$ .

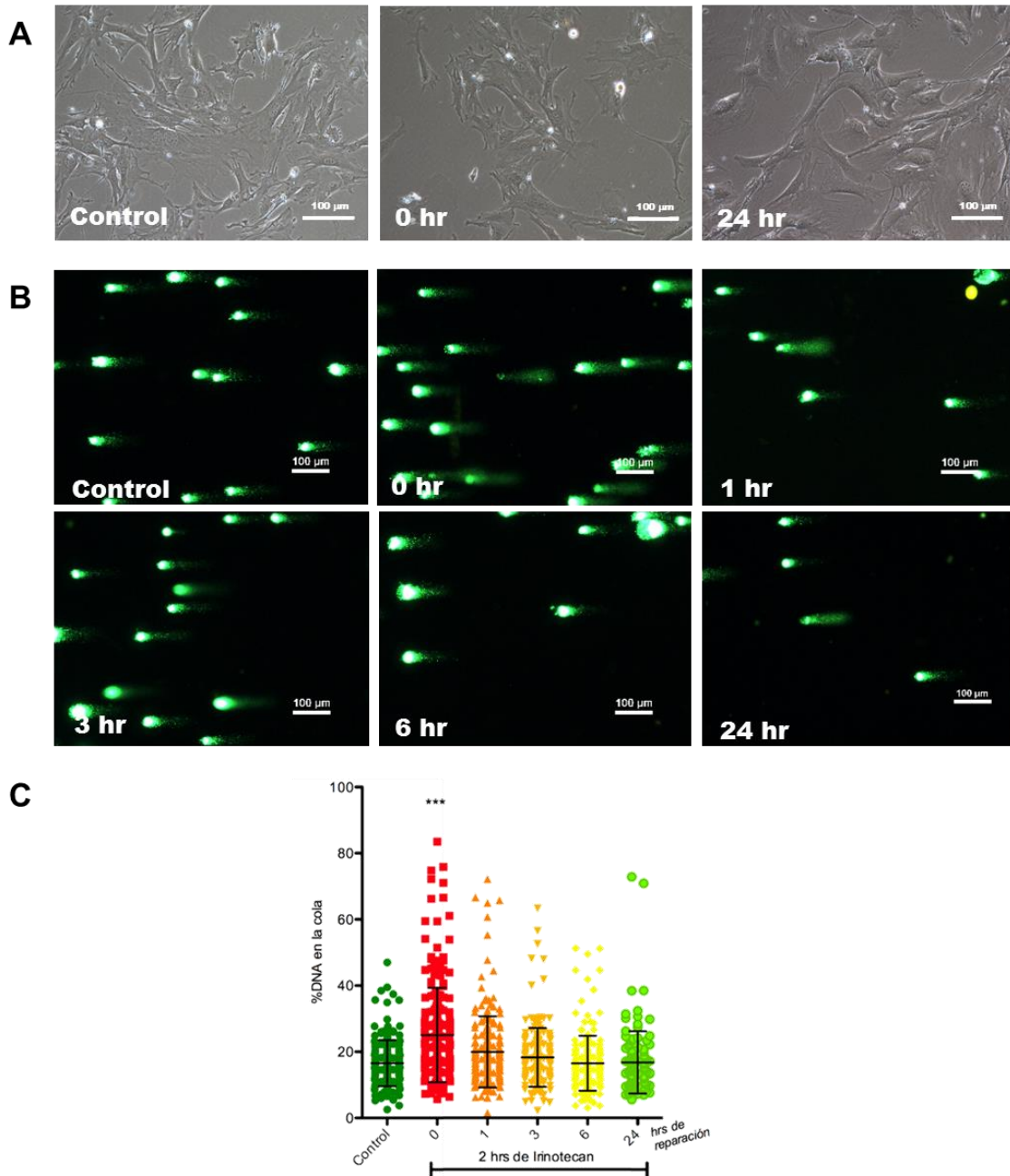


### Línea celular A549



**Figura 10. El tiempo subletal de exposición a 100  $\mu$ M de Irinotecan de la línea celular A549 es de 2 horas.** A) Micrografías en contraste de fases que muestra la morfología de las células en los tiempos indicados de exposición a Irinotecán de las células A549. B) Micrografías de fluorescencia de los cometas formados por la migración del DNA dañado por los tiempos de exposición a Irinotecán indicados observado por el Ensayo Cometa alcalino. C) La viabilidad de las A549 se mantiene a través de los tiempos de exposición indicados. Ésta fue determinada por exclusión de azul de tripano después de ser tratadas durante distintos tiempos con Irinotecán. D) Cuantificación del área de la cola del cometa con el programa NIS-Elements. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Graph Prism. Se realizó una Anova con el estadístico de Kruskal-Wallis, y después se realizó un test comparativo múltiple de Dunn para comparar los distintos tratamientos, y se observaron diferencias significativas entre el control y los diferentes tiempos de exposición al Irinotecan con una  $P < 0.0001$ .

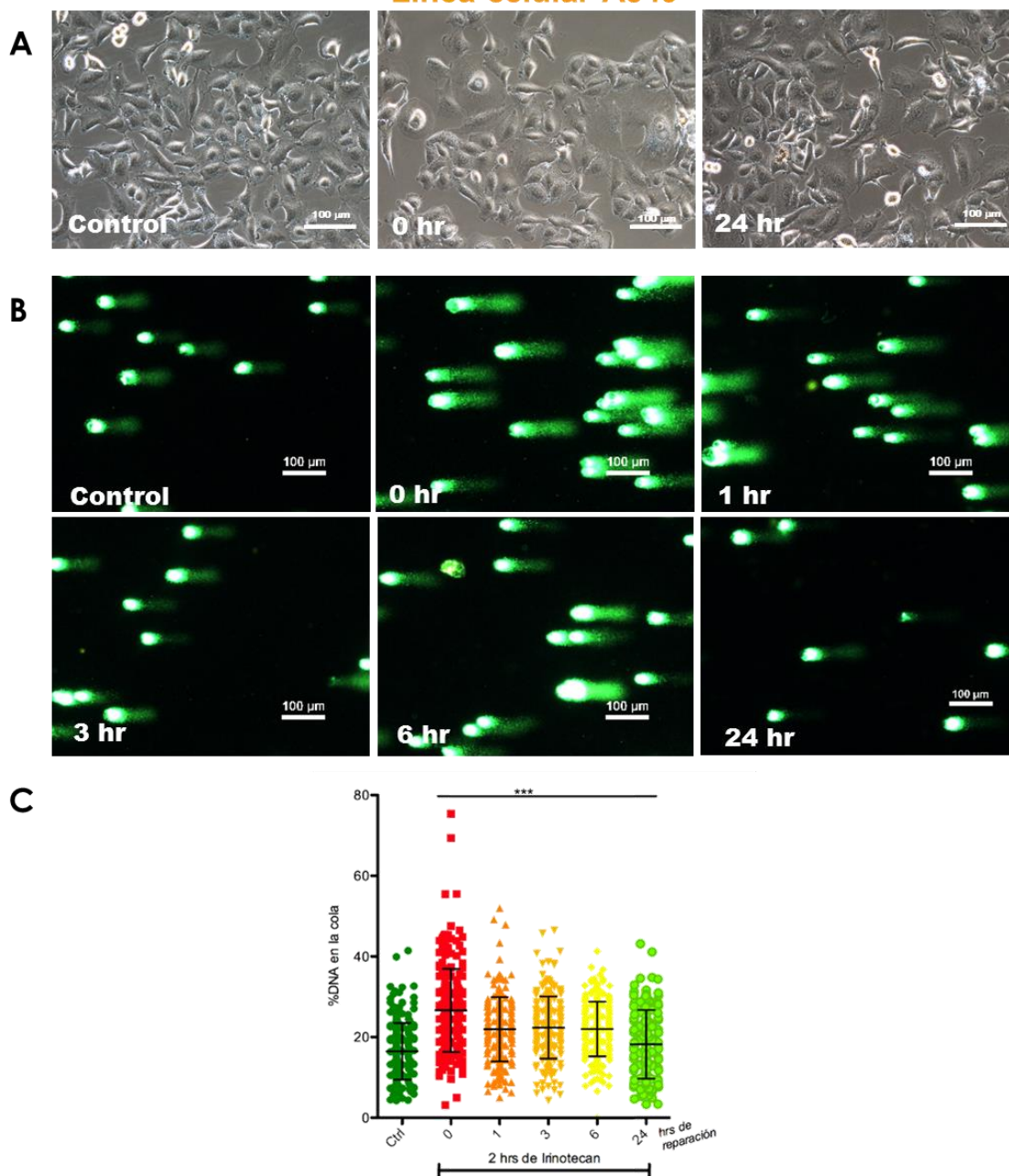
## Fibroblastos embrionarios de ratón



**Figura 11. En las MEFs, el DNA se repara desde las 6 horas después de retirar el Irinotecán.**

A) Micrografía de contraste de fases de las células sin tratar, después de 2 horas de daño con Irinotecán 100 µM (tiempo 0 hr de reparación) y después de la reparación de 24 horas (24 hr). B) Micrografías de fluorescencia de los cometas que muestran la reparación al daño al DNA que llevan a cabo los MEFs durante los tiempos indicados. C) Cuantificación del porcentaje de DNA en la cola obtenida con el programa OpenComet. Se realizó una n=3, y todos los datos obtenidos fueron analizados en el programa Graph Prism. Se realizó una Anova con el estadístico de Kruskal-Wallis, y después se realizó un test comparativo múltiple de Dunn para comparar los distintos tratamientos, y se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de daño y los demás tratamientos con una  $P < 0.0001$ .

## Línea celular A549



**Figura 12. En la línea celular A549, el DNA también se repara desde las 6 horas después de retirar el Irinotecán.** A) Micrografía de contraste de fases en las células sin tratamiento después de dos horas de daño con Irinotecán 100 µM (tiempo de 0 hr de reparación) y sometidas a reparación durante 24 horas (24 hr). B) Micrografías de fluorescencia de los cometas de las horas indicadas de reparación a la que fueron expuestas las células tratadas o no, con Irinotecan 100 µM durante 2 horas. C) Cuantificación del porcentaje de DNA en la cola obtenida con el programa OpenComet. Se realizó una  $n=3$ , y todos los datos obtenidos fueron analizados en el programa Graph Prism. Se realizó una Anova con el estadístico de Kruskal-Wallis, y después se realizó un test comparativo múltiple de Dunn para comparar los distintos tratamientos, y se observaron diferencias significativas entre el tratamiento de daño y los demás tratamientos con una  $P<0.0001$ .

### 3. La reparación del daño al DNA causado por Irinotecán subletal se da en 6 horas en ambos tipos celulares.

Posteriormente, se prosiguió a identificar el tiempo que ambos tipos celulares necesitan para reparar el daño provocado por la exposición al Irinotecán 100  $\mu$ M durante dos horas. Para esto se retiró el Irinotecán, se permitió la reparación durante distintos tiempos y se corroboró la viabilidad celular de MEFs (Figura 11A) y de las A549 (Figura 12A). Posteriormente, se tomaron micrográficas de los cometas observados durante los distintos tiempos de reparación en ambos tipos celulares (MEFs: Figura 11B, A549: Figura 12B) y se cuantificó el porcentaje de DNA en la cola de los cometas tanto en las MEFs (Figura 11C) como en las A549 (Figura 12C). Se observó que en ambos tipos celulares se requirió de las mismas 6 horas de incubación sin Irinotecán para que el DNA previamente dañado se reparara mostrando una integridad comparable a las células sin tratar.

Es importante destacar que cuando se permite que las células se reparen durante 24 horas, tanto en las MEF como en las A549, la población se encuentra con menos daño genético que en el control, por lo que este nivel de daño es consecuencia de la manipulación de las células.

### 4. En MEFs, la autofagia se activó durante la inducción del daño y se mantuvo activa durante la reparación del DNA; mientras que en las células A549, la autofagia se activa moderadamente sólo durante el daño.

Se procedió a analizar el estado de la autofagia durante la reparación al daño del DNA, pues se ha encontrado asociación entre estos procesos celulares y entender la dinámica que presenta la autofagia durante la reparación del DNA es fundamental para entender su papel. Con este objetivo, se colectaron células de ambos tipos celulares a distintos tiempos de exposición a Irinotecán y de reparación (Figura 13).

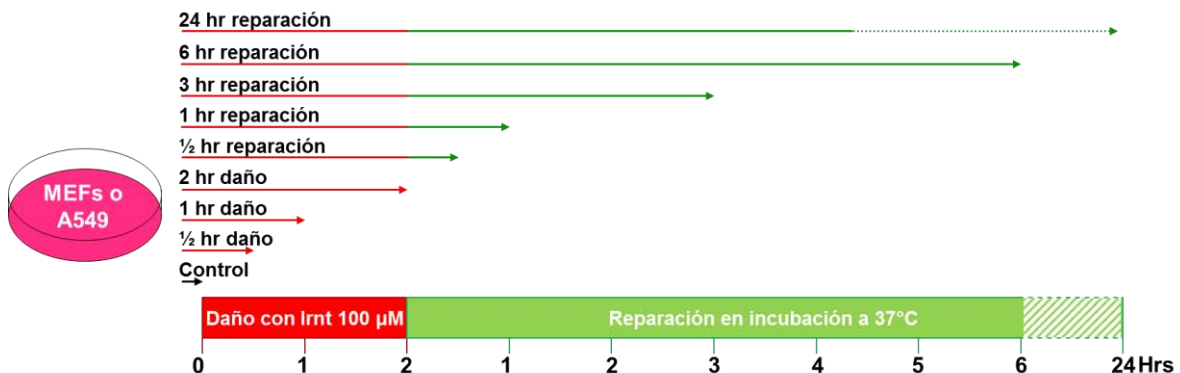
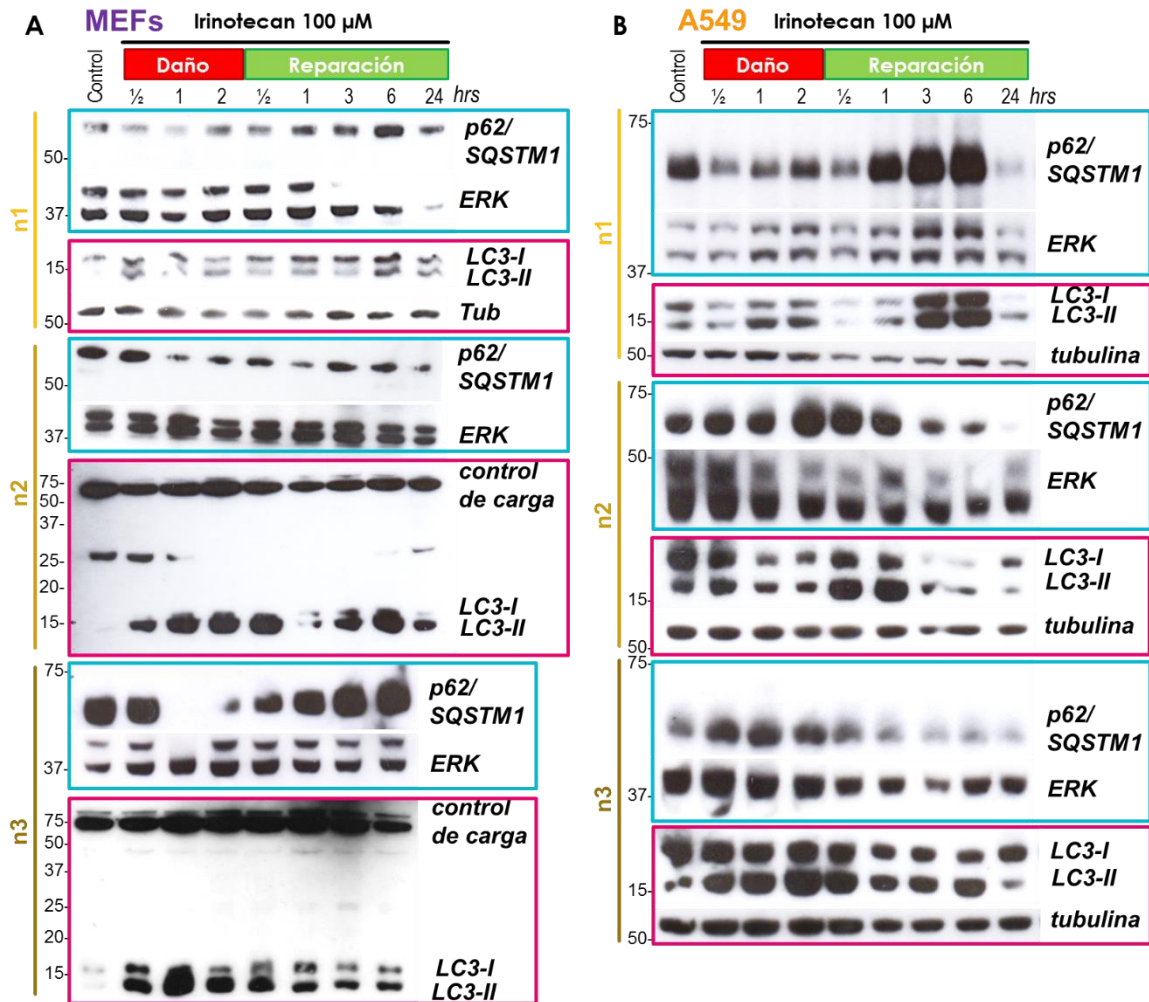


Figura 13. Diseño experimental para la obtención de la dinámica autofágica durante el daño al DNA y la reparación de éste.

Se obtuvieron los lisados de proteína de los distintos tiempos y se buscaron proteínas relacionadas con la autofagia a través de SDS/PAGE y Western blot tanto en las MEFs como en las A549.



**Figura 14. La autofagia es activada al momento de inducir daño; en MEFs (A) se mantiene activa a lo largo de la reparación mientras que en A549 (B), regresa a su estado basal.** Western blot contra proteínas LC3 (recuadros rosas) y p62/SQSTM1 (recuadros azules) con sus respectivos controles de carga, ya sea tubulina (Tub, en los experimentos de A549 y en la n1 de MEFs) o ERK. En los experimentos n2 y n3 en MEFs, se muestra una banda irrelevante como referencia de carga. Se muestran las 3 repeticiones realizadas del experimento en cada tipo celular, en las que se observan la activación de la autofagia por el aumento de LC3-II y la disminución de p62 después de la inducción del daño. A) MEFs: La autofagia basal (control) es muy baja, y cuando se ocasiona daño al DNA, la autofagia se activa (LC3 aumenta y p62 disminuye). Esta activación de autofagia continúa activa hasta las 24 horas de reparación del DNA. B) A549: La autofagia basal de estas células es muy alta, y la activación de autofagia como consecuencia del daño al DNA es moderada. La activación autofágica sólo se da durante el daño, pero para la reparación, la autofagia regresa a su estado basal.

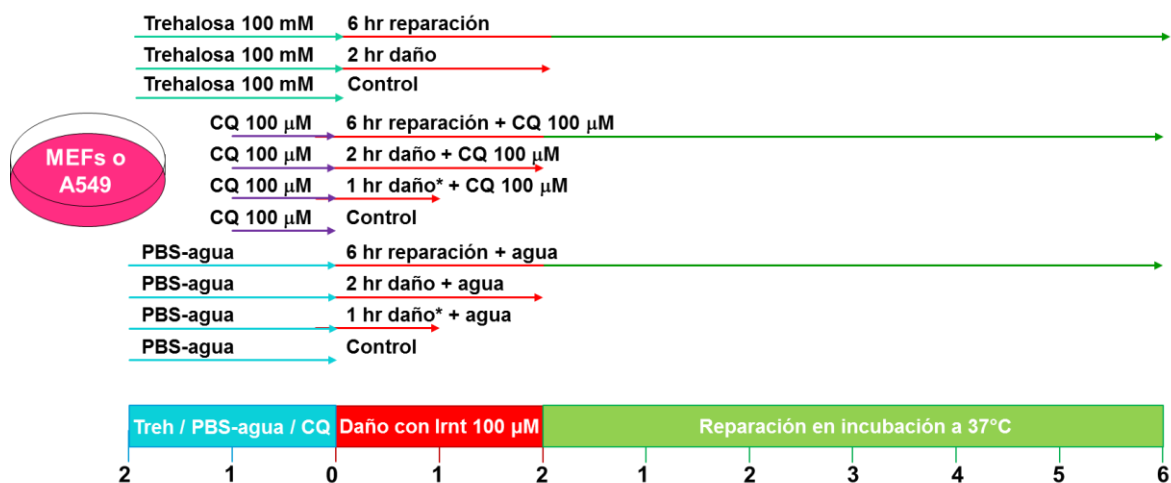
En el caso de los fibroblastos embrionarios de ratón, se observó un aumento en la cantidad de LC3-I y LC3-II después de media hora de exposición al agente de daño, la cual se mantuvo a lo largo del proceso de reparación en todas las repeticiones llevadas a cabo. Esto indica que la autofagia se activó. Por otra parte, la proteína p62/SQSTM1 disminuye

en la primera hora de daño, lo que implica que el flujo de la autofagia continúa y por lo tanto, lleva a la degradación del cargo. Esta proteína aumenta posteriormente, posiblemente por expresión *de novo* de esta proteína (Figura 14A). Se presentan los resultados de tres experimentos independientes.

Las células A549, por el contrario, sólo presentaron activación de la autofagia durante los tratamientos de daño, pero en la reparación la autofagia ya no se encuentra activa. Durante el daño, los niveles de LC3-II aumentan moderadamente a comparación de los observados en las MEFs, y los niveles de p62/SQSTM1 disminuyen ligeramente durante los primeros tiempos de daño; sin embargo, dado que estas células tienen una autofagia basal mayor, el nivel de activación observado en estas células es mucho más bajo y en un periodo más reducido que en las MEFs. En la reparación, la autofagia activada de forma moderada durante el daño, regresa al estado basal (Figura 14B).

## 5. El flujo autofágico no se altera durante la exposición al daño y la reparación de éste.

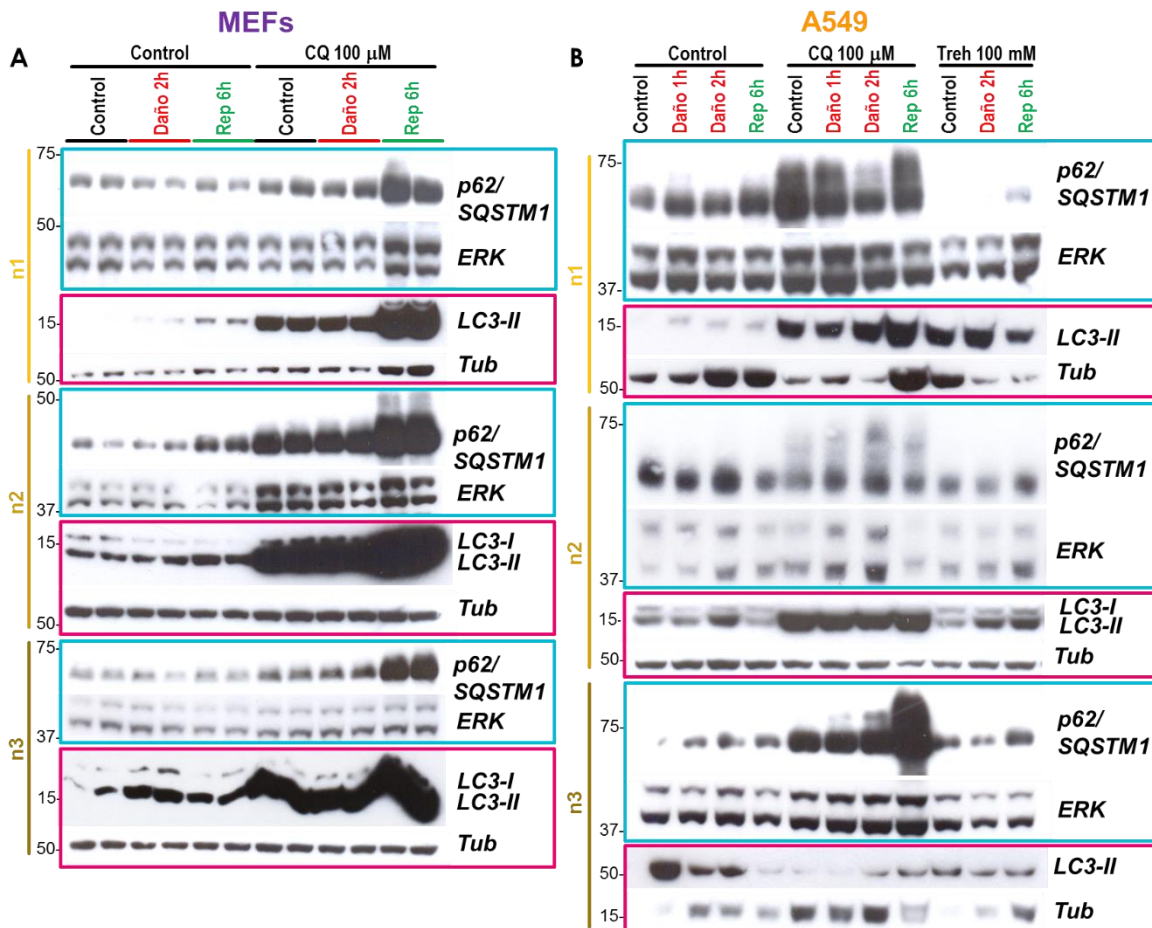
Para confirmar que existiera flujo autofágico y que el aumento de LC3 no se diera únicamente por bloqueo de la degradación del contenido del autolisosoma, se comparó la degradación de LC3 y de p62/SQSTM1 en ausencia o presencia de cloroquina (compuesto que inhibe la actividad hidrolítica de las enzimas lisosomales). Se obtuvieron extractos de proteína de células sin tratar, con daño subletal por 2 horas y después de haber sido reparado durante 6 horas; y en el caso de p62/SQSTM1 en los MEFs, se añadió el tiempo de daño 1 hora, pues es el tiempo en el que p62/SQSTM1 disminuye (figura 15).



**Figura 15. Diseño experimental para la manipulación de la autofagia a través de los distintos tiempos de daño y de reparación.** Las muestras fueron tomadas en los tiempos que indican las flechas. Únicamente en las MEFs se realizaron los experimentos que consistían en una hora de daño (\*) para observar a p62/SQSTM1 que desaparecía en este tratamiento.

En los fibroblastos embrionarios de ratón, se observó que la cloroquina aumenta la cantidad de LC3 y de p62/SQSTM1, indicando que el flujo autofágico no se encuentra bloqueado. Además, en los tratamientos con trehalosa se observó el aumento de LC3 y la disminución de p62/SQSTM1 acorde con una activación funcional de la autofagia (figura 16A).

En las células A549 tratadas con cloroquina, también se observó aumento de p62/SQSTM1 y de LC3, que indica que el flujo de la autofagia es continuo y funcional. Por otra parte, a pesar de tener mayor actividad basal, la estimulación de las células con trehalosa genera aún más autofagia medida por aumento en LC3 y disminución en p62/SQSTM1 (figura 16B). En ambos tipos celulares, se presentan los resultados de tres experimentos independientes, pues se observó variabilidad entre ellos.



**Figura 16. El flujo autofágico no se encuentra detenido al exponer a las células a Irinotecán ni en MEFs ni en A549.** Western blot contra las proteínas LC3 (recuadros rosas) y p62/SQSTM1 (recuadros azules) con sus respectivos controles de carga, ya sea tubulina (Tub) o ERK. Se muestran las 3 repeticiones realizadas del experimento en cada tipo celular, en las que se observa el flujo autofágico continuo y, por lo tanto, la existencia de autofagia funcional por la acumulación de LC3 y p62 en el tratamiento con cloroquina (CQ) y el aumento de LC3-II y la disminución de p62 en el tratamiento con trehalosa (Treh) en ambos tipos celulares: MEFs (A) y A549 (B).

## 6. La activación de la autofagia disminuye el daño al DNA.

Otro método de confirmación de la activación de la autofagia es a través la distribución intracelular de la proteína LC3 por inmunofluorescencia, ya que cuando se recluta en los autofagosomas el patrón cambia de difuso a punteado. Para realizar la inmunofluorescencia, se siguió el diseño experimental presentado en la figura 17.

Los puntos de LC3 se observan claramente en la figura 18A, pues en el control no se observaron más que unos cuantos puntos y la mayoría de la proteína LC3 detectada se encontraba difusa; sin embargo, al inducir daño con Irinotecán, se observaban puntos de LC3 alrededor del núcleo, que es donde se suelen acumular los autofagosomas. Esta inducción se mantiene activa durante la reparación, y de esta forma se confirma la presencia de autofagia.

Si efectivamente la autofagia contribuye a la reparación del DNA, al aumentar su activación, se esperaba observar menor daño al DNA. Para comprobar esta hipótesis, se utilizó a la trehalosa como inductor de autofagia. Se comparó el daño al DNA causado por el Irinotecán en presencia o ausencia de trehalosa, por medio de la respuesta de la célula al inducir la fosforilación de la variante de histona  $\gamma$ H2A.X, que se recluta en los sitios de ruptura del DNA. De manera interesante, se observó menor acumulación de  $\gamma$ H2A.X a las dos horas de daño, si se compara con la respuesta observada sin trehalosa. Sin embargo, al añadir trehalosa e Irinotecán no se observó un aumento mayor de autofagosomas, aunque sí se aprecia un aumento en la abundancia de LC3 (Figura 18B).

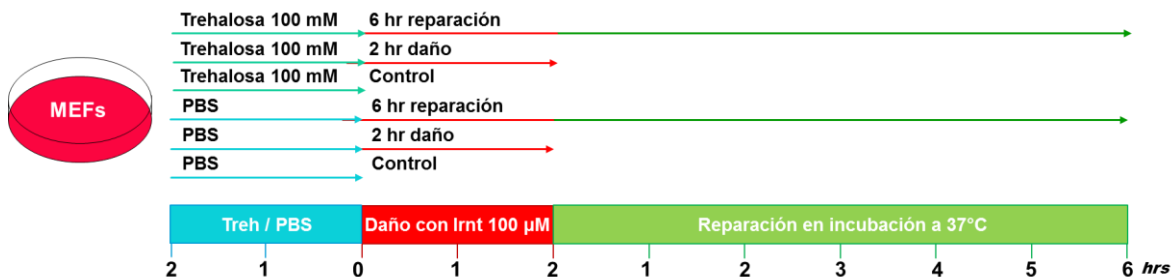
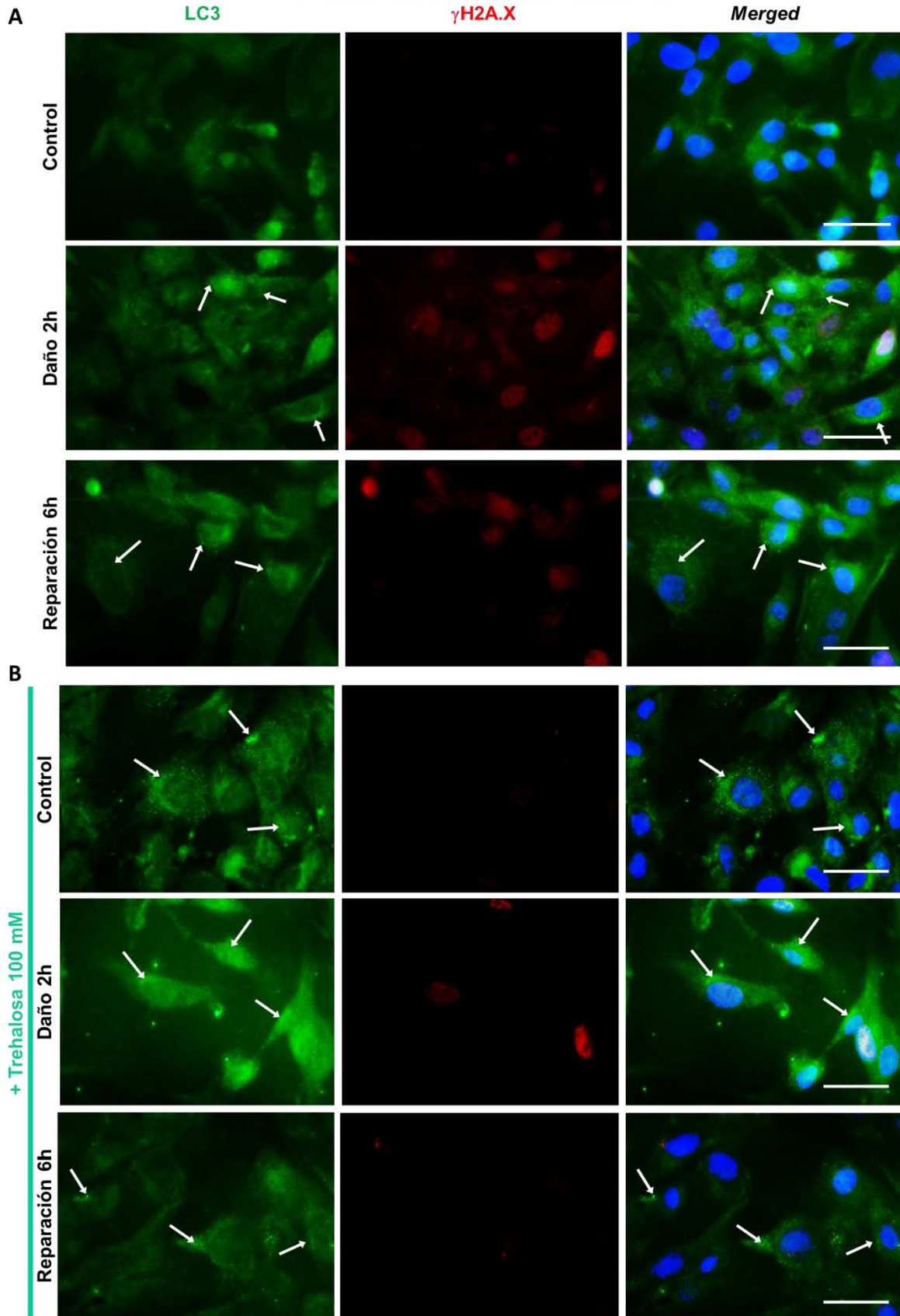


Figura 17. Diseño experimental para la inmunodetección de LC3 y  $\gamma$ H2A.X en células MEF.

**Figura 18. (Siguiete página) La autofagia se activa en respuesta al daño al DNA, y la trehalosa parece proteger al DNA del daño, pues hay menor acumulación de  $\gamma$ H2A.X.** Micrografías de fibroblastos embrionarios de ratón de la inmunofluorescencia doble contra LC3 y  $\gamma$ H2A.X. A) Se observó el aumento de LC3, así como la formación de puntos positivos para LC3 alrededor del núcleo típicos de la autofagia (flechas). B) Se observó, acorde a lo esperado, que el tratamiento de 2 horas con trehalosa 100 mM aumentó LC3 (Control). Al agregar trehalosa 2 horas antes que el Irinotecán, la acumulación de  $\gamma$ H2A.X disminuye a las dos horas de daño, si se compara con la respuesta observada sin trehalosa. También se observa que la autofagia se mantiene inducida hasta después de 8 horas (2 horas de daño y 6 horas de reparación). Las barras de escala equivalen a 50  $\mu$ m.



Fibroblastos embrionarios de ratón



## 7. El Irinotecán se acumula en forma punteada dentro de las células, posiblemente en autofagosomas.

Durante la experimentación, y a través de la literatura y del conocimiento del Irinotecán, se notó que este compuesto es autofluorescente. Esta propiedad es muy útil pues permite conocer su ubicación. Aprovechando esta propiedad, se notó que el Irinotecán se distribuye de forma punteada dentro de las células. Además, en respuesta al Irinotecán, se forman gránulos en el citoplasma, semejantes a los gránulos de estrés. Los gránulos de estrés son complejos citoplásmicos de RNA y proteínas que se forman como consecuencia del bloqueo del inicio de la traducción de las proteínas (Buchan & Parker, 2009).

Por este motivo, se planteó la hipótesis de que la autofagia podría proteger del daño causado por el Irinotecán, como lo sugiere la observación de menor fosforilación de la histona H2A.X en presencia de trehalosa, al secuestrar al Irinotecán en vesículas. Esto se confirmaría con el aumento del Irinotecán vesicular al estimular la autofagia con trehalosa, que se refleja bajo el microscopio como un aumento en la autofluorescencia punteada. Para probar esta idea, se incubaron ambos tipos celulares con trehalosa durante dos horas antes de añadir el Irinotecán (se muestra el esquema de la estrategia experimental en la figura 19) y se compararon con las células incubadas únicamente con PBS, como se observa en la figura 20A para MEFs y 20B para A549.

En ambas células, el Irinotecán se acumuló intracelularmente en forma punteada con la inducción de autofagia con trehalosa de forma más abundante, y estos puntos coinciden además con algunos de los gránulos de estrés (flechas blancas), aunque no en todos (flechas rojas). Vale la pena resaltar que el Irinotecán no se observó en el núcleo, donde interactúa con la topoisomerasa causando rupturas en el DNA. Esto sugiere que efectivamente, la inducción de autofagia protege al genoma reduciendo el acceso del Irinotecán al núcleo.

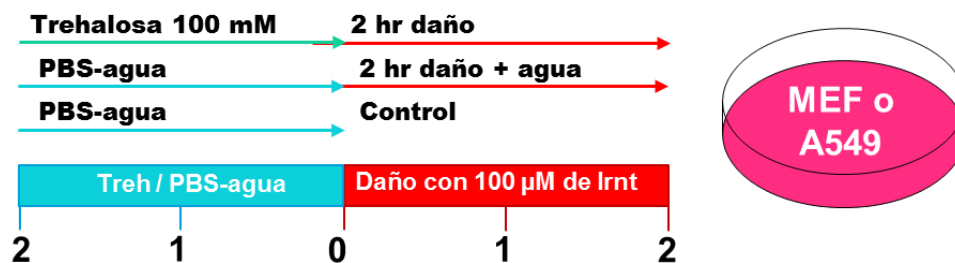
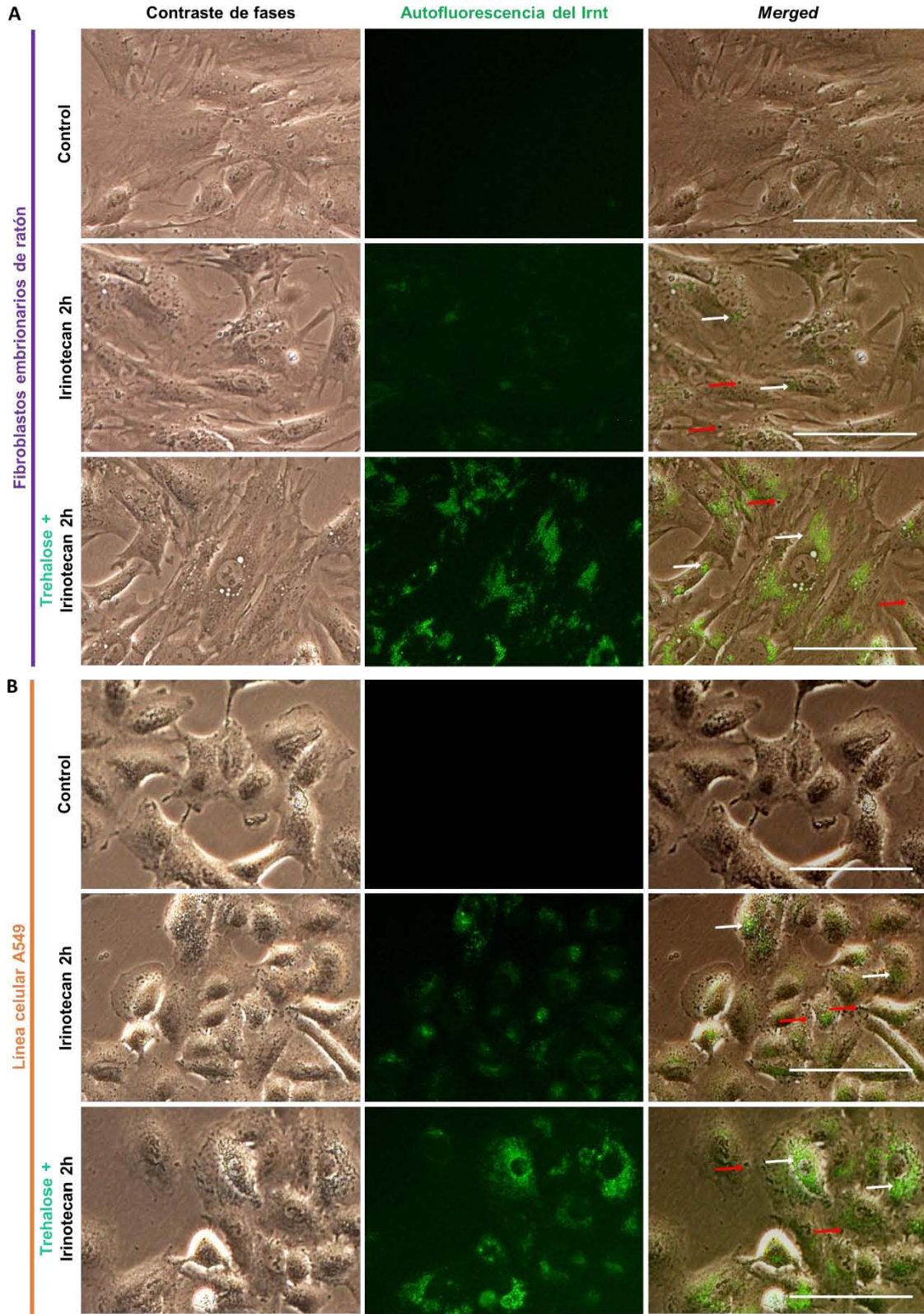


Figura 19. Diseño experimental para observar la disposición intracelular del Irinotecán.

En el caso de las células A549, la autofagia basal que se presenta es mayor (Figura 14), y coincidiendo con lo planteado anteriormente, la autofluorescencia inicial del Irinotecán cuando las células son sólo tratadas con él, es mayor (Figura 20B). Además, las células A549 también presentan gránulos de estrés desde el control por lo que esto puede contribuir al aumento de autofluorescencia. Finalmente, cuando estas células son tratadas con trehalosa, el aumento de autofluorescencia es notorio.

**Figura 20. (Siguiendo página) La activación de la autofagia con trehalosa aumenta la acumulación de Irinotecán en vesículas, algunas de las cuales co-localizan con gránulos de estrés.** El Irinotecán es un compuesto autofluorescente por lo que para la observación de éste, únicamente se requirió exponerlo a luz UV para permitir el blanqueamiento del medio y la excitación de la molécula; y posteriormente, capturar la micrografía al exponer la muestra en el canal azul del microscopio. Cuando las células son expuestas a Irinotecán, se forman estructuras similares a gránulos de estrés, que se pueden observar en el aumento como puntos oscuros. Estos no se encuentran en las células control de los MEF (A), pero sí aparecen en el control de las A549 (B), probablemente por ser cancerosas. Nótese que algunos de los puntos del Irinotecán coinciden con ellos. Al inducir autofagia con trehalosa, aumenta la señal emitida por Irinotecán tanto en las MEF (A) como en las A549 (B), presumiblemente por acumularse en autofagosomas. Las A549 presentan mayor autofagia basal y, consecuentemente, también presentan mayor autofluorescencia del Irinotecán. Se observan también vesículas blancas, que podrían ser autolisosomas en los que ya se degradó el material engullido. Estas estructuras no coinciden con los puntos de Irinotecán. Las flechas blancas indican gránulos de estrés y puntos de Irinotecán que co-localizan, mientras que las flechas rojas indican gránulos de estrés sin co-localización. La barra de escala equivale a 100  $\mu$ M.



## IX. DISCUSIÓN

---

### 1. La reparación del DNA se realiza con la misma velocidad en las células MEF y en la línea celular A549.

Cuando las células cancerosas son sometidas a agentes de daño al DNA como quimioterapéuticos o radiación, hay grupos celulares que son resistentes a ellos. Esta resistencia puede ser otorgada por un aumento en la capacidad de reparar el daño al DNA en estas células como en el caso de los gliomas y el cáncer de mama. Se cree que estas poblaciones con menor sensibilidad al daño al DNA son células iniciadoras de tumor, también llamadas células troncales cancerosas (CTCs). En 2012, se encontró que las A549 forman parte de las líneas celulares que tienen la capacidad de formación de esferas, que es una propiedad de CTCs. Las poblaciones de CTCs de A549 presentan menor respuesta al daño a comparación con las A549 que no pertenecen a esta población, pues presentan menor activación de ATM y de PARP-1 (Lundholm *et al.* 2013). Sin embargo, la línea celular A549 es altamente heterogénea por sus altas tasas de inestabilidad cromosómica, y esto podría permitir que no se observen diferencias entre las células normales (MEF) y estas células.

Otra razón para esta ausencia de diferencia entre ambos tipos celulares consiste en que a lo largo de este trabajo no se verificó si el DNA se reparaba correctamente, sin generar mutaciones, sino que fuera ligado nuevamente. Podría ser que las células A549 estén acumulando inestabilidad genómica y mutaciones, como en el trabajo de Liu, en 2015, en el que las células reparan las rupturas provocadas por distintos agentes genotóxicos, pero incorrectamente, de tal manera que con el tiempo se genera inestabilidad genómica y aumenta la muerte celular durante la ausencia de autofagia (Liu *et al.* 2015). Como en las células A549 se observó una activación moderada de la autofagia, ésta podría ser la razón por la que, aunque no se observan diferencias durante la generación de daño y la reparación de éste, pudiera existir inestabilidad genómica causada por la reparación errónea de las rupturas.

El Irinotecán ha sido administrado anteriormente tanto a células A549 como a ratones inmunodeprimidos en los que se ha generado adenocarcinoma a partir de la inoculación de la línea celular A549 en sus pulmones. La concentración administrada *in vivo* ha sido de 10 a 40 mg/kg (1.5 a 5.9 mM), y a estos niveles, el Irinotecán es efectivo para reducir los tumores generados por las células A549, y por esta razón, este compuesto ha sido usado como quimioterapéutico en el tratamiento del adenocarcinoma (Kraus-Berthier *et al.* 2000). Sin embargo, a dosis más bajas de Irinotecán (100  $\mu$ M) y en cultivos *in vitro* como los realizados en este trabajo, no se observó mayor sensibilidad de las células A549 en

comparación a las células control, ni aumento en la muerte celular, aún utilizando los mismos tiempos de exposición y las mismas concentraciones de este compuesto.

A partir de la búsqueda de mutaciones reportadas en las células A549 en el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, COSMIC), no se encontraron mutaciones en genes relacionados con la reparación de cadena sencilla (Forbes *et al.* 2015), por lo que es de esperar que la cinética de reparación sea semejante a la de células normales, como lo observado en este trabajo. De hecho, se han realizado experimentos para comprobar la activación de proteínas de respuesta al daño al DNA en las A549, y en estos, se ha encontrado que la respuesta es normal (Aqil *et al.* 2014; Sánchez-Pérez *et al.* 2009), lo que coincide con la ausencia de mutaciones y lo observado en este trabajo.

## **2. La respuesta autofágica es diferente en ambos tipos celulares.**

En el Catálogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, COSMIC), no se encontraron mutaciones en genes relacionados con la autofagia en las células A549 (Forbes *et al.* 2015). Sin embargo, estas células tienen una mutación en el gen *RAS* que conduce a una modificación en la proteína K-RAS (p.G12S) (ATCC *sin fecha-a*) que además de generar su alta tasa de proliferación, se ha visto relacionada con aumento en la autofagia basal (Liu & Ryan 2012). En 2011, el equipo de White describió diferentes células cancerosas de humano con varias mutaciones activantes de *RAS* que provocan modificaciones similares en la proteína a la encontrada en las A549 (H1299 de carcinoma de pulmón, N-RAS<sup>G12C</sup>; PANC-1 de adenocarcinoma pancreático, K-RAS<sup>G12V</sup>; T24 de carcinoma de vejiga, H-RAS<sup>G12C</sup>). Todas estas células presentan autofagia basal muy alta, y previamente habían demostrado que la presencia de *RAS* mutante en otro tipo celular genera este aumento en la autofagia. Además, la inhibición de la autofagia con cloroquina e interferentes de *ATG5* y *ATG7* genera atenuación en el crecimiento de estas células y disminución en la supervivencia (Guo *et al.* 2011). La mutación reportada en la proteína K-RAS en las células A549 podría ser la causa de la alta autofagia basal que observamos en ellas.

La heterogeneidad encontrada entre poblaciones de células A549, causada por la presencia de CTCs, y las diferencias en la respuesta al daño al DNA (Lundholm *et al.* 2013) que presentan estas subpoblaciones celulares pueden contribuir a las diferencias que se observan en la activación de la autofagia. Además, en el trabajo de Lundholm (2013) también se mostró que, tanto en las A549 como en otros tipos celulares cancerosos, la activación de PARP-1 es menor. PARP-1 es capaz de inducir autofagia a través de la disminución de energía y el aumento del AMP cíclico que es consecuencia de su actividad polimerasa y que es detectado por la AMPK. Ésta es otra posibilidad para explicar la activación moderada de la autofagia ante la inducción del daño al DNA por Irinotecán en las células A549.

En el cáncer, la función de la autofagia es poco entendida, pues es supresora de tumores en algunos tipos de cáncer como el de mama (Honghong *et al.* 2011), el pancreático (Dai *et al.* 2013) y el adenocarcinoma de pulmón (Chang *et al.* 2012); pero también es promotora en algunos otros como el linfoma (Amaravadi *et al.* 2007), el cáncer gástrico (Zhang *et al.* 2013) y nuevamente, el cáncer pancreático (Yang *et al.* 2011). En el caso específico del cáncer de pulmón, hay reportes que establecen que la supresión de la autofagia incrementa la sensibilidad de las células a la radiación, mientras que en otros trabajos se describe que es la activación de la autofagia la que lleva a cabo este aumento. Por lo tanto, la autofagia presenta efectos duales en los que la sobrevivencia y la muerte celular son inducidos de manera contexto dependiente. En particular, las células A549 se han descrito como más sensibles a los agentes genotóxicos cuando se les induce autofagia a través de rapamicina (Li *et al.* 2016); y el uso de inhibidores de autofagia genera la proliferación de estas células (Jiang *et al.* 2014).

### **3. La función de la autofagia durante la reparación del daño al DNA.**

Como se observó en los resultados, la autofagia se activa a partir de la media hora de exposición a Irinotecán. La autofagia puede regular y estabilizar proteínas de respuesta al daño. En la reparación por escisión de nucleótidos (NER, Nucleotide Excision Repair), la autofagia permite y favorece el reconocimiento del daño al DNA a través de las proteínas censoras de este tipo de daño: XPC (Xeroderma Pigmentosum Group C Protein) y DDB2 (DNA Damage Binding Protein 2). Cuando hay deficiencia de autofagia, disminuye la transcripción de XPC y se impide el reclutamiento de DDB2 a los sitios de daño al DNA inducidos por luz UV. Ambas funciones son establecidas a través de la proteína TWIST, que en presencia de autofagia es desestabilizada (Qiang *et al.* 2016). Así como en este tipo de daño, la autofagia puede controlar la estabilización de proteínas; es posible que durante las rupturas de cadena sencilla del DNA, la autofagia regule proteínas de detección y respuesta temprana al daño, y por eso, se encuentre activa durante los primeros momentos de exposición a Irinotecán.

La autofagia se ha encontrado también relacionada con la expresión de proteínas de respuesta al daño en células expuestas a radiación ionizante. En 2015, el grupo de Jianrong Wang confirmó que la rapamicina, un inductor de autofagia, protege tanto *in vitro* como *in vivo* a las células de médula ósea del daño provocado por radiación. Esto ocurre gracias a que la inducción de autofagia por rapamicina disminuye las especies reactivas de oxígeno generadas por radiación ionizante, y asimismo, aumenta la expresión de proteínas relacionadas con la reparación de rupturas de cadena doble por HR y NHEJ (Lin *et al.* 2015). De esta manera podría favorecer también a la reparación de las rupturas de cadena sencilla; sin embargo, cómo la autofagia causa el aumento en la expresión de estas proteínas sigue sin conocerse.

Además, la autofagia podría servir para degradar directamente al DNA dañado a través de la nucleofagia. Este tipo de autofagia fue descrito por Park en el 2009, a través de la observación de autofagosomas alrededor del núcleo de células con defectos en la envoltura nuclear causada por mutaciones en los genes que codifican para proteínas de la lámina. Al analizar el contenido de estos autofagosomas que son en ocasiones, más grandes que el núcleo, se observa material genético (teñido con DAPI). Estos autofagosomas con contenido nuclear, también coinciden con otros marcadores autofágicos, así como de daño al DNA como la histona  $\gamma$ H2Ax, y se fusionan con lisosomas. Al inhibir la autofagia en estas células, la viabilidad celular disminuye y aumentan las anomalías nucleares (Park *et al.* 2009).

Este fenómeno de nucleofagia no sólo se ha encontrado en células mutantes que no se encuentran comúnmente de forma natural, sino que también se ha observado en células senescentes. En 2013, Ivanov y su grupo observaron que células con senescencia inducida por oncogenes presentan fragmentos de cromatina en el citoplasma. Esta cromatina es positiva para la histona  $\gamma$ H2AX, indicando que se encuentra dañada; y, además, es expulsada del núcleo a partir de ampollas en la membrana nuclear. Posteriormente, este material es degradado a través de la vía autofágica en el lisosoma (Ivanov *et al.* 2013).

Uno de los marcadores de senescencia celular es la disminución de la lámina B1 y, como consecuencia, la pérdida en la integridad de la envoltura nuclear, que es un caso similar al observado por Park; y que permitiría por tanto el escape y la degradación de grandes segmentos de DNA. La degradación de la lámina B1 se puede llevar a cabo por medio de la autofagia a través de la interacción de ésta con LC3. Esta eliminación se lleva a cabo cuando existe algún estrés oncogénico como la activación de RAS, por lo que la autofagia es también protectora del genoma de esta forma (Dou *et al.* 2015).

En estos contextos celulares, la autofagia degrada DNA que se encuentra dañado. Sin embargo, aún no hay reportes de esta forma de nucleofagia en células normales no senescentes, pero es posible que ante un daño genotóxico grave la autofagia se encargue de eliminar grandes segmentos dañados de DNA, manteniendo así estabilidad genómica y evitando la progresión del cáncer.

La respuesta al estrés en las células eucarióticas inhibe a veces al inicio de la traducción de las proteínas y, por lo tanto, provoca la formación de complejos citoplásmicos de RNA y proteínas, que son llamados gránulos de estrés. Estos pueden contener mRNAs, componentes de la iniciación de la traducción, y muchas otras proteínas que pueden incluir factores involucrados en la señalización celular (Buchan & Parker 2009). En células MEF en respuesta al Irinotecán se observó la formación de estructuras similares a gránulos de estrés, por lo que puede ser que la acumulación de estos también se encuentre relacionada con el aumento de autofagia.

Los gránulos de estrés se han encontrado relacionados con múltiples enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), y la ataxia espinocerebelar de tipo 2. Estas enfermedades y algunas otras relacionadas se han visto asociadas a la autofagia, ya sea a defectos de ella en las patologías, o bien, a la mejora de



éstas cuando la autofagia es inducida (Lamark & Johansen 2012; Lee *et al.* 2015). En 2013, Parker y su grupo encontraron que mutaciones en genes de autofagia generan la acumulación de gránulos de estrés y disminuyen su eliminación, tanto en levadura como en mamíferos (Buchan *et al.* 2013).

Los retrotransposones son elementos genéticos que se insertan en el genoma de los seres vivos. Contribuyen a la variación genética entre especies, individuos y células; sin embargo, también generan enfermedades por su reinserción en los genomas. LINE-1 y *Alu* son dos familias de retrotransposones que se encuentran en primates, y en el 2014, se encontró que las secuencias de RNA producto de estos colocalizan con autofagosomas. La eliminación de este RNA y por tanto, la protección del genoma que es consecuencia de impedir la inserción del RNA a través de retrotranscripción, requieren de la autofagia. El grupo de Guo además encontró que esto se realiza a través de la degradación de gránulos de estrés a los que los RNA de LINE-1 y *Alu* se encuentran asociados (Guo *et al.* 2014). Así como en este caso la autofagia se encuentra degradando gránulos de estrés de forma específica porque contienen retrotransposones, es posible que los degrade porque contengan proteínas relacionadas con el ciclo celular o la apoptosis, y que sea esta la causa por la que la autofagia se activa al inducir daño con Irinotecán, que también genera la aparición de gránulos de estrés.

Finalmente, es importante destacar que tanto en las MEF como en las células A549 se observó una re-expresión de p62/SQSTM1 durante la reparación, contrario a lo esperado al existir un adecuado flujo autofágico, como se observó al comparar la cantidad de p62/SQSTM1 después de la incubación con cloroquina. En 2011, y posteriormente, en 2016, el grupo de Jun-Lin Guan, describió diferentes funciones que la proteína p62/SQSTM1 puede tener en la célula cuando aumenta y genera agregados. En estos trabajos, el silenciamiento de p62 en células con autofagia inhibida les permite reparar el daño adecuadamente; y también permite la recuperación de las células madre neuronales afectadas por la eliminación de FIP200/RB1CC1 (Bae & Guan 2011; Wang *et al.* 2016). Es posible que p62/SQSTM1 tenga un papel en la reparación del daño independiente a su función como receptor autofágico, y por eso se ha observado su aumento durante la reparación del daño causado por el Irinotecán.

#### **4. Participación de otros tipos de autofagia y de la vía proteasomal en la reparación del daño al DNA.**

En este trabajo sólo se analizó la activación de la macroautofagia al exponer a las células a rupturas de cadena sencilla; sin embargo, también es posible que los otros dos tipos de autofagia se encuentren involucrados, pues ya se han visto relacionados con el daño al DNA y la respuesta celular a éste.

La microautofagia es el tipo de autofagia menos estudiado y más desconocido actualmente. Se ha estudiado principalmente en hongos y se desconoce si existe en mamíferos (Jian &

Bao 2012). En 2003, se observó que en *Saccharomyces cerevisiae* se lleva a cabo microautofagia del núcleo (o micronucleofagia) que consiste en la escisión y engullimiento de un fragmento del núcleo en la vacuola para su degradación. Se detectó que la parte del núcleo que es degradada consiste en parte del nucleolo así como el nucleoplasma, pero se desconoce si también se degrada DNA por este medio (Roberts *et al.* 2003). Sin embargo, aún no hay reportes en los que este tipo de autofagia permita la degradación de partes del núcleo en células de animales, y mucho menos de mamíferos.

Durante la microautofagia que se ha observado en células de mamífero, el engullimiento de un fragmento del citoplasma ocurre en endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares y no en los lisosomas, por lo que recibe el nombre de microautofagia endosomal (e-Mi) (Sahu *et al.* 2011). Este tipo de microautofagia ha sido descrita como un método de degradación de proteínas en el área sináptica de las neuronas, a través de la deformación de la membrana de los endosomas y posteriormente la detección de las proteínas a degradar y su entrapamiento en el interior del endosoma (Uytterhoeven *et al.* 2015). Aunque no se ha estudiado, es posible que la microautofagia permita la degradación de proteínas de la respuesta al daño al DNA.

La autofagia mediada por chaperonas también se ha visto involucrada con la respuesta al daño al DNA a través de la proteína CHEK1 (Checkpoint kinase 1). Esta cinasa es una de las proteínas que son fosforiladas y activadas por la proteína ATR (Smith *et al.* 2010), y una de sus funciones principales es favorecer el arresto de la entrada de la célula a mitosis en la fase G2 a través de la fosfatasa CDC25, evitando así la inestabilidad genómica y la propensión al cáncer provocadas por la reproducción de células con el DNA dañado.

En 2015, el grupo de investigación conformado por Park, Suh y Cuervo, utilizaron MEF silvestres, o bien, con mutaciones nulas del gen *Lamp-2A* (necesario para la CMA) o del gen *Atg7* (necesario para la macroautofagia), que fueron tratados con agentes que generan rupturas de cadena doble. Las células sin CMA son más sensibles al etopósido, a la camptotecina, al cisplatino, y a otros quimioterapéuticos, que las células sin macroautofagia; y éstas a su vez, son más sensibles que las células silvestres. También observaron que la CMA aumenta en forma dosis dependiente ante estos estímulos genotóxicos; sin embargo, no observaron activación de la macroautofagia al ocasionar daño al DNA en estas células, lo que es contradicho por lo obtenido en otros artículos y en datos no publicados de nuestro laboratorio. Así mismo, observaron que la proteína CHEK1 es degradada por CMA y que la inhibición de la autofagia mediada por chaperonas desestabiliza al complejo sensor MRN (MRE11:RAD50:NSB1), que permite el reclutamiento y la activación de ATM en rupturas de cadena doble en el DNA, que activa posteriormente a CHEK2. Esta desestabilización es provocada por la alteración de la vía de ATR (Park *et al.* 2015). Las vías ATM-CHEK2 y ATR-CHEK1 se encuentran con frecuencia activadas de forma simultánea, al exponer a las células a diversas fuentes de estrés genotóxico, como la radiación ionizante y la mayoría de los agentes quimioterapéuticos. Por otra parte, se ha reportado también que el proteasoma es capaz de degradar a CHEK1 cuando se induce estrés genotóxico con camptotecina (Zhang *et al.* 2005).

Encontrar más proteínas que también sean degradadas por estas vías autofágicas distintas a la macroautofagia así como por la vía proteasomal, y entender la participación de éstas en la respuesta al daño al DNA, es importante, para tener una visión global de lo que pasa en la célula al ser expuesta en particular a daños endógenos tan comunes como son las rupturas de cadena sencilla; pero también al estrés genotóxico continuo al que se encuentra sometida la célula y los organismos a lo largo de su vida.

Finalmente, la localización intracelular punteada del Irinotecán, coincidente con la localización de gránulos de estrés e intensificada con trehalosa, sugiere que la autofagia podría proteger al genoma, al secuestrar al Irinotecán en vesículas, evitando su acceso al núcleo. Es decir, que la autofagia previene el daño además de favorecer su reparación.

## X. CONCLUSIONES

---

La maquinaria de reparación de las células A549 responde de la misma forma que los fibroblastos embrionarios de ratón, pues ambas requieren de la misma exposición durante dos horas a 100  $\mu$ M de Irinotecán para dañar al DNA. Además, ambas células requieren de las mismas 6 horas para reparar ese daño.

En los fibroblastos embrionarios de ratón, la autofagia se activa al momento de inducir daño, y se mantiene activa a lo largo de toda la reparación. Las células A549 no presentan la misma magnitud de activación de la autofagia al inducir daño, pues tienen altos niveles de autofagia basal. El bloqueo de la autofagia con cloroquina reveló que el flujo autofágico es continuo en ambos tipos celulares. La activación de la autofagia en los fibroblastos disminuye el daño al DNA.

Tanto en los fibroblastos embrionarios de ratón como en las células A549, el Irinotecán se almacena en vesículas que aumentan en número cuando se estimula la autofagia con trehalosa.

Finalmente, se encontró que la autofagia es una respuesta temprana al daño al DNA. Hasta nuestro conocimiento, la dinámica que la autofagia presentaba al exponer las células a un tipo de daño no se había descrito antes de este trabajo. Entender la dinámica que la autofagia presenta es un primer paso para realizar estudios posteriores en los que su activación previa al estímulo de daño podría favorecer una reparación adecuada y más rápida del DNA. Aún se desconoce la función que tiene la autofagia en la respuesta al daño al DNA y aún se requieren más estudios que la definan, pero los resultados de este trabajo sugieren que la autofagia no sólo es esencial para la reparación adecuada del daño al DNA, sino que es necesaria también para la protección de éste.

## XI. PERSPECTIVAS

---

Los resultados de este trabajo sugieren que la autofagia participa en la prevención del daño por su activación temprana durante la exposición de las células al Irinotecán. Para comprobar esto, es necesario realizar experimentos de manipulación de autofagia, de tal forma que se pueda observar el efecto que tiene la inducción y la inhibición de la autofagia en el daño generado por Irinotecán y en su reparación. Al inducir autofagia con la trehalosa, ya usada en este trabajo, y posteriormente, realizar el Ensayo Cometa para observar la curva de reparación del DNA, se podría constatar que la autofagia protege a la célula del daño, al observar un menor daño por Irinotecán, y además favorece la reparación, al obtener la reparación del daño al DNA en menores tiempos que las células control. Por otra parte, inhibir la autofagia en los MEF, antes de generar el daño, a través de Spautin-1 (un inhibidor específico de autofagia que promueve la degradación de BECN1 y PIK3C3) podría provocar mayor sensibilidad de las células al Irinotecán, mayor daño al DNA ocasionado por éste, aumento en la muerte celular y tiempos más largos de reparación de las rupturas de cadena sencilla. Para diferenciar qué fase de la autofagia es la que está beneficiando la respuesta al daño al DNA, se podrían utilizar diferentes inhibidores de autofagia como Spautin-1, ya mencionado, que actúa en la fase de nucleación, y cloroquina, usada en este trabajo, que inhibe la degradación de la vesícula. De esta manera, si la autofagia es principalmente protectora del daño a través de la degradación del Irinotecán, no habrá diferencias entre el control y el Spautin-1, pero sí las habrá con el tratamiento de Cloroquina. Sin embargo, si la autofagia además favorece la reparación a través de la estabilización de proteínas y el secuestro de éstas en vesículas, también habrá diferencias con el uso de Spautin-1.

En el trabajo de Gillespie y Ryan (2016), se ha visto que las células con autofagia inhibida, pueden reparar las rupturas, pero con el tiempo acumulan inestabilidad genómica y presentan tasas más altas de muerte celular. Por esto es necesario estudiar a largo plazo el efecto que tiene la inducción e inhibición de la autofagia en los MEFs que presentan activación de la autofagia en respuesta a la inducción de daño, así como en las A549, que no la presentan.

Debido a que la microautofagia endosomal y la autofagia mediada por chaperonas podrían estar involucradas, es importante estudiar su efecto en la reparación del DNA también. Esto se puede realizar a través del uso de mutantes nulas de *Atg7* (para inhibir macroautofagia), de *Lamp2A* (para inhibir la autofagia mediada por chaperonas) y de las dos isoformas de *Vps4* y de *Tsg101* (para inhibir la microautofagia endosomal) (Sahu *et al.* 2011). Con estas mutantes, y el uso de Irinotecán para generarles rupturas de cadena sencilla, se podrían observar diferencias en la reparación de las células control y las células sin alguno o sin

todos los tipos de autofagia. Lo esperado sería que la macroautofagia que fue el tipo de autofagia estudiado en este trabajo, sea la autofagia más importante en la reparación de rupturas de cadena sencilla; sin embargo, por el trabajo de Park, Suh y Cuervo (2015), también la autofagia mediada por chaperonas podría contribuir en este proceso (Park *et al.* 2015).

Es importante destacar que el Irinotecán, además de provocar rupturas de cadena sencilla, puede generar también rupturas de cadenas doble, y que la respuesta observada puede ser consecuencia de ambos tipos de daño. Para hacer más específica la evaluación de la respuesta al daño, se podrían utilizar otras técnicas como la generación de rupturas de cadena sencilla sitio-específicas a través de la inserción de un plásmido con secuencias específicas que generen este tipo de rupturas en el genoma de células normales (Zhang & Taylor 2001).

Finalmente, la autofluorescencia del Irinotecán se observó en patrones similares a las estructuras parecidas a gránulos de estrés y se ve aumentada en los tratamientos con trehalosa. Es importante confirmar a través de marcadores como factores de inicio de la traducción (EIF4E, EIF4G, PABP, etc.) que las estructuras observadas en las células son efectivamente gránulos de estrés (Reineke & Lloyd 2013). Posteriormente, es necesario desarrollar una técnica que permita observar en una misma muestra la colocalización del Irinotecán con autofagosomas inducidos con trehalosa, así como, con los gránulos de estrés para poder corroborar que la autofagia está protegiendo al DNA a través de la degradación del Irinotecán.

## XII. REFERENCIAS

---

- Abbas, T; Keaton, MA & Dutta, A. (2013). **Genomic Instability in Cancer**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5**(3): a012914–a012914. doi:10.1101/cshperspect.a012914
- Alers, S; Loffler, a. S; Wesselborg, S & Stork, B. (2012). **Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the Regulation of Autophagy: Cross Talk, Shortcuts, and Feedbacks**. *Molecular and Cellular Biology*, **32**(1): 2–11. doi:10.1128/MCB.06159-11
- Amaravadi, RK; Yu, D; Lum, JJ; Bui, T; Christophorou, MA; Evan, GI; Thomas-Tikhonenko, A & Thompson, CB. (2007). **Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma**. *Journal of Clinical Investigation*, **117**(2): 326–336. doi:10.1172/JCI28833
- Aqil, M; Elseth, KM; Vesper, BJ; Deliu, Z; Aydogan, B; Xue, J & Radosevich, JA. (2014). **Part I—mechanism of adaptation: high nitric oxide adapted A549 cells show enhanced DNA damage response and activation of antiapoptotic pathways**. *Tumor Biology*, **35**(3): 2403–2415. doi:10.1007/s13277-013-1318-6
- ATCC. (*sin fecha-a*). **A549 (ATCC® CCL--185™)**.
- ATCC. (*sin fecha-b*). **ATCC cell lines by gene mutation**.
- Bae, H & Guan, JL. (2011). **Suppression of autophagy by FIP200 deletion impairs DNA damage repair and increases cell death upon treatments with anticancer agents**. *Molecular Cancer Research : MCR*, **9**(9): 1232–41. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0098
- Buchan, JR; Kolaitis, R maria; Taylor, JP & Parker, R. (2013). **Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48 / VCP Function**. *Cell*, **153**(7): 1461–1474. doi:10.1016/j.cell.2013.05.037
- Buchan, JR & Parker, R. (2009). **Eukaryotic Stress Granules : The Ins and Out of Translation What are Stress Granules ?**, **36**(6).
- Caldecott, KW. (2008). **Single-strand break repair and genetic disease**. *Nat Rev Genet*, **9**(8): 619–631. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2380>
- Chang, SH; Minai-Tehrani, A; Shin, JY; Park, S; Kim, JE; Yu, KN; Hong, SH; Hong, CM; Lee, KH; Beck, GR & Cho, MH. (2012). **Beclin1-induced autophagy abrogates radioresistance of lung cancer cells by suppressing osteopontin**. *Journal of Radiation Research*, **53**(3): 422–32. doi:10.1269/jrr.11148
- Chow, H man & Herrup, K. (2015). **Genomic integrity and the ageing brain**. *Nature Publishing Group*, **16**(11): 672–684. doi:10.1038/nrn4020
- COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer. (*sin fecha*). Retrieved from [cancer.sanger.ac.u](http://cancer.sanger.ac.u)
- Czarny, P; Pawlowska, E; Bialkowska-Warzecha, J; Kaarniranta, K & Blasiak, J. (2015). **Autophagy in DNA Damage Response**. *International Journal of Molecular Sciences*,

16(2): 2641–2662. doi:10.3390/ijms16022641

- Dai, ZJ; Gao, J; Kang, HF; Ma, YG; Ma, XB; Lu, WF; Lin, S; Ma, HB; Wang, XJ & Wu, WY. (2013). **Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) enhances radiosensitivity in pancreatic carcinoma cells.** *Drug Design, Development and Therapy*, **7**: 149–59. doi:10.2147/DDDT.S42390
- DeBosch, BJ; Heitmeier, MR; Mayer, AL; Higgins, CB; Crowley, JR; Kraft, TE; Chi, M; Newberry, EP; Chen, Z; Finck, BN; Davidson, NO; Yarasheski, KE; Hruz, PW & Moley, KH. (2016). **Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis.** *Science Signaling*, **9**(416): ra21 LP-ra21. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Dou, Z; Xu, C; Donahue, G; Shimi, T; Pan, J an; Zhu, J; Ivanov, A; Capell, BC; Catanzaro, JM; Ricketts, MD; Lamark, T; Adam, SA; Drake, AM & Parisha, P. (2015). **Autophagy mediates degradation of nuclear lamina.** *Nature*, 1–17. doi:10.1038/nature15548
- Forbes, SA; Beare, D; Gunasekaran, P; Leung, K; Bindal, N; Boutselakis, H; Ding, M; Bamford, S; Cole, C; Ward, S; Kok, CY; Jia, M; De, T; Teague, JW; Stratton, MR; McDermott, U & Campbell, PJ. (2015). **COSMIC: Exploring the world’s knowledge of somatic mutations in human cancer.** *Nucleic Acids Research*, **43**(D1): D805–D811. doi:10.1093/nar/gku1075
- Fujita, N; Itoh, T; Omori, H; Fukuda, M; Noda, T & Yoshimori, T. (2008). **The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy.** *Molecular Biology of the Cell*, **19**(5): 2092–2100. doi:10.1091/mbc.E07-12-1257
- Garfield, AS. (2010). **Derivation of Primary Mouse Embryonic Fibroblast (PMEF) Cultures.** In Ward, A. & Tosh, D. (Eds.), *Mouse Cell Culture: Methods and Protocols* (pp. 19–27). Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1007/978-1-59745-019-5\_2
- Gillespie, DA & Ryan, KM. (2016). **Autophagy is critically required for DNA repair by homologous recombination.** *Molecular & Cellular Oncology*, **3**(1): e1030538. doi:10.1080/23723556.2015.1030538
- Guo, H; Chitiprolu, M; Gagnon, D; Meng, L; Perez-iratxeta, C; Lagace, D & Gibbins, D. (2014). **Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA.** *Nature Communications*, **5**: 1–11. doi:10.1038/ncomms6276
- Guo, JY; Chen, HY; Mathew, R; Fan, J; Strohecker, AM; Karsli-Uzunbas, G; Kamphorst, JJ; Chen, G; Lemons, JMS; Karantza, V; Collier, HA; Dipaola, RS; Gelinias, C; Rabinowitz, JD & White, E. (2011). **Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis.** *Genes & Development*, **25**(5): 460–470. doi:10.1101/gad.2016311
- Gwinn, DM; Shackelford, DB; Egan, DF; Mihaylova, MM; Mery, A; Vasquez, DS; Turk, BE & Shaw, RJ. (2008). **AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint.** *Molecular Cell*, **30**(2): 214–226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003
- Honghong, C; Ma, Z; Vanderwaal, RP; Feng, Z; González Suárez, I; Wang, S; Zhang, J; Roti, JLR; Gonzalo, S & Zhang, J. (2011). **The mTOR Inhibitor Rapamycin Suppresses DNA Double-Strand Break Repair.** *Radiation Research*, **175**(2): 214–224. doi:10.1038/nbt.3121.ChIP-nexus
- Hughes, T & Rusten, TE. (2007). **Origin and Evolution of Self-Consumption: Autophagy.** In Jékely, G. (Ed.), *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution* (pp. 111–118). Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-74021-8\_9



- Ivanov, A; Pawlikowski, J; Manoharan, I; van Tuyn, J; Nelson, DM; Rai, TS; Shah, PP; Hewitt, G; Korolchuk, VI; Passos, JF; Wu, H; Berger, SL & Adams, PD. (2013). **Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence.** *The Journal of Cell Biology*, **202**(1): 129–143. doi:10.1083/jcb.201212110
- Jian, W wen L & Bao, LJ ku. (2012). **Microautophagy: lesser-known self-eating**, 1125–1136. doi:10.1007/s00018-011-0865-5
- Jiang, RY; Pei, HL; Gu, WD; Huang, J & Wang, ZG. (2014). **Autophagic inhibitor attenuates rapamycin-induced inhibition of proliferation in cultured A549 lung cancer cells.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **18**(6): 806–810.
- Kabeya, Y; Mizushima, N; Ueno, T; Yamamoto, A; Kirisako, T; Noda, T; Kominami, E; Ohsumi, Y & Yoshimori, T. (2000). **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.** *The EMBO Journal*, **19**(21): 5720–5728. doi:10.1093/emboj/19.21.5720
- Khaminets, A; Behl, C & Dikic, I. (2016). **Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy.** *Trends in Cell Biology*, **26**(1): 6–16. doi:10.1016/j.tcb.2015.08.010
- Kim, J; Kundu, M; Viollet, B & Guan, KL. (2011). **AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1.** *Nature Cell Biology*, **13**(2): 132–41. doi:10.1038/ncb2152
- Kim, KH & Lee, MS. (2014). **Autophagy: a key player in cellular and body metabolism.** *Nature Reviews. Endocrinology*, **10**(6): 322–37. doi:10.1038/nrendo.2014.35
- Klionsky, DJ; Abdelmohsen, K; Abe, A; Abedin, MJ; Abeliovich, H; Acevedo Arozena, A; Adachi, H; Adams, CM; Adams, PD; Adeli, K; Adihetty, PJ; Adler, SG; Agam, G; Agarwal, R; Aghi, MK; Agnello, M; Agostinis, P; Aguilar, P V; Aguirre-Ghiso, J; Airoidi, EM; ... Zughair, SM. (2016). **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition).** *Autophagy*, **12**(1): 1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
- Kraus-Berthier, L; Jan, M; Guilbaud, N; Naze, M; Pierre, A & Atassi, G. (2000). **Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice.** *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, **6**(1): 297–304.
- Kroemer, G; Galluzzi, L; Vandenabeele, P; Abrams, J; Alnemri, ES; Baehrecke, EH; Blagosklonny, M V; El-Deiry, WS; Golstein, P; Green, DR; Hengartner, M; Knight, R a; Kumar, S; Lipton, S a; Malorni, W; Nuñez, G; Peter, ME; Tschopp, J; Yuan, J; Piacentini, M; Zhivotovsky, B & Melino, G. (2009). **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009.** *Cell Death and Differentiation*, **16**(1): 3–11. doi:10.1038/cdd.2008.150
- Kroemer, G; Mariño, G & Levine, B. (2010). **Autophagy and the integrated stress response.** *Molecular Cell*, **40**(2): 280–293. doi:10.1016/j.molcel.2010.09.023
- Lamark, T & Johansen, T. (2012). **Aggrephagy: Selective disposal of protein aggregates by macroautophagy.** *International Journal of Cell Biology*, **2012**: 21. doi:10.1155/2012/736905
- Lee, JK; Shin, JH; Lee, JE & Choi, EJ. (2015). **Role of autophagy in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis.** *BBA - Molecular Basis of Disease*, **1852**(11): 2517–

2524. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.005

- Li, Y; Liu, F; Wang, Y; Li, D; Guo, F; Xu, L; Zeng, Z & Zhong, X. (2016). **Rapamycin-induced autophagy sensitizes A549 cells to radiation associated with DNA damage repair inhibition.** doi:10.1111/1759-7714.12332
- Lin, W; Yuan, N; Wang, Z; Cao, Y; Fang, Y; Li, X; Xu, F; Song, L; Wang, J; Zhang, H; Yan, L; Xu, L; Zhang, X; Zhang, S & Wang, J. (2015). **Autophagy confers DNA damage repair pathways to protect the hematopoietic system from nuclear radiation injury.** *Scientific Reports*, **5**(July): 11. doi:10.1038/srep12362
- Liu, EY & Ryan, KM. (2012). **Autophagy and cancer - issues we need to digest.** *Journal of Cell Science*, **125**(Pt 10): 2349–2358. doi:10.1242/jcs.093708
- Liu, EY; Xu, N; O'Prey, J; Lao, LY; Joshi, S; Long, JS; O'Prey, M; Croft, DR; Beaumatin, F; Baudot, AD; Mrschtik, M; Rosenfeldt, M; Zhang, Y; Gillespie, DA & Ryan, KM. (2015). **Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(3): 773–778. doi:10.1073/pnas.1409563112
- Lombard, DB; Chua, KF; Mostoslavsky, R; Franco, S; Gostissa, M & Alt, FW. (2005). **DNA repair, genome stability, and aging.** *Cell*, **120**(4): 497–512. doi:10.1016/j.cell.2005.01.028
- Lundholm, L; Hååg, P; Zong, D; Juntti, T; Mörk, B; Lewensohn, R & Viktorsson, K. (2013). **Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest.** *Cell Death & Disease*, **4**: e478. doi:10.1038/cddis.2012.211
- Maskey, D; Yousefi, S; Schmid, I; Zlobec, I; Perren, A; Friis, R & Simon, HU. (2013). **ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy.** *Nature Communications*, **4**: 2130. doi:10.1038/ncomms3130
- Mescher, AL. (2013). *Junqueira's Basic Histology. Text & Atlas* (13a ed.). Mc Graw Hill Education.
- Mijaljica, D; Prescott, M & Devenish, RJ. (2011). **Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum.** *Autophagy*, **7**(7): 673–682. doi:http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.7.14733
- Mizushima, N; Noda, T; Yoshimori, T; Tanaka, Y; Ishii, T; George, MD; Klionsky, DJ; Ohsumi, M & Ohsumi, Y. (1998). **A protein conjugation system essential for autophagy.** *Nature*, **395**(6700): 395–398. doi:10.1038/26506
- Mizushima, N; Sugita, H; Yoshimori, T & Ohsumi, Y. (1998). **A New Protein Conjugation System in Human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy.** *Journal of Biological Chemistry*, **273**(51): 33889–33892. doi:10.1074/jbc.273.51.33889
- Mizushima, N; Yoshimori, T & Levine, B. (2010). **Methods in Mammalian Autophagy Research.** *Cell*, **140**(3): 313–326. doi:10.1016/j.cell.2010.01.028
- Mizushima, N; Yoshimori, T & Ohsumi, Y. (2011). **The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **27**: 107–132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005
- Pankiv, S; Høyvarde Clausen, T; Lamark, T; Brech, A; Bruun, JA; Outzen, H; Øvervatn, A; Bjørkøy, G & Johansen, T. (2007). **p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to**

- Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy.** *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(33): 24131–24145. doi:10.1074/jbc.M702824200
- Park, C; Suh, Y & Cuervo, AM. (2015). **Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage.** *Nature Communications*, **6**: 6823. doi:10.1038/ncomms7823
- Park, YE; Hayashi, YK; Bonne, G; Arimura, T; Noguchi, S; Nonaka, I & Nishino, I. (2009). **Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells.** *Autophagy*, **5**(6): 795–804. doi:10.4161/auto.8901
- Pasqua, G; Monacelli, B & Valletta, A. (2004). **Cellular localisation of the anti-cancer drug camptothecin in *Camptotheca acuminata* Decne (Nyssaceae).** *European Journal of Histochemistry*, **48**(3): 321–327.
- Qiang, L; Zhao, B; Shah, P; Sample, A; Yang, S & He, YY. (2016). **Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair.** *Autophagy*, **12**(2): 357–368. doi:10.1080/15548627.2015.1110667
- Rabinowitz, JD & White, E. (2010). **Autophagy and metabolism.** *Science (New York, N.Y.)*, **330**(6009): 1344–1348. doi:10.1126/science.1193497
- Reggiori, F; Komatsu, M; Finley, K & Simonsen, A. (2012). **Selective Types of Autophagy.** *International Journal of Cell Biology*, **2012**: 18. doi:10.1155/2012/156272
- Reineke, LC & Lloyd, RE. (2013). **Diversion of stress granules and P-bodies during viral infection.** *Virology*, **436**(2): 255–267. doi:10.1016/j.virol.2012.11.017
- Reinhardt, HC & Schumacher, B. (2012). **The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer.** *Trends in Genetics*, **28**(3): 128–136. doi:10.1016/j.tig.2011.12.002
- Roberts, P; Moshitch-Moshkovitz, S; Kvam, E; O'Toole, E; Winey, M & Goldfarb, DS. (2003). **Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molecular Biology of the Cell*, **14**(January): 129–141. doi:10.1091/mbc.E02
- Rojas, E; Lopez, MC & Valverde, M. (1999). **Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications.** *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, **722**(1–2): 225–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068143>
- Sahu, R; Kaushik, S; Clement, CC; Cannizzo, ES; Scharf, B; Follenzi, A; Potolicchio, I; Nieves, E; Cuervo, AM & Santambrogio, L. (2011). **Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes.** *Developmental Cell*, **20**(1): 131–139. doi:10.1016/j.devcel.2010.12.003
- Sánchez-Pérez, Y; Chirino, YI; Osomio-Vargas, ÁR; Morales-Bárceñas, R; Gutiérrez-Ruiz, C; Vázquez-López, I & García-Cuellar, CM. (2009). **DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants.** *Cancer Letters*, **278**(2): 192–200. doi:10.1016/j.canlet.2009.01.010
- Sarkar, S; Davies, JE; Huang, Z; Tunnacliffe, A & Rubinsztein, DC. (2007). **Trehalose, a Novel mTOR-independent Autophagy Enhancer, Accelerates the Clearance of Mutant Huntingtin and  $\alpha$ -Synuclein.** *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(8): 5641–5652. doi:10.1074/jbc.M609532200
- Smith, J; Mun Tho, L; Xu, N & A. Gillespie, D. (2010). **The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer.** *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 108). Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0

- Sørbotten, N & Kruszewski, S. (2013). **Fluorescence spectroscopy in a study of anticancer drugs: 7-tert-butylidimethylsilyl-camptothecin and 7-tert-butylidimethylsilyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]-carbonyloxycamptothecin.** *Medical Research Journal*, **1**(1): 23–30.
- Stolz, A; Ernst, A & Dikic, I. (2014). **Cargo recognition and trafficking in selective autophagy.** *Nature Cell Biology*, **16**(6): 495–501. doi:10.1038/ncb2979
- Tanida, I; Sou, Y s.; Ezaki, J; Minematsu-Ikeguchi, N; Ueno, T & Kominami, E. (2004). **HsAtg4B/HsApg4B/Autophagin-1 Cleaves the Carboxyl Termini of Three Human Atg8 Homologues and Delipidates Microtubule-associated Protein Light Chain 3- and GABAA Receptor-associated Protein-Phospholipid Conjugates.** *Journal of Biological Chemistry*, **279**(35): 36268–36276. doi:10.1074/jbc.M401461200
- Uytterhoeven, V; Lauwers, E; Maes, I; Marrink, S jan; Uytterhoeven, V; Lauwers, E; Maes, I; Miskiewicz, K; Melo, MN & Swerts, J. (2015). **Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy Article Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy**, 735–748. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.012
- Vessoni, AT; Filippi-Chiela, EC; Menck, CF & Lenz, G. (2013). **Autophagy and genomic integrity.** *Cell Death and Differentiation*, **20**(11): 1444–54. doi:10.1038/cdd.2013.103
- Wang, C; Chen, S; Yeo, S; Karsli-Uzunbas, G; White, E; Mizushima, N; Virgin, HW & Guan, JL. (2016). **Elevated p62/SQSTM1 determines the fate of autophagy-deficient neural stem cells by increasing superoxide.** *Journal of Cell Biology*, **212**(5): 545–560. doi:10.1083/jcb.201507023
- White, E. (2015). **The role for autophagy in cancer.** *The Journal of Clinical Investigation*, **125**(1): 42–46. doi:10.1172/JCI73941.Autophagy
- Wilson III, DM & Iyama, T. (2013). **DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells.** *DNA Repair*, **12**(8): 620–636. doi:doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- Xilouri, M; Brekk, OR & Stefanis, L. (2016). **Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies.** *Movement Disorders*, **31**(2): 178–192. doi:10.1002/mds.26477
- Yang, S; Wang, X; Contino, G; Liesa, M; Sahin, E; Ying, H; Bause, A; Li, Y; Stomme, JM; Dell'Antonio, G; Mautner, J; Tonon, G; Haigis, M; Shirihai, OS; Doglioni, C; Bardeesy, N & Kimmelman, AC. (2011). **Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth.** *Genes and Development*, **25**(7): 717–729. doi:10.1101/gad.2016111
- Yoon, SY & Kim, DH. (2016). **Alzheimer's disease genes and autophagy.** *Brain Research*, **1649**(Pt B): 201–209. doi:10.1016/j.brainres.2016.03.018
- Yu, X; Muñoz-Alarcón, A; Ajayi, A; Webling, KE; Steinhof, A; Langel, Ü & Ström, AL. (2013). **p53-mediated disruption of FIP200 function cause autophagic dysregulation in a SCA7 polyglutamine disease model.** *Molecular Neurodegeneration*, **8**(Suppl 1): 68. doi:10.1007/s12031-013-0012-x
- Zappavigna, S; Luce, A; Vitale, G; Merola, N; Facchini, S & Caraglia, M. (2013). **Autophagic cell death: A new frontier in cancer research.** *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **4**(February): 250–262. doi:10.4236/abb.2013.42034
- Zare-shahabadi, A; Masliah, E; Johnson, GVW & Rezaei, N. (2015). **Autophagy in Alzheimer's disease.** *Reviews in the Neurosciences*, **26**(4): 1477–1490. doi:10.1515/revneuro-2014-0076

- Zhang, HQ; He, B; Fang, N; Lu, S; Liao, YQ & Wan, YY. (2013). **Autophagy inhibition sensitizes cisplatin cytotoxicity in human gastric cancer cell line Sgc7901.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **14**(8): 4685–4688. doi:10.7314/APJCP.2013.14.8.4685
- Zhang, K & Taylor, JS. (2001). **Phototriggered formation and repair of DNA containing a site-specific single strand break of the type produced by ionizing radiation or AP lyase activity.** *Biochemistry*, **40**(1): 153–159. doi:10.1021/bi001781j
- Zhang, YW; Otterness, DM; Chiang, GG; Xie, W; Liu, YC; Mercurio, F & Abraham, RT. (2005). **Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway.** *Molecular Cell*, **19**(5): 607–618. doi:10.1016/j.molcel.2005.07.019

## XIII. ANEXOS

---

La preparación de las soluciones, y el número de catálogo de cada uno de los materiales y compuestos utilizados se encuentra separado como en la metodología.

### 1. Cultivo celular:

#### 1.1. Medios de cultivo:

1.1.1. DMEM: gibco® by life technologies® DMEM (1X) + GlutaMAX™-I Dulbecco's Modified Eagle Medium. Cat#10569-010

1.1.2. DMEM F12: gibco® by life technologies® DMEM / F12 + GlutaMAX™-I (1X) Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12 (Ham) 1:1. Cat#10565-018

1.1.3. FBS: gibco® by life technologies® FBS Fetal Bovine Serum, Certified 500 mL. Cat #16000-044.

-Inactivar por calor en baño María a 65°C durante 1 hora.

#### 1.1.4. Antibiótico:

-gibco® by life technologies® Penicillin Streptomycin ([+] 10,000 Units/mL Penicillin, [+] 10,000 µg/mL Streptomycin). Cat #15140-122

-SIGMA® Penicillin-Streptomycin solution (10,000 Units/mL Penicillin, 10 mg/mL Streptomycin). Cat #P0781.

1.1.5. DMSO: SIGMA® Dimethyl Sulphoxide (DMSO), biotechnology performance certified 50 mL. Cat #D2438.

#### 1.1.6. **Medio de cultivo completo:**

Preparación: 500 mL

-50 mL de FBS

-5 mL de antibiótico

-445 mL de medio DMEM / DMEM F12

#### 1.1.7. **MEFs medio de congelación:**

Preparación: 15 mL

-10% de DMSO: 1.5 mL de DMSO en 13.5 mL de suero fetal bovino

#### 1.1.8. **A549 medio de congelación:**

Preparación: 15 mL

-5% de DMSO: 0.75 mL de DMSO en 14.25 mL de medio DMEM F12 completo

1.2. *Trypsina*: gibco® by life technologies® 0.25% Trypsin-EDTA (1X). Cat #25200-072.

1.3. *Azul de tripano*: gibco® by life technologies® Trypan blue stain (0.4%). Cat #15250-061

- 1.4. **PBS:** OXOID Phosphate Buffered Saline (Dulbecco A). Cat #BR0014G.  
Preparación: 100 mL  
-En esterilidad, agregar 1 pastilla en 100 mL de agua bidestilada estéril.  
-Esterilizar
- 1.5. Guantes: SUPRENO® SE powder-free nitrile disposable gloves Cat #SU-690-I-S
- 1.6. Parafilm: Parafilm® laboratory film Bemis flexible packaging. Cat #PM-999
- 1.7. *Placas para cultivo:*
  - 1.7.1. Caja 150 mm: CORNING Cell culture dish 150mmx25mm Style. Cat #430599.
  - 1.7.2. Caja 100 mm: CORNING Cell culture dish 100mmx20mm Style. Cat #430167.
  - 1.7.3. Caja 60 mm: CORNING Cell culture dish 60mmx15mm Style. Cat #430196.
  - 1.7.4. Caja 35 mm: CORNING Cell culture dish 35mmx10mm Style. Cat #430165.
  - 1.7.5. Placa 6 pozos: Corning Incorporated COSTAR® 6 well cell culture cluster. Cat #3516.
  - 1.7.6. Placa 12 pozos: Corning Incorporated COSTAR® 12 well cell culture cluster. Cat #3512.
  - 1.7.7. Placa 24 pozos: Corning Incorporated COSTAR® 24 well cell culture cluster. Cat #3524.
  - 1.7.8. Placa 96 pozos: Corning Incorporated COSTAR® 96 well cell culture cluster. Cat #3599.
  - 1.7.9. Placa 4 pozos: Nunclon™ Δ Surface fertilization 4 well plate. Cat #144444.
- 1.8. Propipeta: Drummond Pipet-Aid XP
- 1.9. *Pipetas:*
  - 1.9.1. Pipeta 25 mL: Corning Incorporated COSTAR® 25 mL Stripette®. Cat #4489.
  - 1.9.2. Pipeta 10 mL: Corning Incorporated COSTAR® 10 mL Stripette®. Cat #4488.
  - 1.9.3. Pipeta 5 mL: Corning Incorporated COSTAR® 5 mL Stripette®. Cat #4487.
  - 1.9.4. Pipeta 2 mL: Corning Incorporated COSTAR® 2 mL Stripette®. Cat #4486.
- 1.10. *Micropipeta:*
  - 1.10.1. P1000: GILSON Pipetman 100 – 1000 µL
  - 1.10.2. P200: GILSON Pipetman 20 – 200 µL
  - 1.10.3. P20: GILSON Pipetman 2 – 20 µL
  - 1.10.4. P10: GILSON Pipetman 1 – 10 µL
  - 1.10.5. P2: RAININ Pipet·plus 0.1 – 2 µL
- 1.11. *Puntas para micropipeta:*
  - 1.11.1. 1000 µL: RAININ 1000 µL LTS® tips. Cat #RL-1000.
  - 1.11.2. 200 µL: RAININ 200 µL LTS® tips. Cat #RC-L250/10.
  - 1.11.3. 20/10/2 µL: DIAMOND® ECO·PACK™ 10µL Tip Volume Range. Cat #F161630.
- 1.12. *Tubos:*
  - 1.12.1. Tubo de 50 mL: CORNING 50 mL Centrifuge tube. Cat #430829.
  - 1.12.2. Tubo de 15 mL: CORNING 15mL Centrifuge tube. Cat #430055.
  - 1.12.3. Tubo de 2 mL: Axygen® Microtubes Homo-polymer, boil-proof 2.0 mL CLEAR. Cat #MCT-200-C
  - 1.12.4. Tubo de 1.5 mL: Axygen® Microtubes Homo-polymer, boil-proof 1.5 mL CLEAR. Cat #MCT-150-C

1.12.5. Tubo de 0.6 mL: Axygen® Microtubes Homo-polymer, boil-proof 0.6 mL CLEAR. Cat #MCT-060-C

1.12.6. Vial de congelación: CORNING® Cryogenic vial 2.0 mL. Cat #430488.

1.13. *Filtros:*

0.20 µm: CORNING® 28 mm Syringe filter® 0.20 Micron. Cat #431228.

**2. Inducción de daño al DNA y evaluación por ensayo cometa:**

2.1. *Irinotecán:* Irinkan (clorhidrato trihidratado de Irinotecán, 677.1 g/mol, solución inyectable (100 mg/5 mL). PiSA oncológicos. Lote: L102039.

2.2. **Agarosa de punto de fusión normal (Normal Melting Point Agarose, NMPA):** INVITROGEN™ UltraPure™ Agarose 500 g. Cat #16500-500.

Preparación: 50 mL a 0.75%

-0.375 g en 50 mL de agua bidestilada en un matraz de 125 mL

-Calentar en microondas hasta disolverla por completo

-Dejar enfriar y cubrir con parafilm

-Mantener a temperatura ambiente

2.3. **Agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point Agarose, LMPA):** BIO-RAD Certified™ Low Melt Agarose 125 g. Cat #161-3112.

Preparación: 10 mL a 0.75%

-0.075 g en 10 mL de agua bidestilada en un vaso de precipitados de 30 mL

-Calentar en microondas hasta disolver por completo

-Dejar enfriar y alicuotar en tubos Eppendorf de 1.5 mL

-Mantener en refrigeración a 4°C

2.4. *Metanol:* SIGMA-ALDRICH® Methanol 2 L. Cat #322415-2L.

2.5. *Etanol 96%:* comprador en el almacén del Instituto de Fisiología Celular.

2.6. *Portaobjetos:*

-CORNING® Micro Slides, Single Frosted Pre-Cleaned 75x25 mm, thickness 0.96 – 1.06mm. Cat #2948-75X25.

-MADESA® Portaobjetos para microscopio esmerilado 25 x 75 mm. Cat #7 503004 306046.

2.7. *Cubreobjetos:* MADESA M.I.R. 100 22x22 mm.

2.8. *Soluciones stock:*

2.8.1. **EDTA:** SIGMA® Ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt dihydrate 250 g. Cat #E5134-250G.

Preparación: 500 mL a 500 mM a pH=10

- 93 g en 450 mL de agua bidestilada

-Ajustar pH a 10

-Aforar a 500 mL

2.8.2. **NaOH:** SIGMA-ALDRICH® Sodium hydroxide 1 kg. Cat #S5881-1KG.

Preparación: 250 mL a 10 N

-100 g en 200 mL

-Aforar a 250 mL

Mantener a temperatura ambiente en un recipiente de vidrio color ámbar.



- 2.8.3. NaCl: J.T.Baker Cloruro de sodio, cristal. Cat #3624-01.  
Preparación: 500 mL a 5 M  
-146.125 g en 450 mL de agua bidestilada  
-Aforar a 500 mL
- 2.8.4. Tritón X-100: SIGMA® Triton® X-100 100 mL. Cat #T8532-100ML.
- 2.8.5. Tris básico: SIGMA® Trizma® base. Cat #T1503-1KG.  
Preparación: 50 mL a 500 mM, pH=10  
-3.02 g en 30 mL de agua bidestilada  
-Ajustar pH a 10  
-Completar volumen a 50 mL

2.9. **Buffer de lisis alcalina:**

- Preparación: 50 mL  
-10 mM de Tris básico (pH=10): 1 mL de Tris básico 500 mM (pH=10)  
-2.5 M de NaCl: 25 mL de NaCl 5 M  
-100 mM de EDTA: 10 mL de EDTA 500 mM (pH=10)  
-1% de Tritón X-100: 500 µL de Tritón X-100 al 100% \*Agregar hasta el momento de usar el buffer de lisis  
Almacenar a 4°C

2.10. **Buffer de electroforesis alcalina:**

- Preparación: el volumen necesario para cada experimento.  
Para 500 mL:  
-300 mM de NaOH: 15 mL de NaOH 10 N  
-1 mM de EDTA: 1 mL de EDTA 500 mM (pH=10)

2.11. **Buffer de neutralización:**

- Preparación: 500 mL  
-500 mM de Tris HCl: 39.4 g de Tris HCl  
Ajustar a pH=7.5

2.12. **Sybr® Green:** molecular probes® by life technologies™ SYBR® Green nucleic acid gel stain (10,000X concentrate in DMSO). Cat #S7563.

- 2.12.1. Dilución 1:10,000 en PBS. Preparar lo suficiente para teñir todas las laminillas del experimento, considerando aproximadamente 700 µL por laminilla.

**3. SDS-PAGE / Western blot:**

3.1. *Espátula para células*: Corning Incorporated COSTAR® Cell scraper. Cat #3010.

3.2. *Soluciones stock:*

3.2.1. NaCl:

- Preparación: 500 mL a 5 M  
-146.125 g en 450 mL de agua bidestilada  
-Aforar a 500 mL

3.2.2. Persulfato de amonio (APS): BIO-RAD Ammonium Persulfate Cat #11-0700

- Preparación: 1 mL al 10%  
-0.1 g en 1 mL de agua

- 3.2.3. TEMED: BIO-RAD TEMED Cat #161-0800
- 3.2.4. SDS: BIO-RAD SDS Solution 20% (w/v). Cat #161-0418.  
Preparación: 10 mL al 10%  
-5 mL en 5 mL de agua
- 3.2.5. Tris HCl: SIGMA® Trizma® hydrochloride. Cat #T5941-1KG  
Preparación: 50 mL a 0.5 M, pH=8.5  
-3.940 g en 40 mL de agua  
-Ajustar pH=8.5  
-Aforar a 50 mL  
Preparación: 100 mL a 1.5 M, pH=8.8  
-23.64 g en 70 mL de agua  
-Ajustar pH=8.8  
-Aforar a 100 mL  
Preparación: 100 mL a 0.5 M, pH=6.8  
-7.88 g en 80 mL de agua  
-Ajustar pH=6.8  
-Aforar a 100 mL
- 3.2.6. EDTA: SIGMA® Ethylenediamine-tetraacetic acid disodium salt dihydrate 250 g. Cat #E5134-250G.  
Preparación: 500 mL a 500 mM a pH=10  
- 93 g en 450 mL de agua bidestilada  
-Ajustar pH a 10  
-Aforar a 500 mL
- 3.2.7. Igepal: SIGMA IGEPAL® CA-630. Cat #I8896-100ML  
Preparación: 2 mL al 10%  
-200 µL en 2 mL de agua bidestilada
- 3.2.8. Desoxicolato de sodio: SIGMA Sodium deoxycholate. Cat #30 970-25G  
Preparación: 2 mL al 10%  
-200 mg en 2 mL de agua bidestilada
- 3.3. PBS 10X:  
-8 g de NaCl: J.T.Baker Sodium chloride crystal 500 g Cat #3624-01  
-0.2 g de KCl: SIGMA® Potassium chloride 500 g Cat #P9541-500G  
-1.15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (anhidro): SIGMA® Sodium phosphate dibasic 250 g Cat #S3264-250G  
-0.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (anhidro): SIGMA® Potassium phosphate monobasic 100g Cat #P9791-100G  
Añadir 70 mL de agua Milli-Q.  
Ajustar pH=7.4 y aforar a 100 mL  
Esterilizar por autoclave
- 3.4. PBS 1X: 200 mL  
-20 mL de PBS 10x en 180 mL de agua Milli-Q (preparar en esterilidad)
- 3.5. Inhibidor de proteasas 10X: Roche cOMplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack. Protease inhibitor cocktail tablets supplied in foil blister packs. Cat #05 892 791 001.

Preparación: 1 mL

-Añadir una pastilla del buffer en 1 mL de agua Milli-Q. Mezclar en vórtex y hacer alícuotas de 100  $\mu$ L cada una.

3.6. **Inhibidor de fosfatasas 10X**: Roche phosSTOP EASYpack phosphatase inhibitor cocktail tablets supplied in foil blister packs. Cat #04 906 845 001.

Preparación: 1 mL

-Añadir una pastilla del buffer en 1 mL de agua Milli-Q. Mezclar en vórtex y hacer alícuotas de 100  $\mu$ L cada una.

3.7. **Buffer de lisis:**

3.7.1. **Buffer de SDS:**

Preparación: 50 mL

-62.5 mM de Tris HCl: 6.25 mL de Tris Cl 0.5 M, pH=6.8

-2% de SDS: 5 mL de SDS 20%

Ajustar a pH=6.8 y aforar a 50 mL

3.7.2. **Buffer de Igepal/desoxicolato de sodio:**

Preparación: 2 mL

-50 mM de Tris HCl: 200  $\mu$ L de Tris HCl 0.5 M

-100 mM de NaCl: 40  $\mu$ L de NaCl 5 M

-1 mM de EDTA: 4  $\mu$ L de EDTA 500 mM a pH=10

-0.1% de NP-40 (Igepal): 20  $\mu$ L de Igepal 10%

-0.25% de desoxicolato de sodio: 50  $\mu$ L de Desoxicolato de sodio 10%

-Inhibidor de proteasas 1X: 200  $\mu$ L de inhibidor de proteasas 10X

-Inhibidor de fosfatasas 1X: 200  $\mu$ L de inhibidor de fosfatasas 10X

Completar los 2 mL con agua destilada

3.8. Buffer de carga 5X:

Preparación: 9.5 mL a 5X

-3.55 mL de agua bidestilada

-1.25 mL de Tris HCl 0.5M, pH=6.8

-2.5 mL de glicerol

-2 mL de SDS 10%

-200  $\mu$ g de azul de bromofenol

Almacenar a 4°C. Al momento de usarse, se debe agregar 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Para que corra adecuadamente, usar a temperatura ambiente para evitar precipitados de SDS. Debe usarse en proporción 1:4 con la solución de proteínas.

3.9. Marcador de peso: BIO-RAD Precision Plus Protein™ Dual Color Standards. Cat #161-0374

3.10. Glicina: SIGMA Glycine for electrophoresis,  $\geq 99\%$ . Cat #G8898-500G.

3.11. Buffer de corrida Tris-Glicina 10X, pH=8.3:

Preparación: 1 L a 10X

-25 mM de Tris base: 30.3 g de Trizma base

-190 mM de Glicina: 144 g de glicina

-0.1% de SDS: 5 mL de SDS 20%

Ajustar el pH=8.3 con HCl

Aforar a 1L

3.12. **Buffer de corrida Tris-Glicina 1X:**

Preparación: 1 L a 1X

-100 mL de Buffer de corrida Tris-Glicina 10X en 900 mL de agua.

3.13. Membrana de fluoruro de polivileno (PVDF): Millipore Immobilon®-P Transfer membranes. Cat #IPVH00010

3.14. **Buffer de transferencia Tris-Glicina 1X:**

Preparación: 400 mL a 1X

-40 mL de Buffer de corrida Tris-Glicina 10X

-80 mL de metanol

Completar los 400 mL con 280 mL de agua bidestilada

3.15. **Ácido acético:** MERCK Ácido acético glacial min. 96% (aprox. 1.06) para análisis. Cat #202351 N Art. 62.

3.16. **Rojo de Ponceau:** material donado sin marca ni número de catálogo.

Preparación: 40 mL

-0.1% de Rojo de Ponceau: 40 mg

-5% de ácido acético: 2 mL de ácido acético

3.17. **TBS 10X:**

Preparación: 500 mL a 10X

-12.115 g de Trizma HCl

-40.03 g de NaCl

Ajustar el pH=7.6 con NaOH

Aforar a 500 mL

3.18. Tween 20: BIO-RAD 10% Tween 20 Solution. Cat #161-781.

3.19. TBST:

Preparación: 400 mL

-TBS 1X: 40 mL de TBS 10X

-0.1% de Tween 20: 4 mL de Tween 20 al 10%

3.20. Leche libre de grasas: BIORAD Blotting-grade blocker. Nonfat dry milk. Cat #170-6404.

3.21. Albúmina sérica bovina: Sigma Aldrich Bovine Serum Albumin. Cat #A7906-10G.

3.22. Soluciones Immobilon: Millipore / Immobilon™ Western Chemiluminiscent HRP Substrate. Cat #WBKL50100

3.23. Placa fotográfica: Amersham Hyperfilm™ ECL GE Healthcare Limited. Cat #28906839.

3.24. **Solución de revelador:** Sigma Aldrich Carestream® Kodak® autoradiography GBX developer/replenisher. Cat #1900984

Preparación: 250 mL

-50 mL en 200 mL de agua destilada. Aforar a 250 mL.

3.25. **Solución de fijador:** Sigma Aldrich Carestream® Kodak® autoradiography GBX fixer/replenisher. Cat #1901875

Preparación: 250 mL

-55 mL en 195 mL de agua destilada. Aforar a 250 mL.

#### 4. Inmunofluorescencia:

- 4.1. Cubreobjetos: Marienfeld Laboratory Glassware - Microscope cover glasses.  
Cat #0111580.
- 4.2. **Ácido acético al 30%:**  
Preparación: 500 mL al 30%  
-156.25 mL en 343.74 mL de agua bidestilada.
- 4.3. **Etanol:**  
Preparación: 500 mL al 70%  
-364.58 mL con 135.42 mL de agua bidestilada.  
Preparación: 500 mL al 85%  
-442.71 mL con 57.29 mL de agua bidestilada.  
Preparación: 500 mL al 90%  
-468.75 mL con 31.25 mL de agua bidestilada.
- 4.4. **Paraformaldehído (PFA):** Sigma Aldrich Paraformaldehyde reagent grade, crystalline. Cat #P6148-500G.  
Preparación: 50 mL de PFA 4%
1. Añadir 22.5 mL de PBS 1X en un vaso de precipitados dentro de la campana de extracción.
  2. Posteriormente, añadir 100  $\mu$ L de NaOH 5N.
  3. Calentar la solución a 65°C.
  4. Ya que se encuentre a esa temperatura, añadir 2 g de PFA y mantener en agitación y en la campana de extracción.
  5. Una vez disuelto, enfriar la solución con 22.5 mL de PBS 1X.
  6. Ajustar pH=7.2 con HCl.
  7. Aforar a 50 mL con PBS.
  8. Filtrar con filtro de 0.22  $\mu$ M.
- 4.5. **PBS/Tritón 0.5% v/v:**  
Preparación: 10 mL  
-Añadir 500  $\mu$ L de Tritón a 9.5 mL de PBS.
- 4.6. **PBS/BSA:**  
Preparación: 10 mL de PBS/BSA 5% p/v  
-Añadir 500 mg de BSA a 10 mL de PBS.  
Preparación: 10 mL de PBS/BSA 2% p/v  
-Añadir 200 mg de BSA a 10 mL de PBS.
- 4.7. **DAPI:** Sigma 4'-6-Diamidino-22-phenylindole dihydrochloride powder.  
Cat #D8417-5MG.  
Preparación: Stock 1 mL a 1 mg/mL  
-Añadir 1 mg de DAPI en 1 mL de agua bidestilada.  
Preparación: Solución para incubar en la inmunofluorescencia. 10 mL a 1  $\mu$ g/mL.  
-Añadir 10  $\mu$ L de la solución stock (1 mg/mL) en 10 mL de PBS.
- 4.8. VectaShield®: VECTOR VECTASHIELD® Mounting médium for fluorescence.  
Cat #H-1000.

## 5. Manipulación de la autofagia:

5.1. **Cloroquina**: Sigma Diphosphate Salt Chloroquine C-6628.

Preparación: Stock de 5 mL de Cloroquina 100 mM

-257.9 mg de difosfato de cloroquina en 3 mL de agua Milli-Q.

-Aforar a 5 mL en agua Milli-Q.

-Esterilizar por filtración en filtro de 0.22  $\mu$ M.

Mantener en refrigeración a 4°C y oscuridad.

5.2. **Trehalosa**: Sigma-Aldrich D-(+)-Trehalose dihydrate. Cat #90210-250G.

Preparación: Stock de 20 mL de Trehalosa 1 M.

-18.9165 g de trehalosa en 40 mL de PBS.

-Aforar a 50 mL en PBS estéril de cultivo celular.

-Esterilizar por filtración en filtro de 0.22  $\mu$ M.

Mantener en refrigeración a 4°C.

## 6. Equipos:

6.1. Hematocitómetro: LW Scientific hemacytometer. Bright-Line Counting Chamber. Double Neubauer Improved. Cat # MKT-7.5.3-L-120

6.2. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0: Thermo SCIENTIFIC.

6.3. Sonicador: MISONIX Sonicator® 3000.

6.4. Cámara de electroforesis del Ensayo cometa: Hoefer® Sub13 Midi Submarine Gel. No. De serie: 3004214.

6.5. Cámara de electroforesis y transferencia de Western blot: Hoefer® MiniVE Vertical Electrophoresis system complete. No. De serie: 20073284 / 80-6418-77.

6.6. Fuentes de poder:

-Hoefer® PS300-B. Power supply. No. De serie: 30024557.

-Amersham Biosciences. Electrophoresis power supply. EPS301.

6.7. Centrífugas:

-Eppendorf Centrifuge 5702.

-Eppendorf Centrifuge 5415R.

-Eppendorf Centrifuge 5415D.

6.8. Incubadoras:

-Nuair

-Fisher Scientific Isotemp. Modelo #3530.

6.9. Campanas de flujo: N-BIOTEK Leading Technology.

6.10. Microscopios:

-Zeiss PrimoVert

-Nikon Japan 196514 AlphaPhot YS

-Nikon Eclipse Ti

6.11. Equipo de Milli-Q: Millipore Milli-Q® Synthesis A10.