



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis de marcadores de envejecimiento en el ratón deficiente de la proteasa Atg4b
y su asociación con el desarrollo de fibrosis pulmonar**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

Mariana Maciel Herrerías

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Sandra Cabrera Benítez

Facultad de Ciencias, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Diana María Escalante Alcalde

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Gisela Ceballos Cancino

Instituto Nacional de Medicina Genómica.

MÉXICO, CD. MX.

NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**Análisis de marcadores de envejecimiento en el ratón deficiente de la proteasa Atg4b
y su asociación con el desarrollo de fibrosis pulmonar**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:

Mariana Maciel Herrerías

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dra. María Sandra Cabrera Benítez

Facultad de Ciencias, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Diana María Escalante Alcalde

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. Gisela Ceballos Cancino

Instituto Nacional de Medicina Genómica.

MÉXICO, CD. MX.

NOVIEMBRE 2018

OFICIO DE EMPASTE



COORDINACIÓN

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

OFICIO FCIE/DAIP/1062/2018

ASUNTO: **Oficio de Jurado**

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **24 de septiembre de 2018**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **MACIEL HERRERÍAS MARIANA** con número de cuenta **307204947** con la tesis titulada: "**Análisis de marcadores de envejecimiento en el ratón deficiente de Atg4b y su asociación con el desarrollo de fibrosis pulmonar**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA SANDRA CABRERA BENÍTEZ**:

Presidente:	DRA. ANNIE PARDO CEMO
Vocal:	DRA. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ
Secretario:	DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Suplente:	DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN
Suplente:	DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 5 de noviembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/VMVA/ASR/mnm

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM**, por haberme dado la oportunidad de formar parte de un posgrado de excelencia. Desde que fui aceptada, esto ha significado un gran reto personal y profesional para mí, ya que el posgrado me dio la oportunidad de abrir mi mente y poder hacer diversas actividades que sin duda, me enriquecieron académica y personalmente.

Cada asignatura que tomé fue impartida por investigadores excelentes que no sólo me enseñaron infinidad de conceptos y áreas nuevas, sino que también reafirmaron mi amor y mi pasión por esta rama de la biología. Gracias a cada uno de esos profesores por sembrar en mí la semilla del conocimiento y la curiosidad y por ser un gran modelo a seguir.

Gracias a los apoyos económicos recibidos para poder realizar y concluir mis estudios y mi investigación, en especial a la **beca CONACyT 330289**, a los **apoyos PAEP** para la asignación de recursos para poder asistir a congresos internacionales, al **proyecto de investigación CONACyT 235891** por los recursos otorgados para la realización de mi tesis, **y al proyecto de investigación PAPIIT IN211818** por el apoyo otorgado para la conclusión de mis estudios de doctorado.

Agradezco a la **Dra. Sandra Cabrera Benítez**, mi tutora, por enseñarme lo que es la ciencia, por haberme guiado y formado desde la licenciatura, y por darme la oportunidad de seguir trabajando con ella.

También quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial, la **Dra. Gisela Ceballos Cancino** y la **Dra. Diana Escalante Alcalde**, por siempre tener la mejor disponibilidad y por todos sus comentarios y sugerencias a lo largo de estos 4 años, los cuales hicieron que este proyecto se enriqueciera.

Agradezco a los integrantes del jurado, la **Dra. Annie Pardo Cemo**, la **Dra. Ma. De Lourdes Segura Valdez**, la **Dra. Gisela Ceballos Cancino**, la **Dra. Susana Castro Obregón** y la **Dra. Vilma Maldonado Lagunas**, por todos los comentarios y correcciones hechas al manuscrito de mi tesis. Gracias por aceptar formar parte de mi jurado y de igual manera, enriquecer este proyecto con sus observaciones.

Finalmente, quiero agradecer al **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER**, en especial al **Dr. Moisés Selman Lama**, al responsable del bioterio, el **Dr. Alberto Pizaña Venegas** y a su personal, así como a Érika Monterrubio y Guadalupe Hiriart, responsables del departamento de histología de esa institución.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Este trabajo ha sido por y para mi mamá, **Leticia Herrerías Bernal**. Mami te agradezco por todo lo que has hecho por mí, por todos tus sacrificios y por todo lo que me has exigido y enseñado. Sé que yo no sería ni la mitad de lo que soy ahorita, de no ser por ti. Desde que te dije que quería estudiar biología, siempre me has impulsado. Cada enseñanza tuya me ha ayudado a crecer, a entender muchas cosas y a tratar de ser mejor persona y profesionalista cada día. Gracias por siempre exigirme más, nunca has dejado que me caiga, porque siempre que me has visto frustrada o cansada, estás ahí para decirme que debo seguir y no dejar nada incompleto. Eres mi mayor ejemplo. Esto es para nosotras dos. Espero con esto, retribuirte un poco de lo que tu me has dado y hacerte sentir orgullosa de mi, así como yo lo estoy de ti. Te amo mamita, te dedico mi trabajo y esto es un pequeño paso para poderte dar en un futuro todo lo que tú te mereces.

Agradezco a la persona que me enseñó lo que es la ciencia, la **Dra. Sandra Cabrera Benítez**. Gracias por no sólo enseñarme cómo hacer experimentos y cómo ser buena estudiante sino también por enseñarme la experiencia de los congresos, por apoyarme en irme de estancia y por estar pendiente de mí durante esa etapa, y sobretodo gracias por también seguirme impulsando a llegar más lejos.

También quiero dedicar este trabajo a **Emmanuel Camacho Morales**. Me has venido a cambiar la vida en muchos aspectos, llegaste a la mitad de mi doctorado y aquí sigues, a pesar de todo y de todos. Has estado en los momentos más difíciles, y también en los más increíbles de esta etapa. Gracias por estudiar conmigo cuando te lo pedía, por aconsejarme, por aguantarme en mis días de estrés, desesperación y frustración. Gracias por soñar y por querer llegar lejos conmigo. Gracias por ayudarme y escucharme cuando más lo he necesitado, por entender mis dudas y mis miedos. Los viajes, las risas, los lugares y las experiencias que hemos vivido juntos, me han hecho que agradezca a la vida el haber encontrado a alguien como tu. Me has enseñado innumerables cosas, entre ellas, aprender de todo, de lo bueno de lo malo, a disfrutar cada día, y sobretodo que la distancia no importa, que el estar lejos aunque sea difícil, es luchar por nuestros sueños para algún día poder estar juntos y satisfechos con nosotros mismos y así valga más la pena cada día que hayamos pasado lejos el uno del otro.

Quiero agradecer de manera especial a mi tía **Ana Laura Mena Herrerías**. Gracias por siempre ayudarme y hacerme sentir tu apoyo. Te quiero mucho y este trabajo también te lo dedico con mucho cariño.

Gracias a mis primos **Claudia y Mauricio Ramírez**, y a mi tío **Antonio Ramírez**, porque la vida nos juntó de nuevo y me permite tenerlos conmigo en esta etapa tan importante de mi vida. Gracias a mi hermana **Jazmín Maciel Herrerías**, mi pequeña sobrina **Renata Márquez**, y mi abuela **Ofelia Bernal**.

Gracias a mi amigo y compañero del laboratorio, **Daniel Hernández Barrientos**, quién siempre tuvo la disposición de ayudarme con mis experimentos, y ha hecho que el laboratorio sea un lugar más divertido.

Gracias a **Saúl Soberanes**, quién me recibió en su casa de Chicago, sin siquiera conocerme y por petición de Sandra. Te convertiste en un gran amigo para mí, gracias por siempre hacerme reír con tus ocurrencias, por hacer de mi estancia en Northwestern una experiencia muy divertida, y por ayudarme dentro y fuera del laboratorio durante el tiempo que estuve ahí.

*“I realized that science was where I actually belonged
I chose science because science gave me what I needed—a home as defined
in the most literal sense: a safe place to be.
The lab is the place where I put my brain out on my fingers and I do things.
Is a place where my guilt over what I haven’t done is supplanted by all of the
things that I am getting done. My uncalled parents, unpaid credit cards,
unwashed dishes, and unshaved legs pale in comparison to the noble
breakthrough under pursuit.
The lab is a place where I can be the child that I still am. I can laugh in the
lab and be ridiculous
All the baffling things that arrived unwelcome with adulthood, none of them
matter when I am in the lab. There is no phone and so it doesn’t hurt when
someone doesn’t call me. The outside world cannot come into the lab, the lab
has become the place where I can be the real me.
My laboratory is like a church because it is where I figure out what I believe.
Elevated to my best self, I strive to do each task correctly.
The lab is a place to go on sacred days, as is a church. On holidays, when
the rest of the world is closed, my lab is open. The lab is a refuge and an
asylum. It is my retreat from the professional battlefield; it is the place where
I coolly examine my wounds and repair my armor”*

Fragmento tomado del libro Lab girl de Hope Jahren.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
ANTECEDENTES.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
ENVEJECIMIENTO	
<i>I. Aspectos moleculares del envejecimiento</i>	5
<i>II. Proteostasis en el envejecimiento</i>	6
AUTOFAGIA	9
<i>I. Biogénesis de los autofagosomas</i>	10
PROTEASAS ATG4 Y SU RELEVANCIA EN LA AUTOFAGIA	15
<i>I. La familia de las cisteín proteasas ATG4 en mamíferos</i>	16
<i>II. ATG4B: La principal enzima en la vía de la autofagia</i>	17
<i>III. Mecanismo de acción y regulación de la actividad de ATG4B</i>	21
AUTOFAGIA Y ENVEJECIMIENTO	26
ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO	30
<i>I. Principales componentes y marcadores de la respuesta UPR</i>	32
<i>II. IRE1α</i>	32
<i>III. XBP1</i>	32
<i>IV. ATF6</i>	33
<i>V. BIP/GRP78</i>	34
<i>VI. PERK</i>	35
<i>VII. CHOP</i>	35
<i>VIII. Estrés de retículo endoplásmico y autofagia</i>	36
<i>IX. Estrés de retículo endoplásmico y envejecimiento</i>	39

ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES FIBROSANTES -----	41
<i>I. Fibrosis pulmonar idiopática</i> -----	42
<i>II. La proteostasis en la fibrosis pulmonar idiopática: el papel de la autofagia y el estrés de retículo endoplásmico</i> -----	43
RATÓN MODIFICADO GENÉTICAMENTE DEFICIENTE EN LA PROTEASA ATG4B ---	45
HIPÓTESIS -----	47
OBJETIVO -----	47
OBJETIVOS PARTICULARES -----	47
MATERIAL Y MÉTODOS -----	48
RESULTADOS -----	54
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES -----	77
REFERENCIAS -----	83

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Características moleculares del envejecimiento-----	6
FIGURA 2. El envejecimiento se caracteriza por un colapso en la proteostasis -----	8
FIGURA 3. La autofagia se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas -----	10
FIGURA 4. Representación esquemática de las distintas etapas de la autofagia en mamíferos-----	11
FIGURA 5. Participación de los sistemas de conjugación durante la formación de los autofagosomas----	13
FIGURA 6. La autofagia contribuye a la eliminación y reciclaje de material intracelular-----	15
FIGURA 7. Los sustratos de la familia Atg8 son esenciales para la formación y maduración de los autofagosomas-----	17
FIGURA 8. Localización de ATG4B en el cromosoma de ratón y humano y la interacción de esta proteasa con otras proteínas-----	19
FIGURA 9. Las distintas proteasas ATG4 procesan a los diferentes sustratos esenciales para la formación y maduración de los autofagosomas-----	20
FIGURA 10. La estructura de ATG4B muestra similitudes con otras cisteín proteasas. -----	22
FIGURA 11. Diagrama topológico de ATG4B. -----	23
FIGURA 12. ATG4B procesa a LC3 y posteriormente lo libera de la membrana de los autofagosomas-----	24
FIGURA 13. ATF6, PERK e IRE1, son los tres sensores del RE que controlan la activación de la respuesta UPR.-----	36
FIGURA 14. Representación del locus WT de Atg4b -----	49
FIGURA 15. Representación de la extracción de DNA -----	49
FIGURA 16. Reacción de PCR y secuencia de unión de los primers HT, WT y KO-----	50
FIGURA 17. Modelo de inducción de estrés de RE con tunicamicina -----	51
FIGURA 18. La tunicamicina induce cambios en la morfología celular y rompimiento de las uniones intercelulares-----	55
FIGURA 19. Activación de autofagia en células MLE12 tratadas con tunicamicin -----	56
FIGURA 20. La inhibición de la autofagia hace a las células epiteliales alveolares de ratón más vulnerables a la apoptosis después del estrés del RE inducido por tunicamicina -----	57
FIGURA 21. Incremento en la activación de caspasa 3 en las células MLE2 tratadas con tunicamicina en presencia de cloroquina. -----	58
FIGURA 22. Productos de amplificación obtenidos por PCR -----	59
FIGURA 23. La inhibición de autofagia por deficiencia de Atg4b resulta en la activación moderada de biomarcadores de estrés del RE -----	60
FIGURA 24. Localización de XBP1, CHOP y BiP en el pulmón de ratones WT y Atg4b ^{-/-} en condiciones basales. -----	62
FIGURA 25. Respuesta inflamatoria incrementada en los pulmones de ratones Atg4b ^{-/-} después del tratamiento con tunicamicina-----	63

- FIGURA 26.** Localización de los marcadores de estrés BiP, XBP1 y CHOP en el pulmón de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} después de tres días de inducir estrés del RE-----**65**
- FIGURA 27.** El tratamiento con tunicamicina induce un incremento en Bip y CHOP, pero no en XBP1, en pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-}. -----**67**
- FIGURA 28.** El tratamiento con tunicamicina induce la activación de autofagia en los pulmones de los ratones WT, pero no en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-}-----**69**
- FIGURA 29.** La deficiencia de *Atg4b* resulta en un aumento de la expresión de NFκB y CAS3 en el pulmón del ratón mutante a los 3 días después de la administración de tunicamicina. -----**71**
- FIGURA 30.** La ausencia de *Atg4b* y la deficiencia de la autofagia sensibilizan a los ratones al desarrollo de fibrosis pulmonar-----**72**
- FIGURA 31.** Actividad apoptótica e inflamatoria persistentes en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-} posterior a 21 días de la inducción de estrés del RE con tunicamicina. -----**73**

ABREVIATURAS

FPI (Fibrosis Pulmonar Idiopática)
RE (Retículo endoplásmico)
HSP (Heat Shock Protein)
CDKs (Cyclin-dependent kinases)
ROS (Reactive Oxygen Species)
ATG (Autophagy-related)
Fosfatidiletanolamina (PE)
mTOR (mammalian Target of Rapamycin)
MAP1LC3 (Microtubule Associated Protein 1 Ligth-chain 3)
GABARAP (Gamma γ -aminobutyric acid-receptor-associated protein)
GATE-16 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa)
LIR (LC3-interacting region)
RNF5 (ring finger protein 5)
CMA (Chaperone-mediated autophagy)
UPR (Unfolded Protein Response,
IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1- α),
PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)
ATF6 α (activating transcription factor 6)
ERAD (ER-associated degradation)
XBP1 (X-box binding protein 1)
XBP1-U (XBP1 unspliced)
XBP1-S (XBP1 spliced)
RIDD (regulated IRE1-dependent decay)
BIP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein/78kDa glucose-regulated protein
eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor-2)
CHOP (C/EBP Homologous Protein)
LC3-I (forma citosólica o no lipidada)
LC3-II (forma lipidada asociada a las membranas de los autofagosomas)
TM (tunicamicina)
CQ (Cloroquina)
PI (Ioduro de propidio)
MLE-12 (Mouse lung epithelial cell line)
CAS3 (Caspasa 3)
WT (Wild type)
KO (Knockout)
H&E (Hematoxilina & Eosina)
NF κ B (Nuclear factor kappa B)
SFTPC (Surfactant protein C)
MUC5B (Mucin 5B)

RESUMEN

El envejecimiento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), un patología pulmonar progresiva y generalmente letal. Aunque los mecanismos patogénicos de esta enfermedad aún no están claros, el estrés del retículo endoplasmático (RE) y los defectos en la proteostasis que, también se han relacionado con el envejecimiento, están fuertemente asociados con la patogénesis de la FPI. Utilizando como modelo los ratones deficientes en la proteasa *Atg4b*, que reproduce parcialmente las condiciones de disminución de la autofagia reportadas en el envejecimiento y en pulmones de FPI, mostramos por primera vez *in vivo* cómo los defectos en la autofagia y la inducción del estrés de retículo endoplásmico (RE), contribuyen simultáneamente al desarrollo de fibrosis pulmonar. Observamos que cuando ratones deficientes de *Atg4b* son tratados con tunicamicina, un inductor del estrés de RE, tienen una expresión incrementada de marcadores de estrés de RE, inflamación y apoptosis de células epiteliales alveolares en comparación con ratones WT. Después del tratamiento con tunicamicina, los pulmones deficientes de *Atg4b* muestran acumulación LC3-I, lo que demuestra que estos ratones a pesar de las condiciones de estrés de RE, no inducen la autofagia. También demostramos que la deficiencia de la autofagia en los pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-}, está asociado con un daño pulmonar exacerbado, apoptosis del epitelio alveolar y desarrollo de fibrosis pulmonar a los 21 días después del tratamiento con tunicamicina. Estos hallazgos indican que la proteína ATG4B y la autofagia son esenciales para atenuar el estrés de RE inducido por la tunicamicina y prevenir la apoptosis de las células epiteliales y el desarrollo de fibrosis pulmonar.

ABSTRACT

Aging is the main risk factor for the development of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a progressive and usually lethal lung disorder. Although the pathogenic mechanisms are uncertain, endoplasmic reticulum (ER) stress and impaired proteostasis that have been linked with aging are strongly associated with the pathogenesis of IPF. Using the Atg4b-deficient mice as a model, that partially reproduces the autophagy deficient conditions reported in aging and IPF lungs, we show for the first time how autophagy impairment and ER stress induction, contribute simultaneously to development of lung fibrosis in vivo. Increased expression of ER stress markers, inflammation and apoptosis of alveolar epithelial cells were observed in Atg4b-deficient mice compared to WT mice, when treated with the ER stress inducer tunicamycin. After tunicamycin treatment, Atg4b null lungs showed accumulation of its substrate LC3-I, demonstrating that these mice failed to induce autophagy despite the ER stress conditions. We also showed that compromised autophagy in lungs from Atg4b null mice is associated with exacerbated lung damage, epithelial apoptosis and the development of lung fibrosis at 21 days after tunicamycin treatment. Our findings indicate that ATG4B protein and autophagy are essential to mitigate ER stress and to prevent tunicamycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis.

ANTECEDENTES

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una de las patologías pulmonares más agresivas (Selman et al., 2010). El origen de esta enfermedad es aún desconocido, sin embargo, diversos estudios han mostrado que la muerte de las células epiteliales alveolares debido a daños crónicos, es un evento clave que desencadena una respuesta de cicatrización o reparación aberrante, lo que resulta en un depósito excesivo de matriz extracelular que obstruye los espacios alveolares e impide el intercambio gaseoso. Como consecuencia de esto, los pacientes que padecen esta enfermedad presentan dificultades para respirar (Selman & Pardo, 2006; Pardo & Selman, 2016).

La FPI afecta principalmente a personas mayores de 65 años, por lo que se ha propuesto que es una enfermedad asociada al envejecimiento (Selman & Pardo, 2014). Actualmente, esta enfermedad no tiene cura, y el único tratamiento efectivo es el trasplante pulmonar. Los mecanismos moleculares que están asociados al desarrollo de esta enfermedad, aún no son claros, sin embargo, se ha propuesto que el desarrollo de FPI está asociado con un envejecimiento acelerado del pulmón, el cual está caracterizado por un incremento en la senescencia celular y una pérdida en la capacidad de reparación del epitelio alveolar, lo que lo hace más susceptible al daño (Minagawa et al., 2011; Chilosi et al., 2013; Selman et al., 2016).

Durante el envejecimiento, diversos procesos celulares se deterioran y afectan la capacidad de las células para responder ante algún daño. Entre las funciones celulares afectadas, se encuentran los mecanismos de proteostasis, lo que conlleva a alteraciones en el plegamiento y degradación de las proteínas. Se ha propuesto que una característica del envejecimiento es la pérdida de la proteostasis la cual se ha observado también en diversas enfermedades asociadas a la edad (López-Otín et al., 2013). Las proteínas mal plegadas pueden llegar a acumularse en el citoplasma o en organelos como el RE, en este último induciendo estrés de RE, un mecanismo que si no se resuelve adecuadamente, puede conducir a la muerte celular. La eliminación de estos agregados tóxicos en el retículo endoplásmico, se da principalmente por la autofagia (Varadarajan et al., 2012; Olzmann et al., 2013). Este proceso de degradación intracelular contribuye al mantenimiento y supervivencia de las células, al remover proteínas dañadas o de larga vida, así como organelos que pueden

ser potencialmente dañinos para las células. Diversas investigaciones por separado, han mostrado que en el pulmón de pacientes con FPI, hay una acumulación de proteínas dañadas y un incremento en los niveles de estrés de retículo endoplásmico asociado con una severa disminución de la autofagia (Lawson et al., 2008; Korfei et al., 2008; Patel et al., 2012; Araya et al., 2013). En este trabajo, evaluamos el papel del estrés de retículo endoplásmico y la autofagia en el desarrollo de fibrosis pulmonar. Usando como modelo un ratón genéticamente modificado, deficiente de la proteasa ATG4B, que imita las condiciones de disminución de la autofagia en el pulmón observada en pacientes con FPI, mostramos cómo la inhibición de la autofagia exacerba el estrés de retículo endoplásmico y esto promueve una mayor inflamación en el pulmón y el desarrollo de fibrosis. Los resultados que se muestran en este trabajo, amplían el panorama acerca de los mecanismos involucrados con alteraciones en la proteostasis y su asociación con el desarrollo de FPI. Así mismo, en este trabajo proponemos que la modulación de la autofagia puede ser una estrategia terapéutica en el desarrollo de FPI.

INTRODUCCIÓN

ENVEJECIMIENTO

I. Aspectos moleculares del envejecimiento.

En años recientes, ha incrementado el interés y el número de investigaciones para entender los mecanismos moleculares que conllevan al envejecimiento. En 2013, López-Otín, et al., definieron al envejecimiento como *“el resultado en la disminución o alteración progresiva de distintos procesos celulares, lo cual conlleva a la pérdida de la integridad fisiológica incrementando la vulnerabilidad a la muerte”*. Así mismo, se propusieron nueve características moleculares que se han observado durante el envejecimiento de distintos organismos: senescencia celular, inestabilidad genómica, alteraciones en la comunicación intercelular y en la detección de nutrientes, cambios epigenéticos, acortamiento de telómeros, agotamiento en las poblaciones de células madre, alteraciones en las funciones mitocondriales y pérdida de la proteostasis (**Figura 1**). Estas nueve características han sido definidas como primarias, antagonistas e integrativas. Las características primarias son aquellos procesos que conllevan al daño molecular durante el envejecimiento, tales como la inestabilidad genómica, el acortamiento de telómeros, las alteraciones epigenéticas y la pérdida de la proteostasis (López-Otín et al., 2013). Alteraciones en la detección de nutrientes y en las funciones mitocondriales, así como la senescencia celular, han sido agrupadas dentro de las características antagonistas, ya que, la estimulación en bajos niveles de estos procesos, resulta en efectos benéficos al proteger a los organismos del daño y de la deficiencia de nutrientes, sin embargo, una mayor estimulación puede resultar en efectos deletéreos para las células. Por último, dentro de las características integrativas se encuentran el agotamiento en las poblaciones de células madre y alteraciones en la comunicación intercelular, las cuales se ha sugerido que ocurren como respuesta a la acumulación de un daño constante que no puede ser resuelto por mecanismos homeostáticos. Diversos estudios han mostrado que regular la actividad de cada uno de estos procesos, puede retrasar o disminuir los efectos asociados al envejecimiento (López-Otín et al., 2016).



FIGURA 1. Características moleculares del envejecimiento. Durante el envejecimiento se han descrito nueve procesos celulares que se encuentran alterados: inestabilidad genómica, acortamiento de telómeros, alteraciones epigenéticas, pérdida de la proteostasis, alteraciones en la comunicación intercelular y en la detección de nutrientes, disfunción mitocondrial, senescencia celular y agotamiento en las poblaciones de células madre (Tomada de **López-Otín et al., 2013**)

II. Proteostasis en el envejecimiento

La proteostasis se refiere a los mecanismos celulares que controlan la síntesis, plegamiento, localización y degradación de las proteínas. Diversos tipos de estrés dentro de las células, así como propiedades intrínsecas de las cadenas polipeptídicas, pueden afectar el plegamiento de las proteínas y alterar la proteostasis. La maquinaria de traducción, chaperonas y co-chaperonas, así como el sistema ubiquitina-proteosoma y la autofagia, conforman una red de proteostasis encargada de mantener la integridad del proteoma (Hetz, et al., 2015). Diferentes estudios han demostrado que durante el envejecimiento hay un deterioro de la proteostasis. Cuando ocurren alteraciones en el plegamiento de las proteínas, estas pueden llegar a acumularse y formar agregados tóxicos dentro de las células. Esto se ha visto principalmente en enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como en otras patologías asociadas al envejecimiento como las cardiomiopatías, o la FPI.

En cerebro se ha visto que durante el envejecimiento, más de 100 genes que codifican para chaperonas, se encuentran reprimidos, de los cuales 58 pertenecen a distintas familias de este tipo de proteínas, por ejemplo, las HSP (**H**eat **S**hock **P**roteins, por sus siglas en inglés) HSP90, HSP70, HSP60 y HSP40, las cuales **evitan** la formación de agregados proteotóxicos dentro de las células. De forma interesante, genes que codifican para estas familias de chaperonas, también se encuentran reprimidos en Alzheimer. Esto ha sugerido que el incorrecto plegamiento de las proteínas y el subsecuente colapso de la proteostasis, se debe en parte a alteraciones en la expresión de las chaperonas y esto podría estar asociado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento (Brehme et al., 2014).

Por otro lado, en piel y en linfocitos humanos, se ha visto que el contenido de proteosomas no cambia con la edad, sin embargo, su actividad disminuye en personas de edad avanzada, y esto podría estar asociado con la presencia de modificaciones post-traduccionales en ciertas subunidades del proteosoma que estarían afectando su función (Bulteau et al., 2000; Carrard G et al., 2003). Así mismo, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* en diferentes organismos, han demostrado que la inhibición del proteosoma o de la autofagia, induce senescencia y alteraciones metabólicas, disminuye la supervivencia celular e incrementa la acumulación de proteínas dañadas y la formación de agregados tóxicos (**Figura 2**). Estos resultados sugieren que defectos en la actividad del proteosoma y la autofagia, favorecen el desarrollo de fenotipos asociados al envejecimiento (Torres et al., 2006; Chondrogianni et al., 2003; Kang et al., 2011; Tomaru et al., 2012).

Por otro lado, se ha propuesto que la proteostasis contribuye en la estabilidad del material genético. El ratón deficiente en los genes que codifican para las chaperonas Hsp70.1 y Hsp70.3, desarrolla espontáneamente inestabilidad genómica y de telómeros, y muestra defectos en la reparación del DNA después del daño inducido por calor o radiación ionizante (Hunt et al., 2004). Así mismo, la actividad del proteosoma y la autofagia también están involucradas en el mantenimiento de la integridad genómica. La ubiquitinación y degradación vía proteasoma de proteínas como las ciclinas o las CDKs (**c**yclin-**d**ependent **k**inases, por sus siglas en inglés) es importante para mantener la regulación del ciclo celular y también para evitar la propagación de células que podrían estar acumulando daños en su genoma.

En el caso de la autofagia, se ha visto que este proceso celular es esencial para preservar la integridad del material genómico. La inhibición de la actividad autofágica, altera la reparación del DNA por medio de los mecanismos de recombinación homóloga y NHEJ (non-homologous end joining, por sus siglas en inglés) lo que conlleva a la acumulación de daño e inestabilidad genómica (Liu et al., 2015). Aunque estos resultados no han sido estudiados durante el envejecimiento, es importante mencionar que una de las características del envejecimiento y de enfermedades asociadas a la edad, es la inestabilidad genómica, por lo que no se debe descartar que las alteraciones en la proteostasis no solo afectan el control de calidad de las proteínas, sino también podrían estar contribuyendo a la pérdida de la integridad del genoma durante el envejecimiento. Es probable que el colapso en la red de proteostasis conlleve a la alteración de diversos procesos celulares y viceversa, así mismo, se ha sugerido, que la pérdida de la proteostasis contribuye al desarrollo de enfermedades denominadas como patologías asociadas a la conformación de las proteínas, tales como, enfermedades neurodegenerativas y cáncer, en las cuales se considera que el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo en la incidencia de estas enfermedades (Labbadia & Morimoto, 2015).

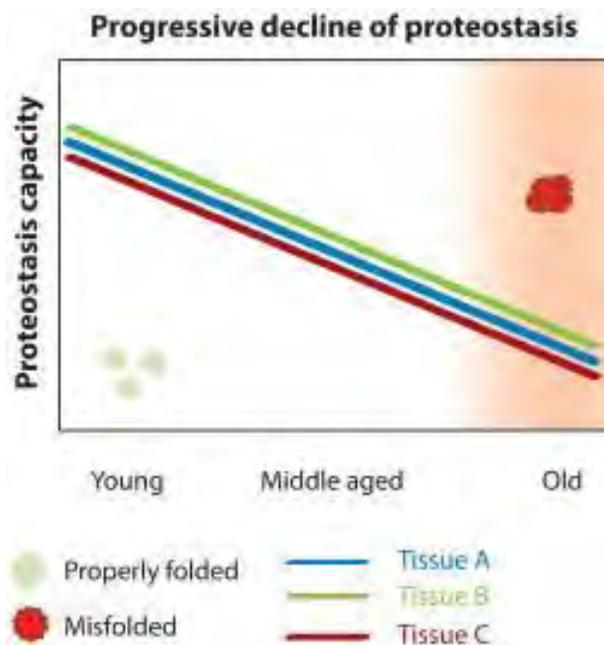


FIGURA 2. El envejecimiento se caracteriza por un colapso en la proteostasis. En este modelo se muestra que cuando los organismos son jóvenes, se mantiene la integridad de las proteínas (esferas verdes) en distintos tejidos (línea roja, verde y azul) lo que previene alteraciones en la función tisular. Durante el envejecimiento, hay una pérdida de la proteostasis lo que afecta el plegamiento de las proteínas (esferas rojas), favoreciendo la formación de agregados citotóxicos que pueden contribuir al desarrollo de diversas enfermedades (Tomada y modificada de **Labbadia & Morimoto, 2015**)

AUTOFAGIA

La autofagia comprende uno de los sistemas proteolíticos de la célula a través del cual, diversos componentes citoplasmáticos como proteínas y otras biomoléculas, son degradados a través de esta vía para mantener niveles óptimos de aminoácidos y energía que pueden ser posteriormente utilizados por las células. Una de las principales características de la autofagia, es la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, las cuales secuestran todos aquellos componentes citoplasmáticos que podrían estar comprometiendo la supervivencia de las células, desde agregados de proteínas, hasta organelos completos como mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplásmico e incluso organismos patógenos como bacterias, para posteriormente degradarlos por medio de enzimas lisosomales (**Figura 3**). La autofagia se considera un mecanismo que promueve la supervivencia celular, ya que este proceso se activa ante diversos estímulos que ejercen un estrés, como por ejemplo, la deficiencia de nutrientes, el estrés de retículo endoplásmico, las especies reactivas de oxígeno, ROS (**ReaOxSive Oxygen Species, por sus siglas en inglés), entre otros, contribuyendo de esta manera, al mantenimiento de la homeostasis celular (Mizushima & Komatsu, 2011).**

Existen tres tipos de autofagia: **1)** La macroautofagia, en la cual el material citoplásmico es secuestrado en vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, posteriormente éstas se fusionan con los lisosomas formando los autolisosomas, en donde se llevará a cabo la degradación. **2)** La microautofagia, en donde el material a degradar es invaginado directamente por el lisosoma y su degradación ocurre al interior de éste organelo, **3)** La autofagia mediada por chaperonas, que se caracteriza por la degradación de proteínas que contienen la secuencia de aminoácidos KFERQ y son reconocidas por la proteína HSC70, que junto con la proteína de membrana lisosomal LAMP-2A, introducen a las proteínas al lumen del lisosoma para su degradación (Galluzzi et al., 2017) .

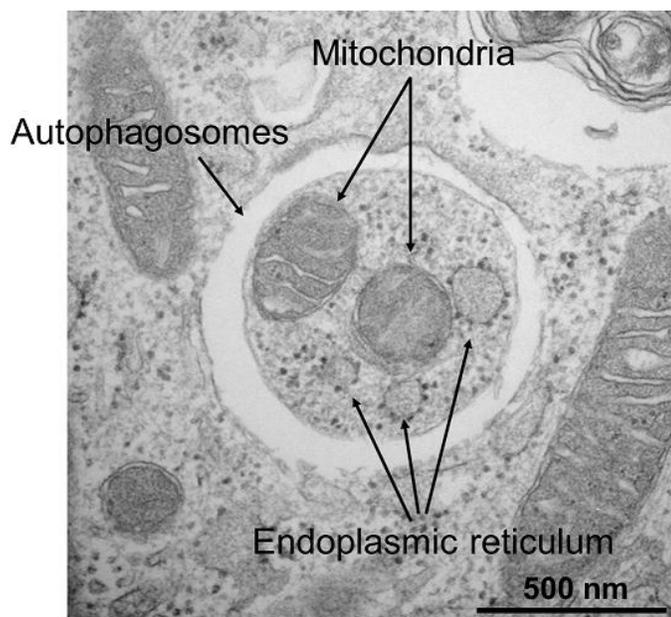


FIGURA 3. La autofagia se caracteriza por la formación de vesículas de doble membrana denominados **autofagosomas**. Fotografía de microscopía electrónica en fibroblastos de ratón, los cuales muestran mitocondrias y fragmentos de retículo endoplásmico internalizados en vesículas autofágicas (Tomada de <http://square.umin.ac.jp/molbiol/english/RESEARCH/index.html> tomada por Dr. Chieko Kishi-Itakura).

I. Biogénesis de los autofagosomas

La vía de la autofagia, puede dividirse en 5 grandes etapas: inicio, nucleación, elongación, fusión y degradación (**Figura 4**). Cada una de las cuales, requiere la presencia de las proteínas ATG (*Autophagy-related*, por sus siglas en ingles).

Inicio y nucleación.

En mamíferos, durante el inicio o activación de la autofagia ocurre la formación del fagóforo o membrana de aislamiento. El origen de la membrana del fagóforo puede provenir de distintas fuentes, ya que se ha sugerido que en subdominios del retículo endoplásmico, o en sitios de contacto entre el retículo endoplásmico y la mitocondria, se lleva a cabo el reclutamiento de diversas proteínas que participarán en la formación de los autofagosomas (Ylä-Anttila et al., 2009; Hamasaki et al., 2013). Durante la nucleación, las primeras proteínas en ser reclutadas en estos sitios son ULK1, FIP200, ATG13, ATG101 y ATG9, estas proteínas conforman el complejo ULK, el cual, durante la inducción de la autofagia debido a condiciones de estrés o deficiencia de nutrientes, se disocia de la cinasa mTOR (considerado como el principal regulador negativo de la autofagia) (Koyama-Honda et al., 2013). La disociación de ULK de la cinasa mTOR, también es importante para que ocurra el reclutamiento del complejo PI3K de clase III, el cual incluye a Beclin 1, ATG14L, VPS34, p150, AMBRA1 y ATG1 (Itakura

& Mizushima, 2010). En el sitio de formación de la membrana de aislamiento, también son reclutadas las proteínas p62 y NBR1. Ambas proteínas, funcionan como adaptadores o receptores del material citoplásmico que será degradado vía autofagia. Tanto p62 como NBR1, poseen dominios de interacción con LC3, lo que les permite ser reconocidos e internalizados en los autofagosomas (Itakura & Mizushima, 2011). Un evento crítico para la generación de la membrana del fagóforo o membrana de aislamiento, es la generación del fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) a través de la cinasa PI3K. La síntesis de PI3P es llevada a cabo a través de la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) en la posición 3' del anillo de inositol. Durante la formación del fagóforo, se ha observado que la producción de PI3P ocurre en ciertos dominios del retículo endoplásmico denominados omegasomas, los cuales son los sitios primarios de nucleación del autofagosoma (Axe et al., 2008), donde además también se ha visto que se localiza la proteína ATG14L, la cual recluta a la cinasa PI3K hacia el retículo endoplásmico y es ahí donde ocurre la generación de PI3P, de esta forma contribuyendo también a la determinación del sitio específico de biogénesis de los autofagosomas (Matsunaga et al., 2010). La generación de PI3P es importante para la estabilización fagóforo, pero interesantemente se ha visto que ATG14L, a través de su dominio carboxilo terminal, censa la curvatura de la membrana de los autofagosomas, lo que contribuye a la elongación y posterior ensamblaje de demás proteínas en las membranas de los autofagosomas (Fan et al., 2011).

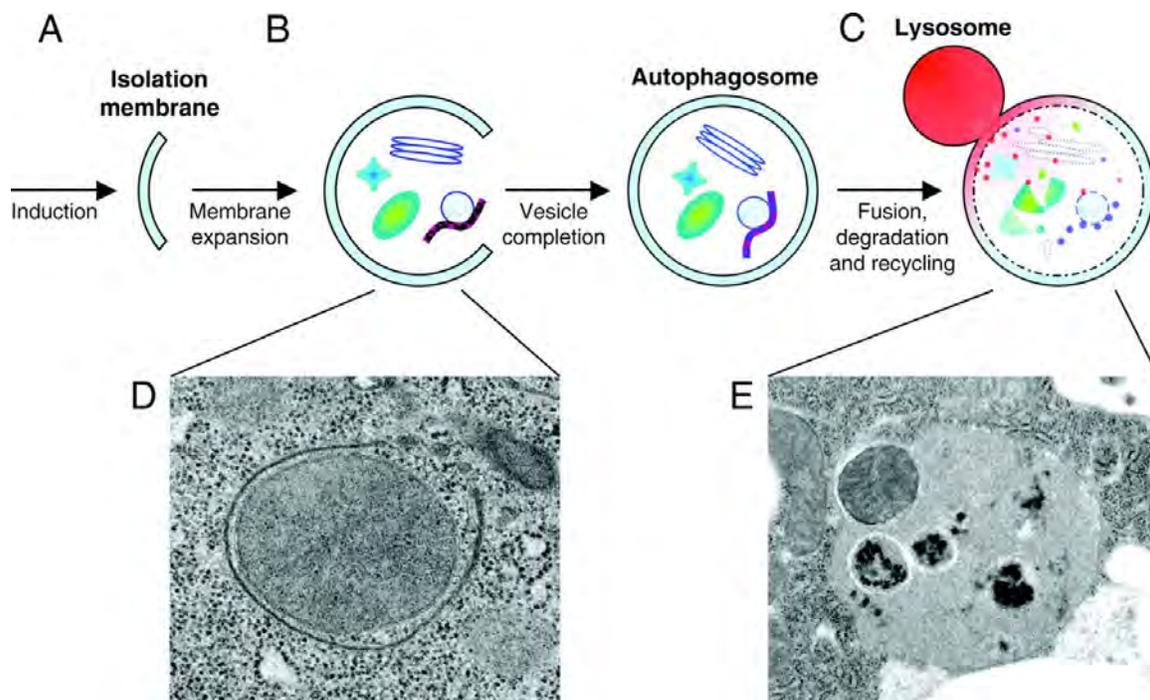


FIGURA 4. Representación esquemática de las distintas etapas de la autofagia en mamíferos. (A) En respuesta a un estímulo de estrés, se induce la formación y nucleación de una estructura pre-autofagosomal

conocida como membrana de aislamiento o fagóforo. **(B)** El fagóforo se va elongando y se empieza a formar una estructura de doble membrana, conocida como autofagosoma, que al mismo tiempo empieza a secuestrar e internalizar distinto material citoplásmico. **(C)** Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas, y la membrana interna de las vesículas autofágicas así como el material secuestrado, se empiezan a degradar por medio de distintas enzimas lisosomales. El material degradado, es regresado hacia el citoplasma para su posterior reciclaje. **(D)** Fotografía de microscopía electrónica en la que se muestra la formación de un autofagosoma y **(E)** su posterior fusión con un lisosoma en la que se observa mitocondrias degradadas (*Tomada y modificada de Meléndez & Neufeld, 2008*)

Elongación y maduración de los autofagosomas.

La elongación de los autofagosomas, requiere de dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina denominados sistema ATG12 y sistema LC3. En el sistema ATG12, el grupo carboxilo localizado en el dominio C-terminal de la proteína ATG12 es activado por medio de la enzima de activación E1, ATG7. Posteriormente, ATG7 por medio de su residuo de cisteína catalíticamente activo, se unirá a través de un enlace tioéster a ATG12 y transferirá al residuo de cisteína de ATG10, una enzima de conjugación tipo E2, la cual unirá covalentemente a ATG12 a ATG5 a través de un enlace isopeptídico (**Figura 5**). En el sistema de LC3, ésta proteína se encuentra en una forma precursora o inmadura denominada pro-LC3, la cual es procesada por la enzima ATG4 para exponer un residuo de glicina en su extremo carboxilo terminal (Nakatogawa, 2013). El corte de LC3, da lugar a la forma citosólica denominada LC3-I. ATG7 activa a LC3-I, y la transfiere a ATG3, que funciona como una enzima E2 y que a su vez se unirá al complejo ATG12-ATG5-ATG16L1, para catalizar el enlace amida entre LC3 y el lípido fosfatidiletanolamina (**PE, phosphatidylethanolamine, por sus siglas en inglés**), generando la forma LC3-II la cual se anclará en la membrana externa e interna del autofagosoma (Hanada et al., 2007). La participación de estos sistemas de conjugación, así como la formación de LC3-II, permite la elongación y cierre de las vesículas autofágicas (**Figura 5**). Sin embargo, también se ha visto que durante la maduración de los autofagosomas los sistemas de conjugación son esenciales para la fisión de las membranas así como para la posterior degradación de la membrana interna dentro de los autofagolisosomas (Tsuboyama et al., 2016).

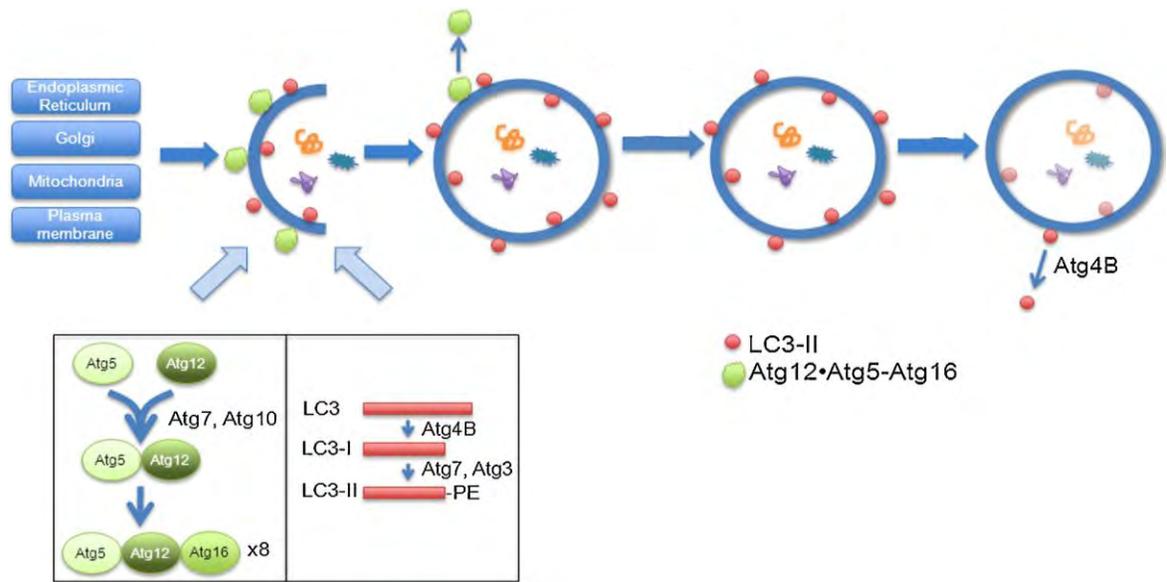


FIGURA 5. Participación de los sistemas de conjugación durante la formación de los autofagosomas. Distintos organelos como el retículo endoplásmico, aparato de golgi, mitocondria o la membrana plasmática, pueden contribuir a la formación de las membranas del autofagosoma (azul). Para la elongación y maduración de los autofagosomas, son esenciales dos reacciones de conjugación tipo ubiquitina. En la primera reacción, ATG12 es activado por ATG7 y posteriormente por medio de ATG10, es transferido para unirse con ATG5 y ATG16, formando un complejo proteico que se encontrará unido a la membrana exterior del autofagosoma (verde). En la segunda reacción, ATG4B cataliza el procesamiento de LC3 (rojo) para exponer un residuo de glicina en el cual, por medio de ATG7 y ATG3, se le unirá el lípido PE, lo que le permitirá integrarse a ambas membranas del autofagosoma. Ambas reacciones son necesarias para la maduración de las vesículas autofágicas (*Tomada y modificada de Jimenez-Sanchez et al, 2008*).

Formación de los autolisosomas, degradación y reciclaje.

La siguiente etapa es la fusión de los autofagosomas con los lisosomas para llevar a cabo la degradación del cargo secuestrado. Se ha visto que en condiciones ricas en nutrientes, los lisosomas co-localizan con el complejo mTOR (mammalian Target of Rapamycin, por sus siglas en inglés); cuando ocurre la inducción de autofagia los lisosomas se disocian de mTOR y se posicionan en las regiones perinucleares (Korolchuk et al., 2011). En células de mamífero, los autofagosomas se forman en la periferia de las células, sin embargo, existen estructuras pre-autofagosomales que se encuentran en todo el citoplasma. Los autofagosomas maduros, se transportan a través de los microtúbulos por medio del complejo motor de dineína hacia las regiones perinucleares en donde se encuentran los lisosomas (Jahreiss et al., 2008; Kimura et al., 2008). Aún no se ha elucidado cómo es que este complejo reconoce e interactúa con los autofagosomas, o a través de qué proteínas lo hace.

En hepatocitos de rata, se ha visto que durante condiciones basales la desestabilización de los microtúbulos por el tratamiento con nocodazol o vinblastina, no afecta la formación de vesículas autofágicas y se ha observado que las estructuras pre-autofagosomales no interactúan con los microtúbulos, probablemente para evitar su fusión prematura con los lisosomas. Por el contrario, cuando se induce la autofagia por déficit de nutrientes y se inhibe la polimerización de los microtúbulos, la formación de los autofagolisosomas disminuye significativamente. Estos resultados indican que los microtúbulos son esenciales para posicionar a los autofagosomas hacia la región perinuclear y facilitar su fusión con los lisosomas (Köchl et al., 2006). Otras proteínas como las kinesinas KIFC2 y KIFC3 participan en el transporte de vesículas por los microtúbulos hacia el área perinuclear, y se ha propuesto que interactúan con proteínas de la vía de la autofagia tales como ATG1/ULK1 (Hirokawa et al., 2009). Proteínas como la GTPasa Rab7, la miosina VI, la kinesina 5B (KIF5B), la histona desacetilasa 6 (HDAC6), así como la sintaxina 17 (STX17, perteneciente a la familia de las SNAREs), ATG14, entre otras, también son esenciales para el transporte y fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Cardoso et al., 2009; Tumbarello et al., 2012; Nakamura et al., 2017; Lee et al., 2010). Por otra parte, experimentos *in vitro* han demostrado que la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, involucra dos mecanismos: la fusión completa que conlleva a la formación de un organelo híbrido, el autofagolisosoma, o la fusión parcial y transitoria (también conocida como “kiss-and-run”), en la que se distinguen dos vesículas independientes, y a través del cual se ha especulado que es posible que por medio de múltiples eventos se libere el contenido de los autofagosomas hacia los lisosomas (Jahreiss et al., 2008).

Una vez que se han formado los autofagolisosomas, la membrana interna de los autofagosomas, los receptores p62 y NBR1, así como el material citoplásmico secuestrado, serán degradados por diversas enzimas lisosomales, tales como las catepsinas B, D y L. Las macromoléculas degradadas por esta vía, son devueltas hacia el citoplasma en forma de unidades monoméricas para que sean re-utilizadas en la síntesis de nuevos componentes celulares (Mizushima, 2007) (**Figura 6**).

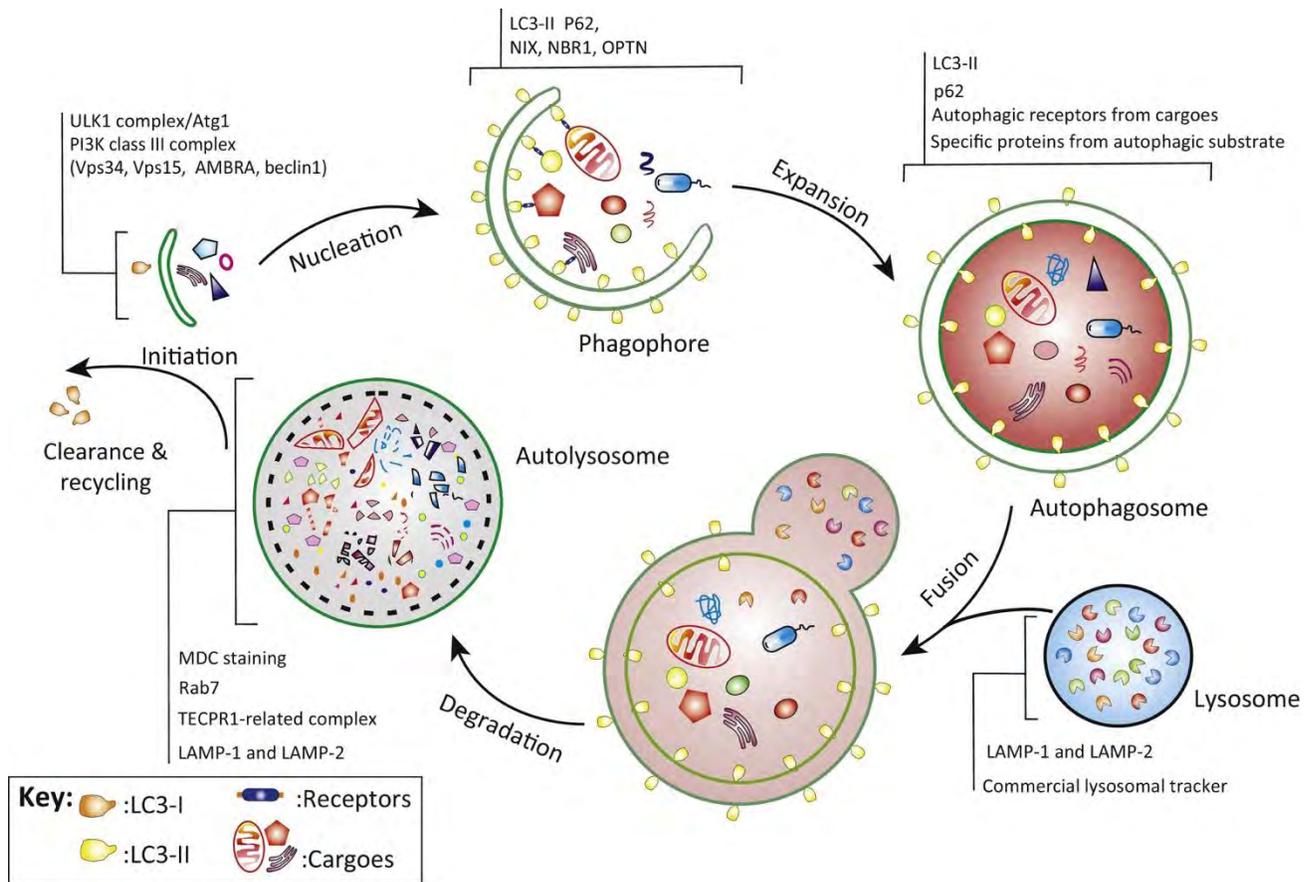


FIGURA 6. La autofagia contribuye a la eliminación y reciclaje de material intracelular. Cuando se induce la autofagia y la formación del fagóforo, el material que será degradado vía autofagia es reconocido por la proteína p62 el cual funciona como un receptor que reconoce y recluta al material dañino, y al mismo tiempo interactúa con LC3 para internalizar los componentes citosólicos en los autofagosomas. Cuando los autofagosomas se fusionan con los lisosomas (autolisosomas), la membrana interna de los autolisosomas, p62 y el material secuestrado son degradados y posteriormente devueltos al citoplasma en forma de unidades monoméricas que serán recicladas y con ello contribuirán a la formación de nuevas moléculas de acuerdo a las necesidades celulares (Tomada de Wang et al., 2017).

PROTEASAS ATG4 Y SU RELEVANCIA EN LA AUTOFAGIA.

El descubrimiento de la autofagia, ha permitido establecer el desarrollo de diversos enfoques genéticos con el objetivo de identificar y caracterizar todos aquellos componentes que participan en esta vía, como por ejemplo, los sistemas de conjugación, los cuales son esenciales para la formación de los autofagosomas. Como ya se mencionó anteriormente, se requieren 2 sistemas de conjugación para la elongación del fagóforo y la maduración de un autofagosoma, en el primer sistema participan las proteínas ATG12 y ATG5 (también conocido como sistema de conjugación ATG12), y el segundo sistema de conjugación llamado sistema LC3 o sistema de lipidación ATG8, en el cual participa la cisteín proteasa ATG4. En este proyecto, se utilizó un modelo deficiente en el sistema ATG4B/LC3.

En 1998, el gen de *ATG4*, fue identificado en *Saccharomyces cerevisiae*, y se sugirió que esta proteína podía estar interactuando con ATG8 (el ortólogo de LC3 en levaduras) y los microtúbulos para dirigir a los autofagosomas hacia las vacuolas (Lang et al., 1998). Posteriormente, diversos estudios describieron la función de ATG4, clasificándola como una cisteín proteasa con funciones similares a las enzimas de ubiquitinación y desubiquitinación, que además es esencial en la maquinaria autofágica. Estos estudios, revelaron que ATG4 interactúa con ATG8 en el citosol y procesa su extremo COOH terminal a través de un corte proteolítico, el cual es necesario para la asociación de ATG8 con el lípido PE y su posterior anclaje a las membranas de los autofagosomas (Kirisako et al., 2000; Kim et al., 2001). Esta reacción de conjugación es reversible y se demostró que en *S. Cerevisiae*, ATG4 libera a ATG8 de la membrana externa de los autofagosomas, actuando como una enzima deslipidante o de des-conjugación. De forma interesante, afectando la función deslipidante de ATG4, la formación de nuevos autofagosomas se ve alterada (Nakatogawa et al., 2012; Nair et al., 2012). Por tanto, ATG4 es esencial en la autofagia no sólo para permitir la conjugación de ATG8 con PE y facilitar la formación y maduración de los autofagosomas, sino para mantener un equilibrio entre las formas lipidadas y no lipidadas de ATG8, ya que contribuye al reciclaje de ATG8 cuando el flujo de autofagia y la formación de autofagosomas se incrementan ante algún estímulo (Yu et al., 2012; Nakatogawa et al., 2007).

La familia de las cisteín proteasas ATG4 en mamíferos

Después del descubrimiento de la proteína ATG4 en levaduras, Mariño et al., reportaron la identificación y caracterización de cuatro proteínas ortólogas ATG4 en humanos denominadas: ATG4A (autofagina-2), ATG4B (autofagina-1), ATG4C (autofagina-3) y ATG4D (autofagina-4). Los análisis de la secuencia de aminoácidos de las cuatro autofaginas, revelaron que tienen ciertas similitudes con la secuencia de ATG4 en levaduras (Mariño et al., 2003). Sin embargo, las principales diferencias de ATG4 entre ambos organismos, radican en los extremos amino y carboxilo terminal. Por otra parte, el residuo de cisteína que se encuentra en el sitio activo de estas proteasas y los aminoácidos que la rodean, son características que se encuentran conservadas en humano, ratón y levaduras (Mariño et al., 2003; Wu et al., 2012). La maquinaria central de la autofagia se encuentra conservada desde levaduras hasta mamíferos; sin embargo, a lo largo de la evolución este proceso ha adquirido complejidad, especialmente en los mamíferos (Abounit et al., 2012; King, 2012). La presencia de solo una proteína ATG4 en levadura, mientras que en mamíferos existen 4 homólogos

(ATG4A, B,C y D), podría ser explicada por el hecho de que las levaduras expresan un solo sustrato ATG8, mientras que en mamíferos hay 6 homólogos distintos de ATG8: cuatro proteínas MAP1LC3 (*M*icrotubule, *A*ssociated *P*rotein 1 *L*igth-*c*hain *3*, por sus siglas en inglés); MAP1LC3A, MAP1LC3B, MAP1LC3B2, MAP1LC3C, también conocidas como LC3, dos proteínas GABARAP (*G*amma γ -*a*mino*b*utyric *a*cid-*r*eceptor-*a*ssociated *p*rotein-like 1; GABARAP and GABARAPL1) y la proteína GATE-16 (*G*olgi-*a*ssociated *A*T*P*ase *e*nhaner of *16* kDa), todas ellas constituyen la familia ATG8 en mamíferos (Slobodkin et al., 2013) (Figura 7).

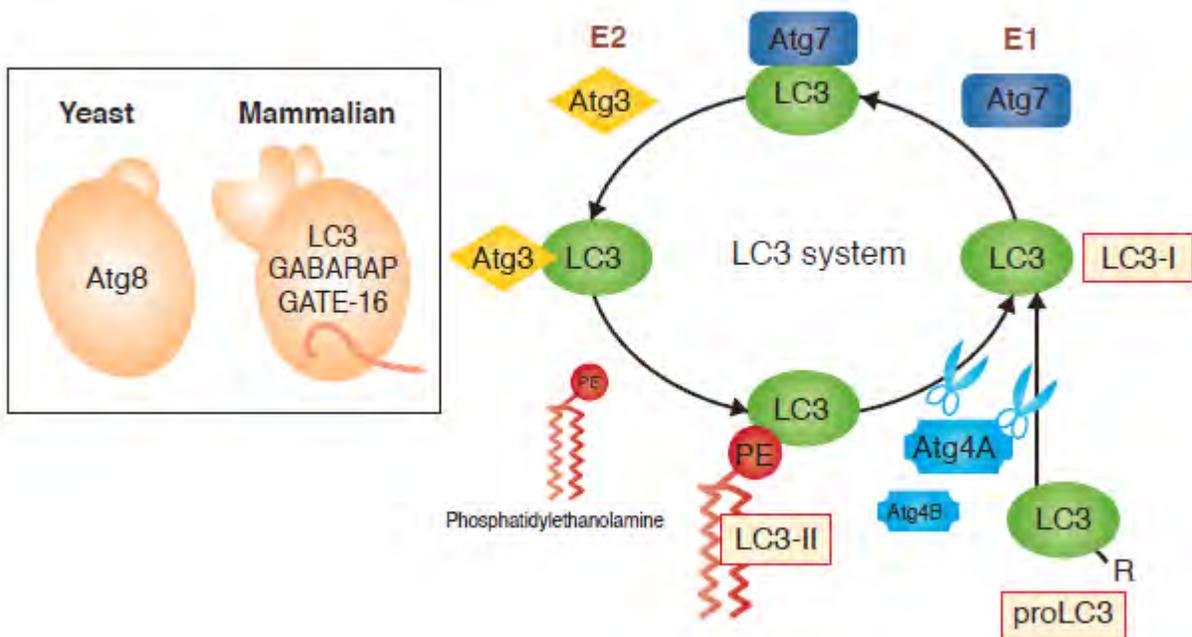


FIGURA 7. Los sustratos de la familia Atg8 son esenciales para la formación y maduración de los autofagosomas. En *S.cerevisiae*, Atg8 es la única proteína requerida para la formación de los autofagosomas. En mamíferos hay 6 homólogos (LC3A, LC3B, LC3B2, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GATE-16), los cuales son procesados a través de un corte proteolítico por medio de las proteasas ATG4, para posteriormente conjugarlos con PE. El principal sustrato es LC3, el cual se encuentra en una forma precursora (proLC3) y es activado por medio de un corte proteolítico el cual es catalizado esencialmente por ATG4B (LC3-I), aunque ATG4A también tiene afinidad por este sustrato y puede participar en su procesamiento. Una vez que LC3 es activado, es transferido a ATG7 y posteriormente a ATG3 para ser unido covalentemente con PE (LC3-II) (tomada de <https://www.mblintl.com/products/lc3-at8/>).

ATG4B: La principal enzima en la vía de la autofagia en mamíferos.

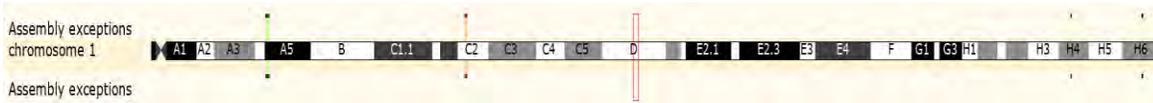
Los homólogos de Atg8 parecen desempeñar diferentes papeles en la biogénesis del autofagosoma, y estudios previos han indicado que podrían ser procesados diferencialmente por los homólogos de Atg4. En un estudio bioquímico donde se midió la actividad enzimática y la eficiencia cinética con la que las cuatro proteasas ATG4 pueden procesar los diversos homólogos de ATG8, se concluyó que las distintas proteasas tienen diferente especificidad

por cada uno de los sustratos. ATG4A procesa preferencialmente a GATE-16, GABARAP y ATG8L pero no procesa a LC3B, mientras que, ATG4B puede procesar a todos los sustratos. Por el contrario, ATG4C y ATG4D son las enzimas que tienen la menor afinidad para procesar los diferentes sustratos (Li et al., 2011). Esto puede deberse a que, aunque las enzimas tienen una afinidad similar para unirse a los diferentes homólogos de ATG8, hay importantes diferencias estructurales entre cada una de las cisteín proteasas lo que cambia la eficiencia para procesar a los sustratos.

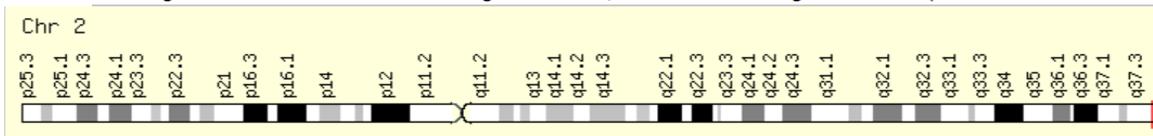
Además de ciertas diferencias en la secuencia de aminoácidos y la posición espacial del sitio catalítico, es importante mencionar que las cuatro ATG4 así como los diversos sustratos ATG8, tienen diferentes patrones de expresión en distintos tejidos, por ejemplo, GABARAP y GATE-16 predominan principalmente en bazo y corazón, respectivamente, comparados con LC3B quien muestra una expresión homogénea en diferentes tejidos (Tanida, et al., 2004), y se ha propuesto que cada uno de estos sustratos participa en diferentes etapas durante la formación de los autofagosomas así como en distintos tipos de autofagia. Tal es el caso de la proteína GABARAP, la cual se ha visto que su participación es esencial durante la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, y junto con GATE-16, sensan la curvatura de las membranas de los autofagosomas (Schaaf et al., 2016; Landajuela et al., 2016). Al igual que las proteínas de la familia ATG8, se ha demostrado que cada una de las autofaginas tiene una expresión diferencial en varios tejidos: ATG4A se ha detectado casi exclusivamente en músculo esquelético, mientras que ATG4B se expresa principalmente, en cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, pulmón y páncreas. Por el contrario, ATG4C tiene mayores niveles de expresión en testículos, ovarios, bazo, corazón, músculo esquelético e hígado y finalmente la expresión de ATG4D ha sido detectada esencialmente en testículos y músculo esquelético (Mariño et al., 2003). Por medio de estudios cristalográficos, se ha observado que los residuos que se encuentran en la triada catalítica típica de las cisteín proteasas, están conservados **en las** cuatro proteasas ATG4, sin embargo, también se ha visto que hay ciertos cambios estructurales que probablemente estén teniendo un impacto en el reconocimiento de los sustratos (Sugawara et al., 2005). Es probable hipotetizar que, durante la evolución de la autofagia en mamíferos, la maquinaria que participa en este proceso comenzó a requerir diferentes sustratos con funciones específicas durante la biogénesis de los autofagosomas y quizá, como resultado de esta complejidad, la divergencia de las cuatro proteasas ATG4, conllevó a una especialización para el reconocimiento y la especificidad de los diferentes sustratos.

Como ya se ha mencionado previamente, ATG4B/autofagina-1, es la proteasa ATG4 que tiene la mayor afinidad por cada uno de los sustratos homólogos de ATG8. En humanos, el gen de *Atg4b* se localiza en el cromosoma 2, mientras que en ratón se encuentra en el cromosoma 1 (**Figura 8 A y B**). A través de la generación de redes de interacción que incluyen datos experimentales así como modelos predictivos, se ha visto que ATG4B además de interactuar con la maquinaria autofágica, como los diversos sustratos de la familia Atg8, ATG7, ATG10, p62, ULK1, también tiene interacciones con proteínas como annexina 1 (ANXA1), la proteína proapoptótica con actividad de cinasa serina/treonina STK3, la proteína MLST8, la cual interactúa con mTOR entre otras (**Figura 8 C**). Estos análisis indican que además de sus funciones como enzima de conjugación y des-conjugación, ATG4B también podría estar interactuando con otras proteínas para regular la actividad autofágica.

(A)



(B)



(C)

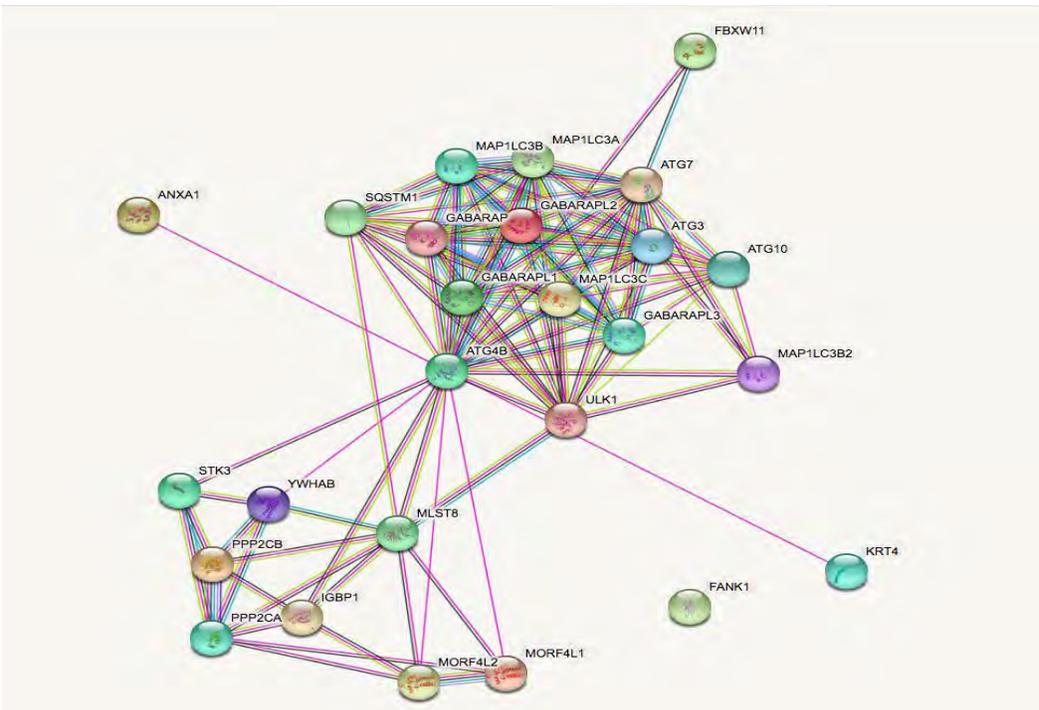


FIGURA 8. Localización de ATG4B en el cromosoma de ratón y humano y la interacción de esta proteasa con otras proteínas. (A) El gen de Atg4b en ratón se localiza en el cromosoma 1 (B) en humano Atg4b se encuentra en el cromosoma 2. Tomadas de <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATG4B&keywords=atg4b,mus,musculus> y http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000026280;r=1:93751500-93790610, respectivamente. (C) Red de interacción establecida a partir de bases de datos y modelos computacionales los cuales predicen las distintas asociaciones que ATG4B puede tener con otras proteínas. Tomada de <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=QzNYAOGDQru2%C3%A7>

Se ha demostrado que LC3B es el principal sustrato involucrado en la elongación del fagóforo y cierre de los autofagosomas (Satoo et al., 2009). La estructura cristalográfica de ATG4B ha revelado características únicas que son esenciales para el procesamiento de los sustratos, especialmente LC3. El residuo Leu232 presente en ATG4B, interactúa con LC3, sin embargo, en ATG4A esta posición está ocupada por una Ile, y como se mencionó en párrafos anteriores, LC3 es el sustrato por el que ATG4A tiene menor afinidad (Satoo et al., 2009; Hemelaar et al, 2003). Esto sugiere que la presencia de ciertos residuos de aminoácidos o sitios regulatorios, podrían ser también responsables de la especificidad de ATG4B por los sustratos. Así mismo, se ha visto que la secuencia de aminoácidos de ATG4C y ATG4D es más grande que la de ATG4A y ATG4B. Esto podría resultar en cambios en el posicionamiento espacial del sustrato y su interacción con el sitio catalítico, lo cual podría explicar no sólo las diferentes afinidades cinéticas con las que las proteasas se unen y procesan a los sustratos, sino quizá también funciones adicionales no relacionadas con el proceso de autofagia. Adicionalmente, LC3 también posee diferencias estructurales con GABARAP y GATE-16 lo que también podría favorecer un mejor posicionamiento estérico dentro del sitio catalítico de ATG4B lo que le confiere mayor afinidad comparado con los demás sustratos (Sugawara et al., 2004) (Figura 9).

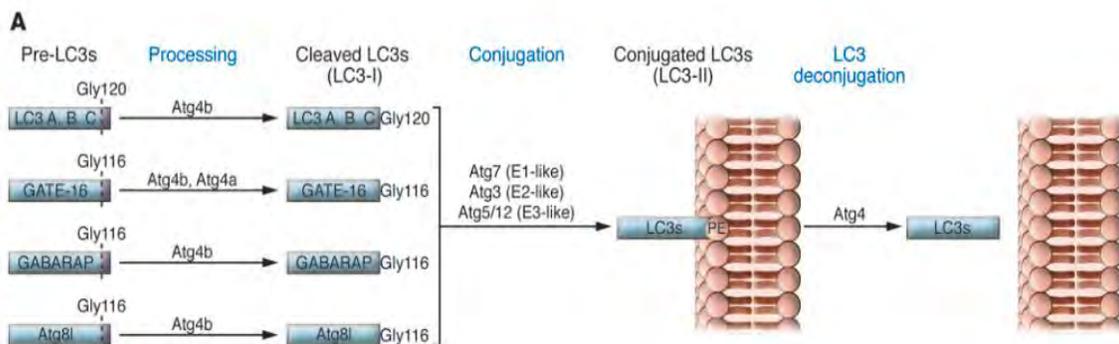


FIGURA 9. Las distintas proteasas ATG4 procesan a los diferentes sustratos esenciales para la formación y maduración de los autofagosomas. (A) Atg4b es la principal proteasa que tiene mayor afinidad

por los distintos sustratos de la familia Atg8. LC3, GATE-16, GABARAP y ATG8L son procesados por las proteasas ATG4 lo que resulta en la exposición de una glicina en una posición específica en el carboxilo terminal la cual, por medio de las proteínas ATG7, ATG3 y el complejo ATG5-ATG12, es conjugada con el lípido PE, lo que les permitirá a los sustratos anclarse a las membranas del autofagosoma. Posteriormente, ATG4B también libera a LC3 de la membrana externa de los autofagosomas para que pueda reciclarse. **(B)** Organelos dañados como los peroxisomas, mitocondrias, u otro material citotóxico como bacterias o agregados de proteínas, son identificados y seleccionados por p62 para reclutarlos al interior de los autofagosomas. La conjugación de LC3 (rectángulos azules), permite la elongación de los autofagosomas y su fusión con los lisosomas (esferas rojas). Una vez que esto ocurre, ATG4 libera a LC3 de la cara citosólica de los autofagosomas, mientras que la membrana interna del autofagosoma que también contiene a LC3, es degradada dentro de los autolisosomas al igual que todos los componentes citosólicos (*tomada de Till & Subramani, 2010*).

Mecanismo de acción y regulación de la actividad de ATG4B.

Para que ocurra el anclaje de LC3 en las membranas de los autofagosomas, es necesario que su carboxilo terminal sea procesado por ATG4B y de esta manera pueda ser conjugado **covalentemente** con el lípido PE. La estructura cristalográfica de LC3 y ATG4B ha revelado ciertas características esenciales en ambas proteínas para que ocurra el mecanismo de conjugación y des-conjugación. Se ha visto, que la región catalítica de ATG4B comparte similitudes estructurales con las papaínas, (una familia de cisteín proteasas que incluyen diversas catepsinas lisosomales) y con enzimas de des-ubiquitinación (**Figura 10 B**). Sin embargo, ATG4B posee un dominio auxiliar que no se encuentra en otras enzimas y se ha propuesto que podría participar en el reconocimiento del sustrato (Kumanomidou et al., 2005).

En el amino terminal de ATG4B se encuentra la triada catalítica compuesta por los aminoácidos cisteína, aspartato e histidina localizados en las posiciones 74, 278 y 280 respectivamente, que a su vez se encuentran conservados entre las cuatro autofaginas (**Figura 10 A y B**).

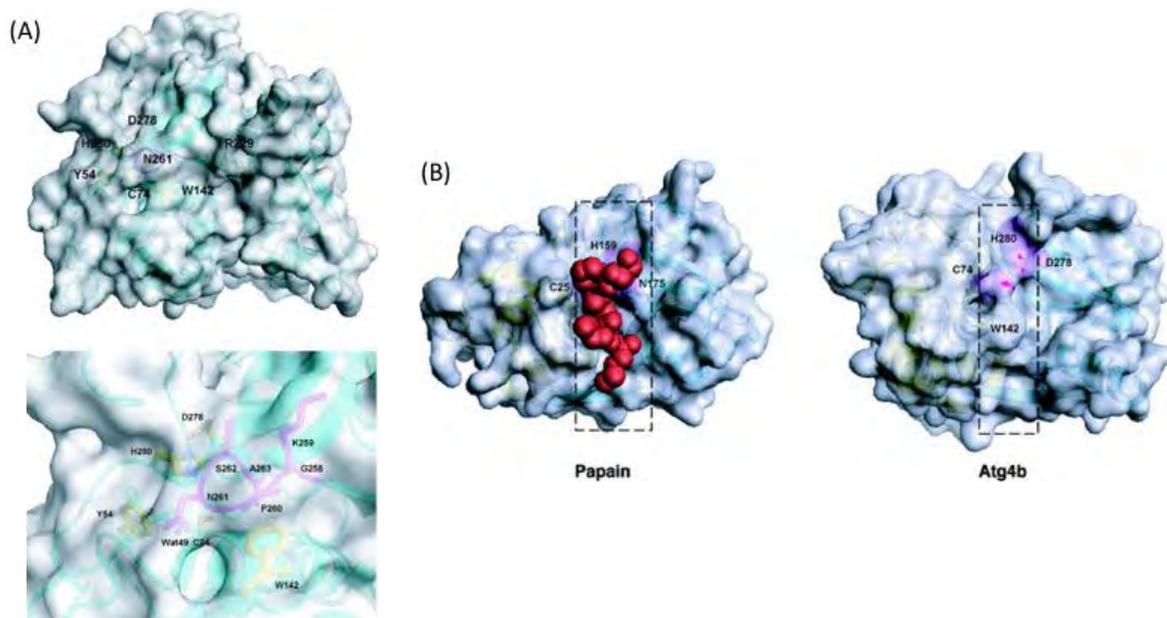


FIGURA 10. La estructura de ATG4B muestra similitudes con otras cisteín proteasas. (A) Representación superficial de Atg4b. El sitio activo y el sustrato propuesto que reconocen los residuos se etiquetan individualmente. Debajo se muestra una ampliación del del sitio activo, que incluye a los aminoácidos Y54, C74, W142, D278 y H280, los cuales se muestran en representación de bola y palo. La esfera roja es una molécula de agua. El bucle de la tapa (residuos 258-263) cubren el sitio activo **(B)** La estructura de ATG4B muestra que es similar a enzimas como las papainas, las cuales también son cisteín proteasas, sin embargo, sus principales diferencias radican en el posicionamiento del sitio activo. Tomada y modificada de Kumanomidou et al, 2006.

ATG4B está constituida por diversas estructuras secundarias como lámina β plegadas, y α -hélice, las cuales forman dominios auxiliares que la **distinguen** de otras enzimas. Además la formación de distintas estructuras secundarias favorecen que ATG4B reconozca de manera específica a los sustratos (**Figura 11**) ATG4B posee un loop regulatorio que previene la exposición de la cisteína del sitio activo, manteniéndola en un estado de autoinhibición. ATG4B **reconoce** a LC3 a través de su motivo LIR (LC3-interacting region, por sus siglas en inglés) localizado en su carboxilo terminal, el cual **interesantemente** no se encuentra en ATG4C ni ATG4D (Skytte et al., 2017). Sin embargo, en su extremo amino terminal, se encuentra una secuencia conocida como motivo AIM (ATG8-familiy interacting motif, por sus siglas en inglés) que también participa durante el reconocimiento e interacción con LC3 (Noda et al., 2010).

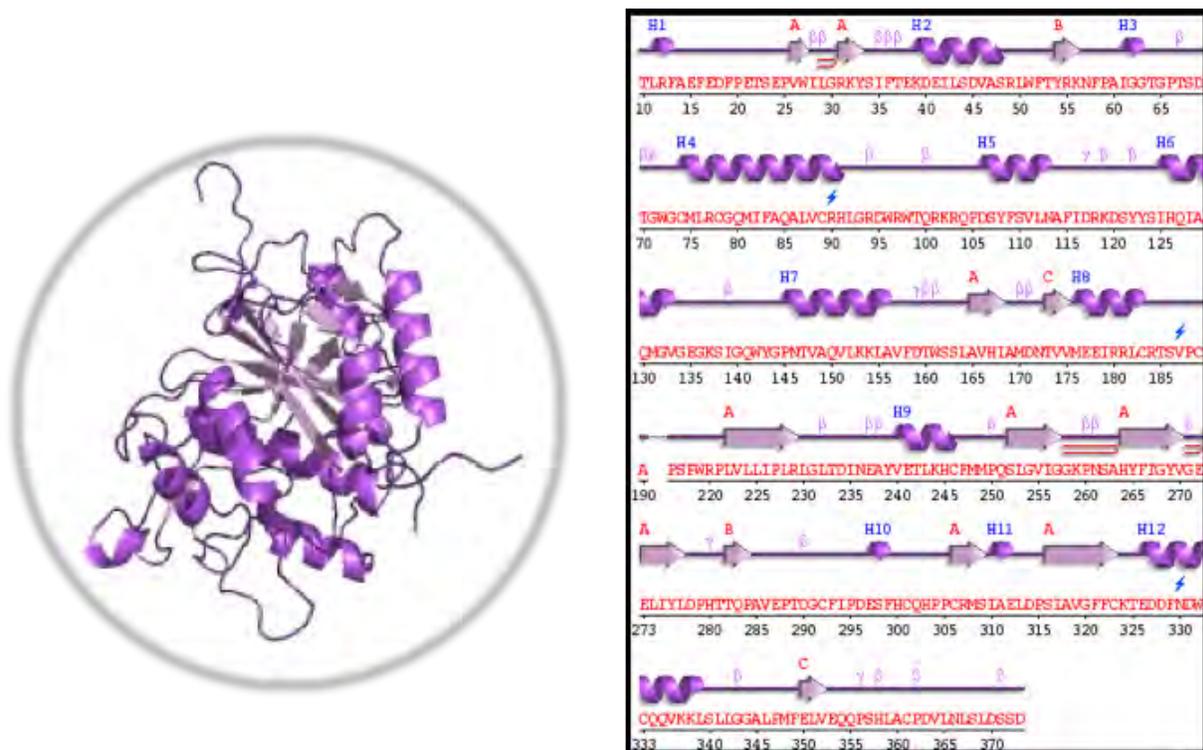


FIGURA 11. Diagrama topológico de ATG4B. La cisteína proteasa ATG4B posee α -hélices que se muestran de color púrpura. Las hojas β plegadas aparecen como flechas de color morado claro. La estructura de ATG4B posee en total 3 beta plegadas, 2 loops beta, 13 cadenas con 12 alfa hélices, 3 horquillas beta, 7 interacciones entre hélices, 29 giros beta y 4 giros gamma.

Una vez que el sustrato ha sido reconocido y se ha unido, ocurren cambios conformacionales en ATG4B que permiten la entrada de LC3 al sitio catalítico. ATG4B, corta en una arginina específica (Arg68) que se encuentra en el carboxilo terminal de LC3 para exponer una glicina generando la forma LC3-I (no conjugada) (Liu et al., 2013; Tanida et al., 2004). Posteriormente, el complejo ATG3-ATG12-ATG5-ATG16L1, catalizará el enlace amida que permitirá la conjugación entre LC3 y el lípido PE, generando la forma LC3-II. Una vez que la forma conjugada de LC3 (LC3-II) se ha anclado a los autofagosomas y éstos últimos se han fusionado con los lisosomas, ATG4B funciona como una enzima de desconjugación y libera a LC3 de la membrana externa de los autofagolisosomas (Sugawara et al., 2004; Sugawara et al., 2005). Se ha propuesto que el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 funciona como un andamio e interactúa con LC3-II en las vesículas autofágicas. ATG4B rompe esta interacción y nuevamente a través de los motivos LIR y AIM, se une a LC3 para catalizar el proceso de desconjugación (Skytte et al., 2017; Satoo et al., 2009) manteniendo de esta manera, un balance entre las formas no lipidadas y lipidadas de LC3. La sobreexpresión de una forma inactiva de ATG4B, con una mutación específica en su sitio catalítico (ATG4B^{C74A}) afecta de

manera negativa la autofagia ya que no ocurre el procesamiento y lipidación de LC3 y por tanto, la formación de autofagosomas se ve severamente disminuida (Fujita et al., 2008) (Figura 12).

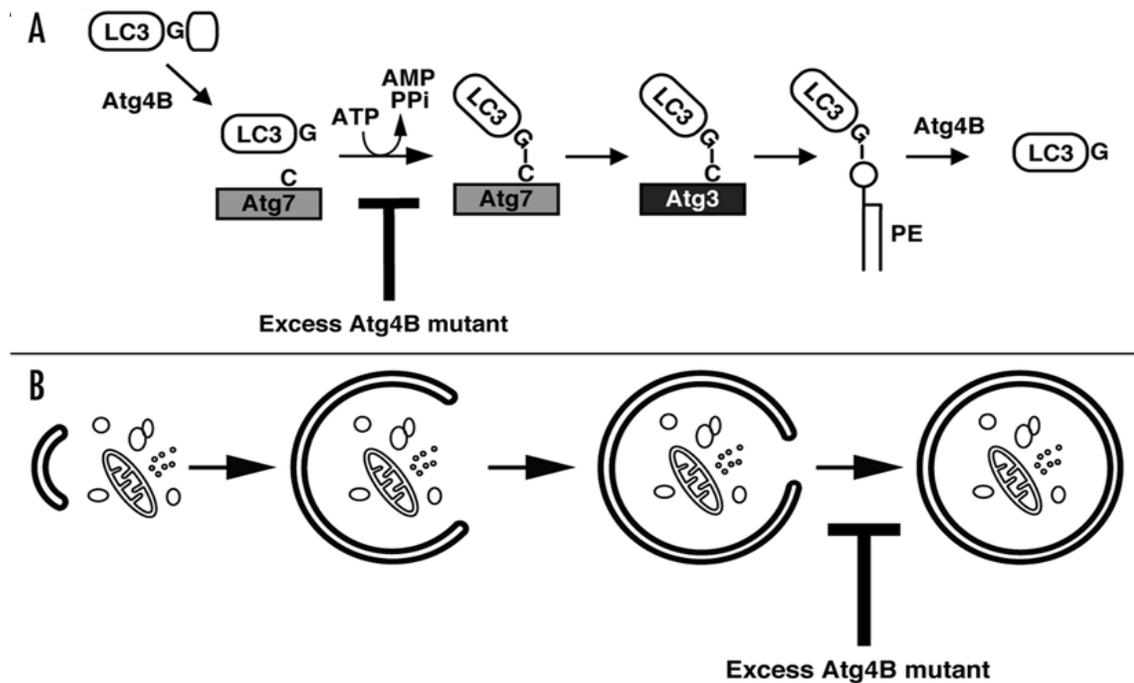


FIGURA 12. ATG4B procesa a LC3 y posteriormente lo libera de la membrana de los autofagosomas. (A) Atg8 (LC3 en mamíferos), se encuentra como una forma precursora en el citosol (proLC3). En la ARG117, ATG4B corta a LC3, para que se exponga la GLY116 en donde se unirá PE (LC3-PE), para después poder integrarse a la membrana del fagóforo. Una vez que los autofagosomas han madurado y se fusionan con los lisosomas, ATG4B libera a LC3 para que pueda ser re-utilizado en la formación de nuevos autofagosomas (B) Mutaciones en el sitio catalítico de Atg4B impiden que se lipide a LC3 y como consecuencia no hay formación de autofagosomas *Fernández & López-Otín, 2015*).

Por otra parte, las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, ubiquitinación, acetilación, O-GlcNacilación y modificaciones redox, funcionan como un mecanismo para regular la actividad de distintas proteínas de la maquinaria autofágica (McEwan et al., 2011). Por ejemplo, LC3 puede ser fosforilado o desacetilado, lo cual tiene efectos al inhibir o estimular la autofagia, respectivamente (Cherra et al., 2010; Lee et al., 2009). Por su parte, las funciones de ATG4B pueden ser reguladas a través fosforilación, ubiquitinación y modificaciones redox. Se ha visto que el estrés por deficiencia de nutrientes, además de inducir la autofagia, también contribuye en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), las cuales, se sugiere que actúan como moléculas de señalización en la vía autofágica y son esenciales durante este proceso, ya que en ausencia de ROS, no hay formación de autofagosomas (Scherz-Shouval et al., 2007). El

mecanismo por el cual las ROS participan en la vía de la autofagia, es a través de modificaciones en el sitio catalítico de las cisteín proteasas ATG4, lo que afecta su actividad. Quiao **et al** (2015), han demostrado que uno de los inhibidores de mTOR, denominado REDD1 (**R**egulated in **D**evelopment and DNA **D**amage responses **1**, por sus siglas en inglés), participa en la regulación de la autofagia a través de mecanismos redox. Cuando hay un estrés que induce la generación de ROS y la activación de la autofagia, REDD1 interactúa con la proteína pro-oxidante TXNIP (en inglés, **t**hioredo**xin**-**i**nteracting **p**rotein), formando un complejo proteico estable que contribuye a la producción de H₂O₂ y al mantenimiento de un ambiente pro-oxidativo en las células. Una vez que ATG4B procesa a LC3 para que pueda ser lipidado con PE, e integrado a la membrana de los autofagosomas, las ROS oxidan a las cisteínas del sitio catalítico de ATG4B, inactivando a la enzima lo que inhibe la deslipidación de LC3, promoviendo de esta manera que los autofagosomas maduren correctamente. En ausencia de REDD1, los niveles de ROS están disminuidos, lo que da como resultado una hiperactividad en la función de ATG4B, que conlleva a un exceso en la deslipidación de LC3, alteraciones en las funciones mitocondriales y defectos en la formación de autofagosomas. Estos resultados sugieren, que las ROS participan en la señalización de la autofagia regulando la actividad de ATG4B y con ello la formación de autofagosomas.

La fosforilación, es otra modificación post-traduccional que se ha visto también regula la actividad de ATG4B. Recientemente, se demostró que la inducción de la autofagia conlleva a la fosforilación de ATG4B en dos sitios específicos: Ser-383 y Ser-392, localizados en el extremo C-terminal de la enzima. La fosforilación de estos aminoácidos, es necesaria para la óptima actividad de ATG4B ya que se ha visto que incrementa su función de proteasa. La expresión de una doble mutante en estos sitios de fosforilación (ATG4B^{S383A/S392A}), resulta en la acumulación de LC3-II. Esto sugiere que conversión proteolítica de pro-LC3 a LC3-I no se ve afectada por la fosforilación, por lo que la principal función de esta modificación, es regular la actividad de deslipidación de ATG4B (Yang et al., 2015). Sin embargo, también se ha visto que la fosforilación, incrementa la interacción entre ATG4B y LC3, esto puede deberse a que se podría estar induciendo un cambio conformacional en el extremo C-terminal de ATG4B, por lo que la unión entre ambas proteínas sería más eficiente (Yang et al., 2015). La regulación en la tasa de lipidación/deslipidación de LC3 a través de la fosforilación de ATG4B, es un mecanismo adicional para mantener un equilibrio entre las formas LC3-I y LC3-II y controlar la formación y maduración de los autofagosomas.

Otro mecanismo adicional para modular la actividad de ATG4B, es por medio de la ubiquitinación. Se ha visto que la proteína RNF5 (*ring finger protein 5*, por sus siglas en inglés), una ubiquitin ligasa tipo E3, en condiciones basales se encuentra interactuando con ATG4B y la ubiquitina, promoviendo su degradación vía proteosoma. Cuando se induce la autofagia, RNF5 se disocia de ATG4B lo que permite la unión de esta última con su sustrato, permitiendo que los niveles de LC3-I y la formación de autofagosomas, incrementen significativamente. Interesantemente, la presencia de agentes oxido-reductores como el DTT, o el tratamiento con H₂O₂, modifica diversos residuos de cisteína presentes en ambas proteínas, lo que desestabiliza su interacción. Esto es consistente con lo mencionado en párrafos anteriores acerca del papel de las ROS en la modulación de ATG4B. RNF5 también podría estar influyendo en la localización de ATG4B, ya que se ha visto que ambas proteínas se encuentran en ciertos dominios membranales cercanos a LC3. Estos resultados sugieren que RNF5, actúa como un regulador negativo de la autofagia a través de la asociación con ATG4B y probablemente controla su localización para que al inducirse la autofagia, ocurra rápidamente el procesamiento de LC3 (Kuang et al., 2012).

No se ha estudiado si las demás proteasas ATG4 están sujetas a este tipo de modificaciones post-traduccionales, sin embargo, estos estudios son interesantes ya que ATG4B, al ser una proteasa esencial en la maquinaria autofágica que procesa al principal sustrato para la formación de los autofagosomas, también es una proteína importante que actúa como un switch molecular, a través del cual por medio de distintas modificaciones postraduccionales, los niveles de autofagia pueden ser regulados.

AUTOFAGIA Y ENVEJECIMIENTO

La evidencia publicada en los últimos años, sugiere que la autofagia tiene un papel protector durante el envejecimiento. A través de enfoques genéticos, diversos estudios han mostrado que la autofagia está directamente relacionada con este proceso, ya que se ha visto que la ausencia de genes de la autofagia disminuyen la sobrevivencia de distintos organismos, los hacen más susceptibles a la inducción de diferentes daños (Alvers et al., 2009; Meléndez et al., 2003) e interesantemente, en diversos modelos experimentales, la ausencia de genes esenciales en la vía de la autofagia, resulta en fenotipos que han sido observados en enfermedades asociadas al envejecimiento tales como Alzheimer, Parkinson, enfermedades cardiovasculares, arterosclerosis, osteoporosis, enfermedades fibrosantes,

entre otras (Kroemer, 2015). Por ejemplo, el silenciamiento de los genes *Atg5* o *Atg7* en el sistema nervioso central de ratón, resulta en un retraso en el crecimiento, alteraciones motoras, muerte celular en cerebelo y corteza cerebral, mayor tasa de mortalidad, neurodegeneración y acumulación de proteínas ubiquitinadas en las neuronas (Hara, et al, 2006; Komatsu et al., 2006). Pickford y colaboradores, han reportado que la disminución en la expresión del gen *Beclin1* (*Becn1*) en cerebro de ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína APP (en inglés, amyloid precursor protein), resulta en neurodegeneración, acumulación de vesículas autofágicas y una expansión de los compartimentos endosomales y lisosomales, lo que podría favorecer un incremento en la producción y depósito de las placas β -amiloides (Pickford et al., 2008).

Por otra parte, se ha visto que los receptores que reconocen a los agregados proteicos que serán degradados vía autofagia, también se encuentran alterados en **Alzheimer**. Por ejemplo, la deficiencia de p62 en ratón, resulta en neurodegeneración y acumulación de la proteína tau hiperfosforilada (Ramesh et al., 2008). Estos resultados sugieren que en el Alzheimer, las alteraciones en la autofagia ocurren a diferentes niveles, lo cual no sólo afecta la degradación de los agregados intracelulares sino también podría estar contribuyendo en la generación y acumulación de las placas β -amiloides. Por otro lado, la alteración de componentes de la matriz extracelular, también tiene un efecto sobre la actividad autofágica. En neuronas del ratón deficiente de la colágena VI (*Col6a1*^{-/-}), hay una disminución en la autofagia a nivel basal, mayor muerte celular y susceptibilidad al daño oxidativo inducido por H₂O₂. A nivel basal en el cerebro de ratones viejos *Col6a1*^{-/-}, se observa neurodegeneración y un incremento en la producción de ROS comparado con el cerebro de ratones *Col6a1*^{-/-} jóvenes y wild type viejos (Cescon et al., 2016). De igual forma, en el músculo esquelético de este ratón también se observan defectos en la autofagia y la inducción de ésta con rapamicina o ciclosporina A, atenúa los defectos musculares (Grumati et al., 2010). Vale la pena resaltar que la mayoría de los estudios que analizan la autofagia durante el envejecimiento, solo se enfocan en evaluar las alteraciones de componentes intracelulares y sus efectos en la actividad autofágica, sin embargo, sería interesante que se realizaran más estudios que demuestren cómo los cambios del medio extracelular durante el envejecimiento, pueden tener influencia sobre la autofagia.

En el envejecimiento también se ha descrito un fenotipo pro-inflamatorio caracterizado por el incremento en la secreción de citocinas como IL-1 β , entre otras (Salminen et al., 2012). Se

ha visto, que esta citocina es degradada a través de la autofagia, disminuyendo así su secreción; por el contrario, la inhibición de la autofagia conlleva a la activación del “inflammasoma”, un complejo de señalización que reconoce señales de daño dentro y fuera de la célula e induce la activación de proteínas pro-inflamatorias como NFκB, y un aumento en la secreción de IL-1β (Harris et al., 2011; Shi et al., 2012). En macrófagos de ratones viejos hay una disminución de la autofagia que se ha asociado con la hipermetilación en los promotores de genes autofágicos como *Lc3b* y *Atg5* (Khalil et al., 2016). Esto indica que el incremento en la inflamación durante el envejecimiento, podría estar asociado en parte a una alteración en la autofagia a nivel citoplásmico y nuclear lo que a su vez conlleva a la desregulación de las funciones celulares, exacerbando la inflamación durante el envejecimiento.

La actividad de la autofagia mediada por chaperonas, también disminuye durante el envejecimiento. Esto se debe principalmente a la disminución en los niveles del receptor LAMP2A, lo cual afecta la unión y la internalización de los sustratos que serán degradados dentro del lisosoma (Cuervo & Dice, 2000). Dependiendo del estímulo, se ha visto que los niveles de LAMP2A pueden ser regulados vía transcripcional o por cambios dinámicos que redistribuyen a esta proteína en la superficie de la membrana lisosomal, evitando su movilización hacia microdominios lipídicos en donde se encuentra la enzima catepsina A, la cual regula la degradación selectiva de LAMP2A dentro del lisosoma (Cuervo et al., 2003). Los niveles de LAMP2A se correlacionan con la actividad de la autofagia mediada por chaperonas (CMA, Chaperone-mediated autophagy, por sus siglas en inglés). Cuando se induce este tipo de autofagia, la unión de los sustratos con LAMP2A conlleva a la translocación de este receptor hacia el lumen de los lisosomas, sin embargo, para mantener niveles óptimos de degradación, otra fracción de LAMP2A es reinsertada hacia la membrana lisosomal. Esta dinámica en la membrana lisosomal, es responsable también de regular los niveles de LAMP2A (Cuervo & Dice, 2000). Se ha demostrado que en ratones viejos, la transcripción de LAMP2A se mantiene en niveles similares a los observados en ratones jóvenes. En lisosomas aislados de ratones viejos (12 a 22 meses de edad), se observó que la internalización de LAMP2A está reducida comparada con ratones jóvenes lo cual se correlaciona con una reducción en la unión y degradación de los sustratos por esta vía. Así mismo, la translocación de LAMP2A hacia el lumen del lisosoma ocurre a una tasa menor y el número de moléculas de LAMP2A que son regresadas hacia la membrana lisosomal, es significativamente menor. Por lo tanto, la disminución en los niveles de LAMP2A no se deben

a una disminución en la internalización de esta proteína, sino a defectos en el lisosoma que afectan, el procesamiento, degradación y distribución de LAMP2A para su posterior movilización y translocación del lumen hacia la membrana lisosomal (Kiffin et al., 2007). En hígado, la deficiencia de este tipo de autofagia, conlleva a una hiperactivación de la macroautofagia que parece estar compensando la pérdida de la CMA, sin embargo, durante el envejecimiento, éste efecto se ve atenuado. El hígado de ratones KO viejos, muestra un fenotipo con características similares a las que ocurren durante el envejecimiento, tales como, alto contenido de lípidos (hepatoestosis), incremento en la apoptosis de los hepatocitos, acumulación de proteínas oxidadas y defectos en el metabolismo de la glucosa y en la eliminación de drogas. Estos resultados indican que la reducción en la actividad de la autofagia mediada por chaperonas, exacerba los efectos de la disfunción hepática en el envejecimiento (Schneider et al., 2015).

Las alteraciones en el tráfico vesicular, son otros de los mecanismos moleculares que se han sugerido participan en la disminución de la autofagia durante el envejecimiento. En fibroblastos de ratones viejos se ha visto que en condiciones basales hay un menor número de vesículas autofágicas comparado con fibroblastos provenientes de ratones jóvenes. La inducción de la autofagia, da como resultado un incremento en la formación de autofagosomas, sin embargo, el número de autofagosomas y el flujo autofágico se encuentra reducido comparado con fibroblastos de ratones jóvenes. Para explicar esta reducción, Bejarano et al (2018) demostraron que el envejecimiento afecta a la autofagia basal e inducida de diferentes maneras. Por una parte, en condiciones basales hay defectos en la biogénesis y maduración de los autofagosomas, mientras que en condiciones de estrés aunque hay autofagosomas que se llegan a formar, estos no se fusionan con los lisosomas. Paradójicamente, los autofagosomas de ratones viejos, tienen una alta capacidad de fusión con los lisosomas incluso mayor que la observada en ratones jóvenes, por lo que esta característica no se encuentra afectada durante el envejecimiento. Tras la inducción de la autofagia, en los fibroblastos de ratones viejos, no hay una movilización de los lisosomas y autofagosomas hacia la región perinuclear ya que hay una reducción en los niveles de proteínas motoras como las kinesinas, las cuales se encargan de transportar diversas vesículas por el citoesqueleto. Interesantemente, en autofagosomas y lisosomas aislados de fibroblastos de ratones viejos, hay una reducción en la asociación de estas proteínas como la dineína y la kinesina KIFC3. Esta asociación es parcialmente incrementada cuando se induce la autofagia por déficit de nutrientes. Estos resultados indican que en este tipo celular, el

principal mecanismo asociado a la reducción en el flujo autofágico, es la disminución en la asociación de motores moleculares lo que afecta el tráfico vesicular, lo cuál puede ser parcialmente rescatado tras la inducción de la autofagia (Bejarano et al., 2018). En humano, se ha visto que fibroblastos de pulmón derivados de personas sanas de edad avanzada (mayores de 66 años) o con fibrosis pulmonar idiopática (FPI), una patología asociada al envejecimiento, hay una reducción significativa del flujo autofágico ya que la conversión de LC3-I hacia LC3-II se encuentra significativamente disminuida y hay una mayor acumulación de p62, lo que también está asociado a una reducción en la formación de autofagosomas, comparados con fibroblastos provenientes de personas jóvenes. Por medio de análisis de expresión de genes, se reportó que los fibroblastos de personas de edad avanzada mostraban un incremento en genes como AKT1 y BCL2L1, los cuales tienen un efecto inhibitorio en la vía de la autofagia. Sin embargo, de manera interesante también hay un incremento en la expresión de ATG4B, lo que probablemente podría estar representando un mecanismo compensatorio para estimular la autofagia. Así mismo, los fibroblastos de personas ancianas o con FPI muestran una activación constante de mTOR, la cual no se revierte a pesar de la inducción de la autofagia por medio del déficit de nutrientes. Estos resultados indican que, durante el envejecimiento y la fibrosis pulmonar idiopática, los defectos en la activación de la autofagia en fibroblastos pulmonares están asociados a la activación persistente de mTOR, sin embargo, es probable que otros mecanismos como los mencionados en párrafos anteriores, también puedan estar influyendo en la disminución de la autofagia en este tipo celular (Romero et al., 2016).

La evidencia acerca del papel de la autofagia en el envejecimiento es numerosa. Las investigaciones indican que los defectos en la actividad autofágica se deben a distintos mecanismos, ha sido ampliamente aceptado que la disminución de la autofagia es una característica del envejecimiento que también contribuye con el desarrollo de distintas patologías.

ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo que se encuentra en las células eucariontes y está formado por un sistema continuo de membranas llamadas cisternas o túbulos, las cuales tienen distintos dominios en los que se llevan a cabo diferentes funciones. Estos dominios incluyen los sitios de contacto con otros organelos como las mitocondrias, la envoltura

nuclear, el retículo endoplásmico rugoso, en donde se encuentran los ribosomas y ocurre la síntesis y modificación de las proteínas, así como el retículo endoplásmico liso en donde se lleva a cabo el metabolismo de lípidos y carbohidratos (Voeltz et al., 2002). El retículo endoplásmico también participa en la biogénesis de los peroxisomas, en el transporte de las proteínas que serán secretadas al medio extracelular y es el principal reservorio de calcio intracelular (Xu et al., 2005). Así mismo, se ha propuesto que es uno de los sitios de origen de las membranas autofagosomales (Tooze & Yoshimori, 2010). En el lumen de este organelo, hay un ambiente oxidativo que es necesario para la formación de los puentes disulfuro entre las cadenas polipeptídicas, así como para el plegamiento de las proteínas.

Debido a sus diversas funciones, en este organelo se encuentran chaperonas, oxidoreductasas, enzimas de glicosilación, entre otras proteínas, las cuales contribuyen a mantener la proteostasis a través del estricto control en el plegamiento de las proteínas. Diversos tipos de estímulos o daños a la célula pueden alterar las funciones del retículo endoplásmico ocasionando la acumulación de proteínas mal plegadas y dando como resultado el estrés de retículo endoplásmico. Las perturbaciones en este organelo, conllevan a la activación de una respuesta adaptativa y conservada evolutivamente, llamada UPR (**U**nfolded **P**rotein **R**esponse, por sus siglas en inglés); los componentes moleculares de este mecanismo fueron identificados primero en la levadura *S. cerevisiae*, posteriormente en mamíferos se han descubierto tres diferentes elementos los cuales son los principales responsables de sensar el correcto plegamiento de las proteínas (Hwang et al., 2018). Los tres elementos esenciales de la respuesta UPR en mamíferos son la endoribonucleasa IRE1 α (en inglés, **i**nositol-**r**equiring **e**nzyme **1- α**), la cinasa PERK (en inglés, **p**rotein **k**inase **R**NA-like endoplasmic reticulum **k**inase) y el factor de transcripción ATF6 α (**a**ctivating **t**ranscription **f**actor **6**, por sus siglas en inglés). Cuando hay estrés de retículo endoplásmico, estos tres sensores, IRE1 α , PERK y ATF6 α , integran las señales e intensidad del estrés y transducen del lumen del retículo hacia el núcleo la información acerca del estado de la proteostasis (Hetz et al., 2015) (**Figura 13**). A su vez, estas señales activan a otras proteínas y vías de señalización que detendrán temporalmente la síntesis de proteínas para atenuar el estrés a través de la reorganización y expansión de las membranas del retículo para aumentar su capacidad, incrementar la asistencia en el plegamiento de las proteínas mal plegadas o activando procesos de degradación asociados al retículo endoplásmico, también conocido como mecanismo ERAD (**E**R-**a**ssociated **d**egradation, por sus siglas en inglés), a través del

cual las proteínas son llevadas a la degradación vía el sistema ubiquitina proteosoma o autofagia (Varadarajan et al., 2012; Olzmann et al., 2013). La activación de todos estos mecanismos, tiene como objetivo recuperar la homeostasis del retículo endoplásmico, sin embargo, si el estrés es crónico o agudo y este no se resuelve adecuadamente, la respuesta UPR y los diferentes sensores, inician la activación de la apoptosis (Tabas et al., 2011).

Principales componentes y marcadores de la respuesta UPR

IRE1 α (inositol-requiring enzyme 1- α)

La endoribonucleasa IRE1 α , fue el primer componente descrito de la respuesta UPR, y es el único sensor que se encuentra en todos los eucariontes, por lo tanto es el más conservado evolutivamente dentro de la vía UPR. IRE1 α es una proteína transmembranal tipo I, y consta de un dominio aminoterminal el cual se encuentra en el lumen del RE y sensa el estado de plegamiento de las proteínas. El dominio carboxilterminal se encuentra en la región citoplasmática y tiene actividad de cinasa y RNAsa. Ante el estrés de retículo endoplásmico, IRE1 α tiene cambios conformacionales que le permiten oligomerizarse en el plano lateral de la membrana del RE, para posteriormente autotransfosforilarse y activar los dominios de RNAsa. Una vez que IRE1 α está activo, por medio de su actividad de RNAsa, lleva a cabo el splicing no convencional del mRNA del factor de transcripción XBP1 (**X**-box **b**inding **p**rotein **1**) (**Figura 13**). El dominio de RNAsa de IRE1 α , también regula la estabilidad de diversos mRNAs, ya que por medio de su actividad de endoribonucleasa corta en secuencias o estructuras secundarias específicas y con ello modula la degradación de distintos mRNAs, RNAs ribosomales y microRNAs a través de un mecanismo conocido como RIDD (en inglés, **r**egulated **I**RE1-**d**ependent **d**ecay) (Chen & Brandizzi, 2013). Se ha propuesto que dependiendo del estado de oligomerización de IRE1, ocurrirá la activación de XBP1 y RIDD, sin embargo, estos mecanismos son opuestos, ya que el primero activa vías de supervivencia, mientras que el segundo controla vías de inflamación y apoptosis (Maurel et al., 2014; Tam et al., 2014). Aunque no ha sido descrito, es probable que IRE1 α sense la intensidad y duración del estrés y dependiendo de esto se activará a XBP1 o el mecanismo RIDD.

XBP1(X-box binding protein 1)

Como ya se mencionó anteriormente, la respuesta a UPR conlleva a la activación de distintas proteínas que transducirán la información del estrés hacia el núcleo. Una de estas proteínas, es el factor de transcripción XBP1. El splicing de XBP1 se ha definido como un proceso no convencional ya que no ocurre en el núcleo y no es llevado a cabo por el spliceosoma. Por el contrario, el splicing es catalizado por IRE1 α en el citoplasma. En condiciones basales el mRNA de XBP1 se encuentra en su forma no procesada (*XBP1-U*) en el citoplasma y asociado a las membranas del RE (Uemura et al., 2009). Ante el estrés de RE, el splicing de XBP1 no ocurre por la transcripción *de novo* del gen de esta proteína, más bien, el *pool* citoplasmático de *XBP1-U* es el sustrato de IRE1 α ; esta enzima remueve un intrón de 26 nucleótidos localizados en una estructura secundaria (loop) del mRNA, lo que modifica el marco de lectura eliminándose los nucleótidos que codifican para 97 aminoácidos del carboxilo terminal y añadiéndose los nucleótidos para 212 aminoácidos al **extremo N-terminal**, que contienen el dominio bZIP (basic leucine zipper) el cual se une a secuencias específicas denominadas como elementos de respuesta al estrés. El splicing del mRNA de XBP1 (*XBP1-S*), genera una proteína con una secuencia de translocación al núcleo para transcribir diversos genes asociados con la respuesta UPR y de esta manera amplificar la señal (**Figura 13**). La activación de XBP1, ha sido asociada con un incremento en la síntesis de diversos fosfolípidos para favorecer la biogénesis y la expansión de las membranas del RE lo cual aumentará la capacidad secretoria del RE y también contribuirá en la atenuación del estrés (Bommiasamy et al., 2009; Sriburi et al., 2004). (Yoshida et al., 2001). Se ha visto que en las etapas tardías del estrés de RE, incrementan los niveles del mRNA de *XBP1-U*, mientras que disminuyen los de *XBP1-S*. Esto se debe a que *XBP1-U* contiene secuencias de localización nuclear y citoplásmica, las cuales le permiten translocarse al núcleo o viceversa para localizar y unirse a *XBP1-S*. Interesantemente, el mRNA de *XBP1-U* contiene un dominio de degradación del cual carece *XBP1-S*, y se ha postulado que *XBP1-U* al formar un complejo con *XBP1-S*, lo hace menos estable y lo lleva a su degradación vía proteosoma para de esta manera, apagar la señalización de la vía UPR (Yoshida et al., 2006).

ATF6 (activating transcription factor 6)

ATF6 es una familia de factores de transcripción, de la cual destacan las dos principales ATF6 α y ATF6 β , las cuáles se expresan en niveles similares en el RE. ATF6 se encuentra como una proteína transmembranal con un dominio citosólico que al igual que IRE1 α , sensa el estado de plegamiento de las proteínas (Chen et al., 2002). En su dominio citosólico

contiene una región bZIP, y tras la acumulación de proteínas mal plegadas y la activación de la respuesta UPR, las dos isoformas de ATF6 son empaquetadas en vesículas que serán transportadas desde el RE hasta el aparato de Golgi y posteriormente serán procesadas por las enzimas S1P y S2P las cuales removerán el dominio luminal y liberarán un fragmento citosólico de aprox 50-60kDa (ATF6f) que les permitirá translocarse al núcleo y transcribir genes como XBP1, genes que codifican para chaperonas que asistirán en el plegamiento de proteínas, como por ejemplo BiP y genes asociados a la degradación tipo ERAD (Ye et al., 2000) (**Figura 13**).

BiP/GRP78 (Binding immunoglobulin protein/78kDa glucose-regulated protein)

Las chaperonas del retículo endoplásmico, también asisten en el plegamiento de las proteínas y son necesarias para identificar proteínas inmaduras o mal plegadas. La chaperona BiP (también denominada GRP78 o HSPA5) es un miembro de la familia de las chaperonas Hsp70, y es una de las más abundantes en el RE. BiP es fundamental para la activación de los tres sensores durante la respuesta UPR. En condiciones basales, BiP se encuentra en el lumen del RE unida a PERK, IRE1 α y ATF6. Se ha postulado que la unión de BiP con estas proteínas, evita por una parte su unión a las proteínas inmaduras (que apenas se están plegando y translocando), y por otro lado, también previene la oligomerización y activación de IRE1 α , ATF6 y PERK (Braakman et al., 2013; Pincus et al., 2010; Shen et al., 2005). Durante el estrés del RE, BiP es liberada de cada uno de los transductores, y con ello también se permite su unión a proteínas mal plegadas. BiP consta de dos dominios: un dominio de ATPasa y otro de unión al sustrato, el cual contiene regiones hidrofóbicas que le permite reconocer y unirse a proteínas con un plegamiento incorrecto; la afinidad de la unión entre BiP y sus sustratos, también es esencial para evitar la agregación de los mismos (Wang et al., 2009). BiP también es un regulador de la respuesta UPR, ya que se ha visto que la sobreexpresión de esta proteína, inhibe la activación de esta vía (Bertolotti et al., 2000).

PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)

Similar a IRE1 α , PERK es una proteína transmembranal tipo I que tiene un dominio luminal que sensa las señales de estrés, y un dominio citoplásmico con actividad de cinasa. Recientemente, se publicó que PERK, a través de su primer dominio, también reconoce y se une a proteínas mal plegadas y evita su agregación. Esta unión es importante, ya que

promueve la oligomerización de PERK ante el estrés del RE (Wang et al., 2018). Ante la activación de la respuesta UPR, PERK además de oligomerizarse, se autotransfosforila, sin embargo, contrario a IRE1 α que sólo puede fosforilarse a sí mismo, PERK reconoce y fosforila a la proteína eIF2 α (ekaryotic translation initiation factor-2, por sus siglas en inglés) lo que disminuye la síntesis y la traducción de proteínas. PERK también fosforila y activa al factor de transcripción NRF2, el cual está involucrado en la expresión de genes asociados con mecanismos antioxidantes (Cullinan & Diehl, 2004) (**Figura 13**). La fosforilación de eIF2 α , conlleva a la traducción selectiva del factor de transcripción ATF4 que transcribe genes que codifican para proteínas relacionadas con el plegamiento de proteínas, autofagia y el metabolismo de aminoácidos. Así mismo, cuando el estrés del RE es irreversible, ATF4 promueve la transcripción de CHOP, un factor de transcripción que induce la activación de la apoptosis (Hetz, 2015).

CHOP (C/EBP Homologous Protein)

Como ya se mencionó, CHOP es activado a través de la vía PERK/eIF2 α /ATF4. CHOP pertenece a la familia de los factores de transcripción C/EBP (CCAT/enhancer binding proteins) que regulan una variedad de procesos fisiológicos. Esta proteína se compone de dos dominios funcionales: un dominio N-terminal de activación transcripcional y un dominio **C-terminal** bZIP. En condiciones basales, CHOP se expresa en bajos niveles y se localiza en el citosol, sin embargo, su expresión se induce por diversos tipos de estrés, como la hipoxia, estrés oxidativo, privación de nutrientes y el estrés de RE (Oyadomari & Mori, 2004). Al incrementar la expresión de CHOP, este se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes blanco, principalmente genes involucrados en la apoptosis, ya que reprime la expresión de genes anti-apoptóticos como BCL2 para permitir la liberación de proteínas pro-apoptóticas como BIM, PUMA y BAX-BAK. CHOP es fosforilado en la Ser78 y Ser81 por parte de p38 (proteína de la familia de las MAP cinasas), esto es necesario para favorecer su actividad transcripcional. Por otra parte, CHOP puede formar heterodímeros con ATF4 para transcribir genes como GADD34, el cual también desencadena la apoptosis, y de esta manera amplificar la señal de muerte celular (Tabas et al., 2011). Adicionalmente, CHOP puede incrementar el ambiente oxidativo en el retículo endoplásmico al activar a la oxireductina ERO1 α , favoreciendo con ello la apoptosis. Por otro lado, se ha visto que incluso en condiciones de estrés, CHOP se puede localizar en el citoplasma e impide la translocación al núcleo de distintos factores de transcripción que pueden promover la activación de vías de

supervivencia. Cuando el estrés del RE es atenuado es necesario bajar los niveles de expresión de CHOP. Se ha visto que esta proteína se degrada por medio del **proteosoma**. Una lisina en el extremo N-terminal es necesaria para que CHOP se ubiquitine y posteriormente se degrade (Kim et al., 2008).

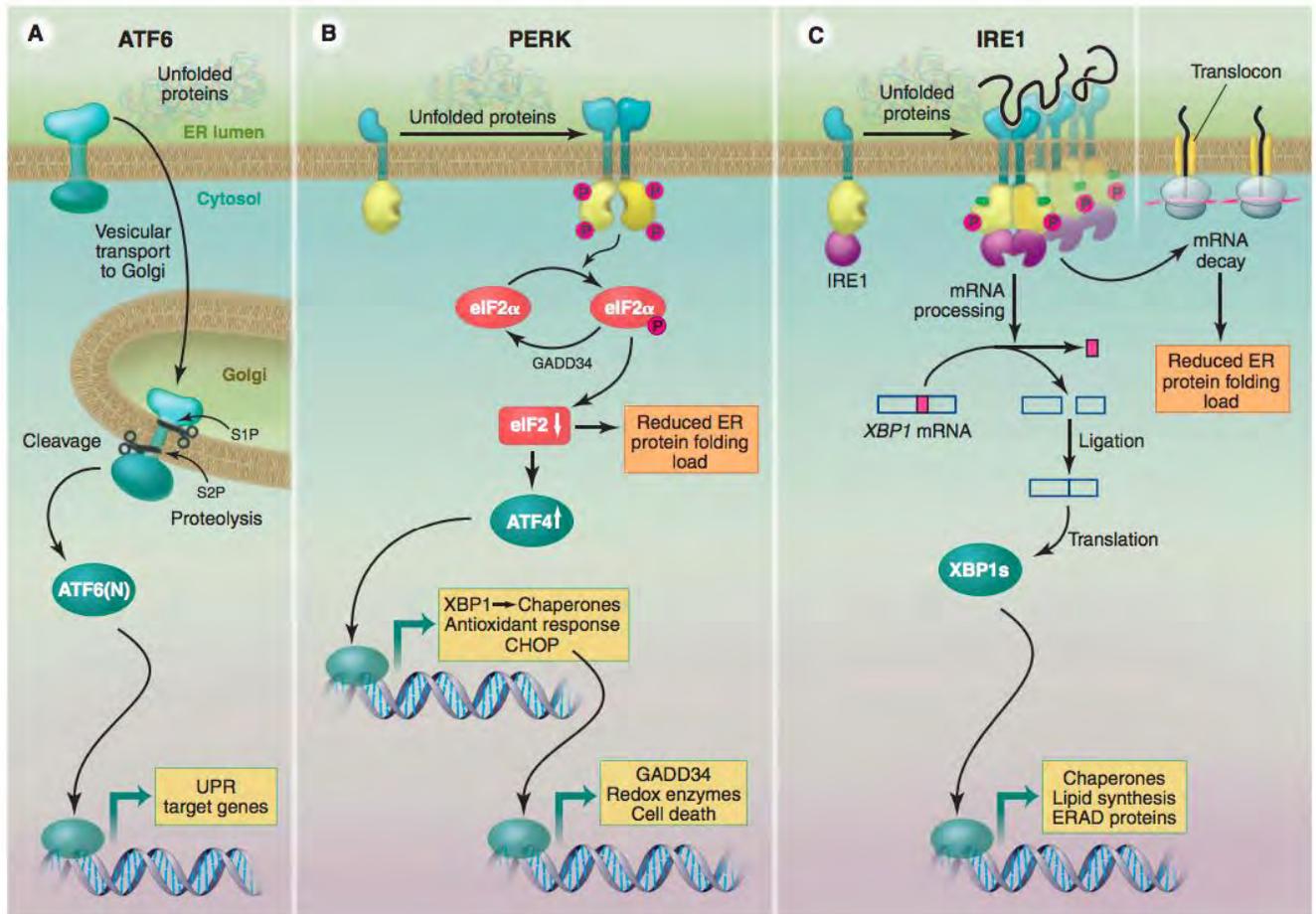


FIGURA 13. ATF6, PERK e IRE1, son los tres sensores del RE que controlan la activación de la respuesta UPR. Las proteínas ATF6, PERK e IRE1, están encargadas de sentir el estado de plegamiento de las proteínas que están siendo recién sintetizadas. Cuando hay proteínas mal plegadas, los distintos sensores se activan y lo que también resulta en la activación de factores de transcripción, que transmitirán la información del lumen de retículo endoplásmico hacia el núcleo para promover la transcripción de diferentes genes que contribuirán a reestablecer el plegamiento de las proteínas. ATF6, es activado por **proteólisis** para después poderse translocar al núcleo. PERK se autofosforila y después fosforila a eIF2 α para disminuir la traducción de proteínas nuevas. IRE1, controla el splicing de XBP1, la cual se translocará al núcleo y junto con ATF6 promoverán la transcripción de genes involucrados en la respuesta al estrés. La activación de estas proteínas, tiene como objetivo atenuar el mal plegamiento de las proteínas y restaurar la homeostasis del retículo endoplásmico (Tomada de Walter & Ron, 2011).

Estrés de retículo endoplásmico y autofagia

El principal objetivo de la activación de la respuesta UPR, es atenuar el estrés y restablecer la homeostasis del retículo endoplásmico. Las proteínas que no puedan volver a plegarse serán enviadas a degradación vía ERAD, este mecanismo como ya se mencionó, solo se activa ante el estrés del RE e involucra la activación de la autofagia y del proteosoma. En el caso de este último, se ha visto que degrada principalmente proteínas residentes del RE, mientras que la autofagia degrada agregados de proteínas o cadenas de polipéptidos que son difícilmente degradadas por el proteosoma (Hwang et al., 2018; Houck et al., 2014), un ejemplo de proteínas que se acumulan, generando estrés del RE y que son degradadas vía autofagia, son la procolágena y la antitripsina- α 1 mutante (Ishida et al., 2009; Teckman & Perlmutter, 2000). Además de la degradación de agregados proteicos, la activación de la autofagia, también constituye un mecanismo de supervivencia para evitar la muerte celular. En células de mamífero, se ha visto, que tras la inducción del estrés de RE con diversas drogas como la tunicamicina (inhibidor de la N-glicosilación), el DTT (agente reductor que afecta la formación de puentes disulfuro) o la tapsigargina (inhibidor de la ATPasa de Calcio del RE), se induce la formación de autofagosomas y se incrementa la conversión de LC3-I a LC3-II. En células deficientes de IRE1 α , la activación de la autofagia está severamente disminuida a pesar de la inducción del estrés de RE, pero interesantemente, la deficiencia de IRE1 α no afecta el flujo autofágico inducido por la deprivación de nutrientes, lo que indica, que la autofagia se induce por diversas señales y depende del tipo de estrés celular. Por otra parte, cuando se inhibe la expresión de genes esenciales de la autofagia, como *Atg5*, las células son más susceptibles al tratamiento con tunicamicina o la tapsigargina e inducen la apoptosis (Ogata et al., 2006), lo que indica que la activación de la autofagia durante el estrés de RE, tiene un papel citoprotector ante el estrés de RE. En otro estudio se demostró que los agregados de la proteína polyQ (característica que presentan los pacientes con enfermedad de Huntington), inducen estrés de retículo endoplásmico y un incremento en los niveles de Atg12 y en la conversión de LC3, esto es dependiente de la activación de PERK y eIF2 α . Lo que confirma que los distintos sensores del estrés de RE, participan en la activación de la autofagia. Así mismo, la autofagia favorece la degradación de los agregados de polyQ, sin embargo, cuando la autofagia no es suficiente para degradarlos, se induce la muerte celular (Kouroku et al., 2007). La inducción del estrés del RE, da como resultado la inhibición de mTOR lo que también está correlacionado con un aumento en los niveles de LC3-II. A tiempos cortos, la activación de la autofagia parece tener un papel principalmente protector ante el estrés de RE, mientras que una larga duración del estrés y altos niveles de autofagia,

parecen ser perjudiciales para las células y se favorece la muerte celular vía autofagia y apoptosis (Qin et al., 2010). Se ha visto que la inducción de la autofagia, no solo está asociada con la eliminación de agregados proteicos sino también con la degradación de la membrana del retículo endoplásmico. En levadura, se ha descrito que este tipo de degradación es selectiva y se ha denominado “reticulofagia”. La degradación del RE por esta vía, no requiere de la maquinaria canónica de la autofagia, sin embargo, se han descrito dos nuevos componentes: Atg39 y Atg40, los cuales se encuentran en el RE, y cuya presencia es esencial para llevar a cabo la reticulofagia. Estas proteínas, funcionan como receptores y están encargados de degradar distintas regiones del RE (Schuck et al., 2014; Mochida et al., 2015). En células de mamífero, las proteínas FAM134A, FAM134B y FAM134C, que se encuentran en el retículo endoplásmico, interactúan con LC3 y GABARAPL2. Específicamente, FAM134B actúa como receptor para la degradación selectiva del RE, y probablemente participa en la fragmentación de este organelo y, a través de la interacción con LC3 favorece su internalización en los autofagosomas. Contrario a lo que sucede en *S. cerevisiae*, la reticulofagia en mamíferos **sí** requiere de la maquinaria canónica de la autofagia ya que cuando se elimina la expresión de genes como *Atg5* y *Beclin1*, se abate la degradación del RE. La inhibición de la expresión de FAM134B en células y en ratón, conlleva a una alteración en la morfología del RE, caracterizada por una hiperexpansión en las membranas de este organelo. Aunque otros tipos de autofagia parecen no estar afectados debido a la ausencia de esta proteína, *in vitro* la viabilidad de las células disminuye significativamente cuando son sometidas a estrés como la deprivación de nutrientes. *In vivo*, la deficiencia de FAM134B es evidente solo en ratones viejos, los cuales aunque no muestran alteraciones en las neuronas, tienen una disminución en la transmisión de impulsos sensitivos debido a la pérdida de los axones sensoriales y a la disminución en la mielinización de los mismos. Aunque no se evaluaron los niveles de autofagia en estos animales, es probable que la alteración en la homeostasis del RE y su degradación, aunado a la disminución de la autofagia en el envejecimiento, exacerbe la acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas lo que podría favorecer el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Khaminets et al., 2015). Serían interesantes, más estudios que evalúen el papel de esta proteína y la reticulofagia durante el estrés de RE en diversos tejidos, tipos celulares y el envejecimiento.

El papel de la autofagia como respuesta protectora ante el estrés de RE, ha ganado cierto interés en los últimos años y numerosos estudios han surgido para entender cómo es que

estos procesos están relacionados. Diversas publicaciones han mostrado que la alteración en ambos mecanismos está asociada con el desarrollo de distintas patologías, como por ejemplo, obesidad, Alzheimer, Parkinson, cáncer, diabetes, entre otras. Aunque aún se siguen describiendo los mecanismos y componentes necesarios para regular la actividad autofágica ante el estrés de RE, ha sido ampliamente aceptado que la respuesta autofágica contribuye con la atenuación del estrés de RE a través de la degradación de material citotóxico y con ello promueve la supervivencia celular.

Estrés de retículo endoplásmico y envejecimiento

Como se ha mencionado previamente, una de las características del envejecimiento es la alteración en la red de proteostasis. Diversos estudios han analizado la activación de la respuesta UPR en diferentes tejidos durante el envejecimiento. En el hipocampo de ratas viejas, la inhibición del proteosoma induce estrés del RE y la activación de XBP1 y ATF6 está disminuída en estos animales; por el contrario, muestran altos niveles de las proteína pro-apoptóticas CHOP, BAX y BAK (Gavilán et al., 2009). De forma similar, en corteza cerebral, cerebelo, pulmón, hígado, riñón, corazón y bazo de ratas viejas, en condiciones basales, hay una disminución en los niveles de proteína de eIF2 α fosforilada, ATF4 y BiP, y un incremento en los niveles de PERK, CHOP y GADD34 (Hussain et al., 2007).

La edad avanzada también se ha asociado con el desarrollo de diversas patologías óseas como la osteoporosis y la osteoartritis. Esta última, se caracteriza por la degeneración del cartílago e inflamación de las articulaciones. La apoptosis de los condrocitos es el principal mecanismo que conlleva a la degradación del cartílago y se asocia con la severidad de la enfermedad. En pacientes con osteoartritis, se ha visto que tienen una elevada expresión de BiP, ATF6, IRE1 α y XBP1-S. De forma interesante, la inhibición de XBP1-S, favorece la translocación de CHOP al núcleo y la activación de la apoptosis. Así mismo, el silenciamiento de XBP1-S, conlleva a un incremento en la expresión de moléculas asociadas a la degradación de la matriz extracelular, tales como MMP3, MMP13 y ADAMTS5, y una disminución en la producción de agrecan y colágena (Guo et al., 2014). En huesos provenientes de ratones viejos, se ha visto que hay un incremento en los niveles del mRNA de CHOP, ATF4 y XBP1 y esto está asociado aparentemente con la pérdida de masa ósea (osteopenia) y defectos en los estímulos mecánicos (Chalil et al., 2014). En retina, se ha visto que la activación crónica de la respuesta UPR, conlleva a la sobreexpresión de citocinas pro-

inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α y NF- κ B. La persistente activación de la respuesta UPR está asociado a la pérdida de las células fotorreceptoras y degeneración de la retina. Aunque este estudio se realizó en retinas de ratones jóvenes, se ha propuesto que la atenuación de esta respuesta podría ser una estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades oculares (Rana et al., 2014). En retinas de ratones viejos, se ha visto que hay una disminución en la expresión de XBP1 y un incremento en CHOP. La eliminación condicional de XBP1 en este tejido, acelera la pérdida de la función y estructura retinal y exacerba las alteraciones metabólicas, como la disminución de la glicólisis (McLaughlin et al., 2018). De forma opuesta, en macrófagos peritoneales aislados de ratones viejos, se ha demostrado que la inhibición de XBP1 protege a estas células de la apoptosis inducida por el tratamiento con tunicamicina (Song et al., 2013). Estos estudios demuestran que la función de XBP1 tiene distintos efectos dependiendo el tipo y microambiente celular y, aunque no se ha evaluado, es probable que tenga otras funciones además de la atenuación del estrés del RE. Li y Holbrook (2004) han mostrado que los hepatocitos derivados de ratas viejas, son más sensibles a la inducción de estrés de RE con tunicamicina y muestran una hiperactivación de la vía PERK/eIF2 α así como una elevada expresión de CHOP. En modelos de mamíferos longevos, como por ejemplo la rata topo desnuda, interesantemente se ha visto que fibroblastos de piel derivados de este animal son resistentes a diversos tipos de estrés, sin embargo, son susceptibles a la inducción de estrés del RE con tapsigargina y tunicamicina comparados con fibroblastos de ratones no longevos (Salmon et al., 2008). En el ratón enano *Snell*, que también es un modelo de longevidad, se ha visto que los fibroblastos expuestos al tratamiento con tapsigargina, muestran una activación normal de la respuesta UPR, pero también tienen mayores niveles de CHOP y Caspasa12. De forma interesante, los fibroblastos de estos ratones muestran una disminución en la expresión de IRE1 y menor splicing de XBP1. Los autores proponen que una rápida activación de la apoptosis tras la inducción del estrés de RE, favorece que las células dañadas sean eliminadas más rápido lo que promueve que la homeostasis se recupere más rápidamente y esto les confiere una ventaja de supervivencia y una mayor adaptación al estrés, comparado con los ratones no longevos (Sadighi et al., 2011). Adicionalmente, también se ha publicado que la activación de la respuesta UPR favorece la senescencia celular, sin embargo, dependiendo del estímulo los diferentes sensores y los componentes río abajo, se activan de manera distinta, por lo que se ha propuesto que la UPR es un componente del fenotipo senescente que podría también estar favoreciendo un microambiente pro-inflamatorio. Aunque aún no se sabe si la activación de la UPR podría

favorecer la entrada a senescencia o si como consecuencia de la senescencia se activa esta vía (Pluquet et al., 2015).

En conclusión, la mayoría de los estudios muestra que el envejecimiento está asociado a alteraciones en la homeostasis del retículo endoplásmico que alteran el la síntesis, plegamiento y transporte de proteínas. Por un lado, diferentes estudios muestran una activación crónica de la respuesta UPR, y por otro lado, se ha publicado que tras la inducción de estímulos que generan estrés, hay deficiencias en la activación de la vía UPR lo que podría estar contribuyendo a que se presenten altos niveles de estrés de RE que no se están resolviendo adecuadamente lo que favorece la inflamación y la alteración en las funciones celulares y tisulares. Cabe mencionar, que la respuesta UPR es un mecanismo adaptativo que, a través de los distintos sensores activa diversas vías para atenuar el daño citotóxico, por lo cual, las alteraciones en la respuesta UPR, podrían estar teniendo efectos pleiotrópicos en otras vías. Como ya se ha enunciado en párrafos anteriores, la pérdida de la proteostasis también está asociada con la disminución en la autofagia. Aunque es claro que la respuesta al estrés de RE, es tejido y célula específico, aún son necesarios más estudios que evalúan cuál es la relación entre los componentes de la vía UPR, la deficiencia en la autofagia y su papel en el envejecimiento, para poder sugerir estrategias terapéuticas contra el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad.

ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDADES FIBROSANTES

La fibrosis, es una condición patológica que ocurre en diversos tejidos como piel, corazón, páncreas, riñón, hígado y pulmón y se debe a la acumulación excesiva de distintas moléculas de la matriz extracelular, tales como la fibronectina, laminina y en especial las colágenas fibrilares. Las causas que originan la fibrosis pueden diferir de acuerdo al órgano en donde ocurra. Por ejemplo, en el caso de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), se ha propuesto que es el resultado de una respuesta exacerbada de las células que producen matriz extracelular como un mecanismo de reparación ante un daño crónico o severo a las células epiteliales alveolares del pulmón, y se ha demostrado que la inflamación no participa en la patogénesis de esta enfermedad (Selman & Pardo, 2006; Selman & Pardo, 2014) . En el caso de la fibrosis cardiaca, la apoptosis de los cardiomiocitos o la inflamación del miocardio, pueden desencadenar la activación de señales profibróticas (Kong et al., 2013). Por el contrario, en escleroderma se ha demostrado que el daño a las células endoteliales así como las

alteraciones autoinmunes, inducen un reclutamiento de leucocitos y células mesenquimales, los cuales se acumulan y en conjunto favorecen que se desencadene una respuesta inflamatoria exacerbada y prolongada la cual no se resuelve adecuadamente y daña la microvasculatura promoviendo con ello una constante remodelación del tejido y conllevando a la fibrosis (Abraham & Varga, 2005).

Como consecuencia, este proceso conlleva a la formación de una cicatriz aberrante que conlleva a alteraciones morfológicas y fallas en las funciones tisulares. Distintos tipos celulares como las células epiteliales, macrófagos, fibroblastos y miofibroblastos, están involucrados en el desarrollo y la progresión de la fibrosis. Las causas, mecanismos y factores que conllevan a la fibrosis en los diferentes tejidos son distintas entre sí, sin embargo, ha sido ampliamente aceptado que los procesos relacionados con la biosíntesis, depósito y degradación de matriz extracelular, se encuentran alterados (Urban et al., 2015). Se ha propuesto que en la mayoría de los tejidos, el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de fibrosis (Yang et al., 2014; Delire et al., 2017; Horn et al., 2016; Selman et al., 2016). En este trabajo, nos enfocaremos únicamente en los mecanismos moleculares asociados al desarrollo de fibrosis pulmonar idiopática.

Fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

La FPI, es una de las formas más comunes y agresivas de las neumonías intersticiales difusas **idiopáticas** y se caracteriza por ser una patología crónica, progresiva y usualmente letal. La etiología de la FPI es desconocida, sin embargo, la evidencia sugiere que daños crónicos a las células epiteliales alveolares provocan la muerte celular de las mismas y la activación del epitelio pulmonar lo que induce la activación de mecanismos de reepitelización aberrante, así como el reclutamiento de células mesenquimales y fibroblastos que participan en la acumulación excesiva de matriz extracelular y la consecuente destrucción del parénquima pulmonar (Selman & Pardo, 2006; Martínez et al., 2017). La incidencia y la prevalencia de la FPI incrementan en personas mayores de 60 años, por lo cual se ha denominado que esta patología es una enfermedad asociada al envejecimiento (Ley & Collard, 2013; Nalysnyk et al., 2012). Aún no está claro cuáles son los mecanismos moleculares que determinan la susceptibilidad al desarrollo de la FPI en el envejecimiento, sin embargo, se ha propuesto que esta enfermedad también podría ser el resultado de un envejecimiento acelerado del pulmón (Selman et al., 2016). De hecho, varias de las características que se presentan en el

envejecimiento han sido identificadas en pulmones de pacientes con FPI y se han replicado en modelos murinos, por ejemplo, el acortamiento de telómeros (Snetselaar et al., 2017; Povedano et al., 2015), la senescencia celular de las células epiteliales alveolares (Chilosi et al., 2013), alteraciones en las funciones mitocondriales, daño oxidativo (Mora et al., 2017), cambios epigenéticos (Yang et al., 2014) y pérdida de la proteostasis (Meiners et al., 2015).

La proteostasis en la FPI: el papel de la autofagia y el estrés de retículo endoplásmico en el desarrollo de fibrosis pulmonar.

Además de los mecanismos antes mencionados, se ha **demostrado** que una forma de fibrosis pulmonar familiar está asociada con mutaciones en el gen que codifica para la proteína surfactante C (*SFTPC*). Esta mutación, altera el procesamiento y plegamiento del precursor de la proteína surfactante (proSP-C) reteniéndola en el retículo endoplásmico e inhibiendo su secreción (Thomas et al., 2002). *In vitro*, se ha publicado que en células epiteliales A549, la mutación en el dominio BRICHOS, esencial para el procesamiento y transporte de proSP-C, induce la formación de agregomas, estrés de RE, incremento en los niveles de XBP1 y BiP y apoptosis (Mulugeta et al., 2005). Así mismo, se demostró que específicamente en el epitelio alveolar de pacientes con fibrosis pulmonar familiar no asociada a la mutación del gen *SFTPC* y en pacientes con fibrosis pulmonar esporádica, se detectó acumulación de proSP-C asociado con la activación de BiP, XBP1 y ATF6 así como un elevada expresión de CHOP y caspasa-3 activa. (Lawson et al., 2008; Korfei et al., 2008). Estos estudios, propusieron que las alteraciones en el plegamiento y la formación de agregados tóxicos de proSP-C, son la principal causa de estrés de RE y activación de la respuesta UPR lo que favorece la apoptosis de las células epiteliales alveolares. Por otro lado, cómo ya se ha mencionado previamente, el estrés de RE es un inductor de la vía de la autofagia, pero otros tipos de estrés como el daño oxidativo y las alteraciones mitocondriales que también están presentes en la FPI, pueden activar este proceso. En 2012, Patel y colaboradores reportaron que en extracto de pulmones de pacientes con FPI, hay un incremento en los niveles de XBP1, comparado con extractos de pulmones sanos, un hallazgo que confirmó los resultados previamente mencionados. A pesar de este resultado, se observó que había una disminución significativa en los niveles de LC3-II, lo que indica que a pesar de la activación de vías de estrés que inducen la autofagia, ésta última no se está activando en el pulmón de pacientes con FPI. Asociado a esto, se observó que en comparación con el tejido

de pacientes sanos, en el epitelio alveolar de pulmones con FPI no hay formación de autofagosomas y existe una clara acumulación de p62 que colocaliza con agregomas de proteínas. En este mismo estudio, se demostró que en fibroblastos humanos, el tratamiento con la citocina profibrosante TGF- β 1, activa a mTOR y a pesar de la inducción de la autofagia con rapamicina o por medio de la deficiencia de nutrientes, no hay activación de este proceso. Interesantemente, la inhibición de la autofagia, favorece la activación de los fibroblastos y un incremento en la expresión de fibronectina. Aunque en este artículo no se evaluaron la acumulación de proteínas u otros marcadores de activación de la vía UPR, o el efecto de la deficiencia de la autofagia en células epiteliales, este estudio postuló por primera vez que en la FPI a pesar de haber estrés de RE, no hay activación de la autofagia (Patel et al., 2012). Posteriormente, Araya et al. publicaron que en células bronquiolares humanas, la inhibición de la autofagia y la inducción del estrés de RE por medio del tratamiento con tunicamicina, induce senescencia celular y daño al DNA. Adicionalmente, en biopsias de pulmones con FPI, por medio de inmunohistoquímica los autores mostraron que en el epitelio alveolar y en lesiones que demostraban destrucción del tejido y fibrosis, no se detectó la presencia de Beclin1 y LC3 y por el contrario, había una alta expresión de p62 y los marcadores de senescencia p21 y β -galactosidasa (Araya et al., 2013). En este estudio, se propuso que en la FPI la insuficiencia de la autofagia y el incremento en el estrés de RE, podrían estar induciendo la senescencia de las células epiteliales alveolares y favorecer la diferenciación de los fibroblastos hacia un fenotipo profibrosante. Por otro lado, en fibroblastos derivados de pacientes con FPI, se ha visto que a nivel basal hay una disminución del flujo autofágico, una reducción en el número de autofagosomas y una activación de mTOR, la cual se mantiene aún cuando se estimula la inducción de la autofagia por medio del ayuno o déficit de nutrientes. De forma interesante, a pesar del estrés inducido y los defectos en la activación de la autofagia, los fibroblastos de FPI son resistentes a la apoptosis (Romero et al., 2016). Una de las características de la FPI, es la formación de focos de fibroblastos los cuales son sitios en donde hay una gran acumulación de colágena, lo que contribuye a la rigidez de la matriz extracelular (Pardo & Selman, 2016). Se ha visto que los fibroblastos derivados de pulmones con FPI, cuando son cultivados en una matriz rígida de colágena polimerizada, activan la vía de PTEN/Akt, lo que disminuye la autofagia y los desensibiliza al estrés favoreciendo la resistencia a la apoptosis (Nho, & Hergert, 2014). Estos estudios sugieren que contrario a lo que sucede en las células epiteliales alveolares, la deficiencia de la autofagia en los

fibroblastos, está asociada con la persistencia de este tipo celular lo que favorece la secreción exacerbada de matriz extracelular.

La publicación de estos estudios, fue determinante para comprender que el estrés de RE y las alteraciones en la autofagia estaban teniendo un papel importante en la patogénesis de la FPI, sin embargo, aún no es claro como ambos procesos podrían estar relacionados en el desarrollo esta enfermedad.

RATÓN MODIFICADO GENÉTICAMENTE CON DEFICIENCIA EN LA PROTEASA ATG4B (AUTOFAGINA 1)

Como se mencionó en párrafos previos, ATG4B es una proteasa esencial en la vía de la autofagia ya que procesa a la proteína LC3, el principal sustrato necesario para la formación y maduración de los autofagosomas. En 2010, Mariño y colaboradores, generaron al ratón deficiente en el gen que codifica para esta proteasa. Este ratón tiene un desarrollo embrionario normal, es fértil y puede llegar a vivir el mismo tiempo que los ratones wild type. En ratones *Atg4b*^{-/-} se ha visto que debido a la deficiencia de esta proteasa, en diversos tejidos no hay procesamiento de los sustratos LC3, GABARAP y GATE-16 y hay una acumulación significativa de p62. Estos ratones muestran a nivel sistémico una severa disminución en la formación de autofagosomas en condiciones basales y durante la inducción de la autofagia. A nivel morfológico, se observó que los ratones deficientes de ATG4B, tienen defectos en el desarrollo de las otoconias y la secreción de las proteínas que forman la matriz orgánica de las otoconias, lo que afecta la movilidad y equilibrio de estos animales (Mariño et al, 2010). Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos demostrado que en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-}, no hay procesamiento de LC3 y tienen una acumulación significativa de p62, lo que resulta en una disminución de la actividad autofágica. Para investigar el papel de esta proteasa y la autofagia durante el desarrollo de fibrosis, utilizamos como modelo la inducción de fibrosis pulmonar con bleomicina. En ratones silvestres a los 7 días (etapa inflamatoria) y 28 días (etapa fibrosante) después de la exposición al daño con bleomicina, observamos un incremento en la expresión de *Atg4b* y *Atg5*. De forma interesante, por medio de inmunohistoquímica observamos que durante la etapa inflamatoria, ATG4B se expresa principalmente en el epitelio alveolar y bronquiolar así como en los macrófagos alveolares, sin embargo, en la etapa fibrosante el porcentaje de células positivas para esta proteína

disminuye significativamente. De igual manera, el tratamiento con tunicamicina da como resultado un incremento en la forma lipídica de LC3, así como una disminución en la acumulación de p62, lo que indica que ante el daño provocado por la bleomicina se está induciendo la autofagia en el pulmón. De forma opuesta, los pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-} son más susceptibles al desarrollo de fibrosis ya que a pesar del estrés citotóxico y el daño pulmonar inducido, no muestran activación de la autofagia y esto está asociado con una mayor acumulación de colágena, un incremento significativo en la apoptosis de las células del epitelio alveolar y bronquiolar, mayor daño y destrucción del parénquima pulmonar y un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias. En pulmones de pacientes con FPI, mostramos que en células epiteliales alveolares cercanas a los focos de fibroblastos o adyacentes a áreas con fibrosis, muestran tinción positiva para ATG4B mientras que en los fibroblastos no se observó señal positiva para esta proteína. En este estudio demostramos que la autofagia y la proteasa ATG4B tienen un papel protector en el pulmón ya que protegen a las células epiteliales alveolares de la apoptosis y el estrés inducido por la bleomicina, regulando con ello las respuestas inflamatorias y el desarrollo de fibrosis (Cabrera et al., 2015).

La disminución de la autofagia en este ratón, imita las condiciones que ocurren en el envejecimiento y en el pulmón de pacientes con FPI. En este contexto, nosotros proponemos que este ratón mutante es un modelo ideal que nos permite estudiar *in vivo* cómo la alteración de la autofagia, los mecanismos de envejecimiento y el estrés de retículo endoplásmico podrían estar relacionados entre sí y cuál es el papel que están teniendo en el desarrollo de fibrosis pulmonar.

HIPÓTESIS

La deficiencia de la proteasa Atg4b en el pulmón, asociada con una reducción en el flujo autofágico, conducirá a un aumento en el estrés del retículo endoplásmico, y acumulación de organelos y proteínas dañadas, que son procesos característicos del envejecimiento. Los ratones deficientes de la proteasa Atg4b serán más susceptibles al desarrollo de fibrosis pulmonar experimental inducida por tunicamicina, en comparación con sus respectivos controles silvestres.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desarrollo de fibrosis pulmonar experimental inducida por tunicamicina, utilizando como modelo al ratón modificado genéticamente deficiente de la proteasa Atg4b y su asociación con marcadores de envejecimiento en el pulmón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el flujo de autofagia y el estrés de RE en condiciones basales en el pulmón de ratones WT y ATG4B KO.
- Evaluar la susceptibilidad de los ratones WT y ATG4B KO al daño pulmonar inducido por **tunicamicina**.
- Evaluar la inducción de autofagia y la activación de la respuesta UPR después del tratamiento con tunicamicina.
- Evaluar la inflamación, apoptosis, acumulación de colágena, así como los cambios morfológicos en el pulmón después del estrés de RE inducido con tunicamicina.

Cultivo y tratamiento de células MLE-12.

La línea de células epiteliales de pulmón de ratón MLE-12 se adquirió de American Type Culture Collection (ATCC, CRL2110). Las células MLE-12 se cultivaron y se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (5% de CO₂-95% de aire) a 37 °C con medio HITES (F-12 / DMEM, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), enriquecido con 0,01% de hidrocortisona, 1 % de insulina-transferrina-selenito de sodio (Sigma-Aldrich), 0.01% de β-estradiol, 100 unidades / ml de penicilina, 100 µg /ml de estreptomina, 1% de L-glutamina, 1% de HEPES, 0.01% de β-estradiol (Sigma-Aldrich E2257), 0.01% de hidrocortisona y 2% de suero bovino fetal. Las células MLE-12 fueron tratadas con 0.5 o 1 µg / ml de tunicamicina (Sigma-Aldrich, T7765) con o sin cloroquina 10 µM (Sigma-Aldrich, C6628) durante 24 h.

Citometría de flujo.

Las células se cultivaron y se mantuvieron hasta llegar al 75% de confluencia en placas de 12 pozos. Después de la estimulación con tunicamicina y cloroquina, las células se despegaron con tripsina y se transfirieron a tubos de ensaye de 5ml y se tiñeron con anexina-V y PI. Se utilizó el kit de detección de apoptosis FITC Annexin V con PI (BioLegend, San Diego, CA) para cuantificar la apoptosis temprana y tardía. Las células MLE-12 se trataron con los productos químicos indicados durante 24 h, posteriormente se tripsinizaron y se lavaron dos veces con el buffer de tinción BioLegend. La suspensión de células se transfirió a un tubo de ensaye de 1 ml para citometría de flujo, y luego se añadieron 5 µl de FITC Annexin V y 5 µl de Ioduro de Propidio (PI). Las células se agitaron suavemente en vórtex y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente (25 °C) en la oscuridad. A cada tubo se le añadieron 400 µl de buffer de unión a anexina V y finalmente se analizaron usando un citómetro de flujo BD FACS Calibur (BD Biosciences). El análisis y la visualización de los datos de citometría de flujo se realizaron usando el software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Se llevaron a cabo tres experimentos independientes.

Caracterización del genotipo y establecimiento de grupos experimentales.

Se trabajó con ratones de la cepa C57BL6, silvestres (WT) y modificados genéticamente, deficientes de la enzima Atg4B (*atg4b*^{-/-}), obtenidos por medio de una colaboración con el Dr. Carlos López-Otín, de la Universidad de Oviedo, España. Para este trabajo se utilizaron ratones hembras y machos de 8 a 10 semanas de edad. Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y todos los procedimientos realizados con los animales fueron desarrollados de acuerdo al comité de ética de dicha institución. Para generar al ratón deficiente de Atg4b, se investigó en la base de datos del consorcio internacional de ratones knockout (International Mouse Consortium database) células totipotenciales embrionarias (ES) que tuvieran mutaciones que interrumpieran la expresión del gen *Atg4b* en el ratón. La línea celular de ES A09E06 se

obtuvo del GGTC (German Genetrap Consortium), la cual contenía el cassette pT1betageo que fue insertado en el primer intrón del gen *Atg4b* (**Figura 14**). Las células que contenía el vector posteriormente fueron implantadas en los blastocistos de hembras C57BL/6 para generar ratones quimeras. Los machos quiméricos fueron utilizados para aparearse con hembras C57BL/6, la descendencia heterocigota se utilizó para generar ratones homocigotos para el gen *Atg4b* (*Atg4b*^{-/-}). La homocigosis de la mutación fue demostrada por Southern Blot, y la ausencia de la proteína y del transcrito fue comprobada por PCR y Western Blot.

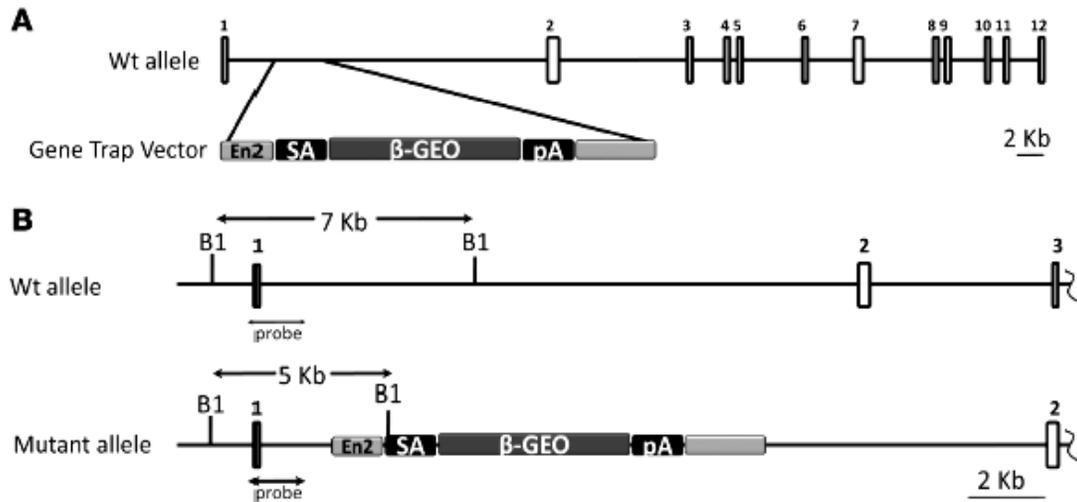


FIGURA 14. A) Representación del locus WT de *Atg4b*. Los exones están representados con números. El gene trap vector se insertó en el intrón 1: la estructura del vector que contiene un aceptor de **splicing** (SA), β-galactosidasa fusionada con el gen de resistencia a la neomicina (β-geo), y una señal de poliadenilación (pA). **B)** representación de los loci WT y mutante, mostrando el nuevo polimorfismo del sitio de restricción para BamHI (B1), generado por la inserción del vector gene trap. Tamaño del gen 34497. Total de exones= 12 (1..22, 13021..13122, 13221..13292, 18738..18836, 20101..20202, 20596..20668, 23253..23332, 25686..25879, 29380..29458, 29721..29866, 30878..30934, 31479..31572, 32654..34497).

La determinación del genotipo se realizó por PCR utilizando primers específicos y el DNA templado fue aislado de la punta de la cola de cada individuo (**Figura 15 y 16**).

primer KO: 5'-CACGCCATACAGTCCTCTTCA-3'
primer HT: 5'-AAGTATATAGGCCTGGATGGTTGCT-3'
primer WT: 5'-CCTCCAGCTCACTGAACTCC-3'

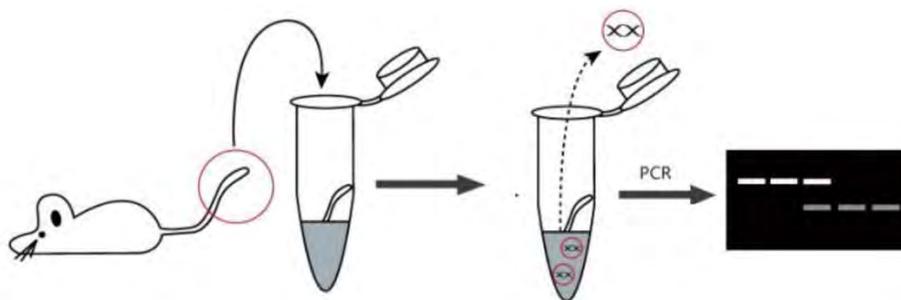


FIGURA 15. Representación de la extracción de DNA. Se cortó un fragmento pequeño de la cola de ratones WT o *Atg4b*^{-/-}, posteriormente este fue colocado en un tubo eppendorf al cual se le añadió buffer de digestión y

se incubó una hora a 99°C para favorecer la degradación únicamente del tejido y obtener DNA. Posteriormente, del DNA extraído se tomó 1 µl para la reacción de PCR.

Componentes de la reacción de PCR

- 1) H₂O.....6.1µl
- 2) Buffer.....1µl
- 3) MgCl₂.....0.3µl
- 4) Forward Primer HT(25µM).....0.25 µl
- 5) Backward Primer WT(25µM)....0.25 µl
- 6) Backward Primer KO(25µM)....0.25 µl

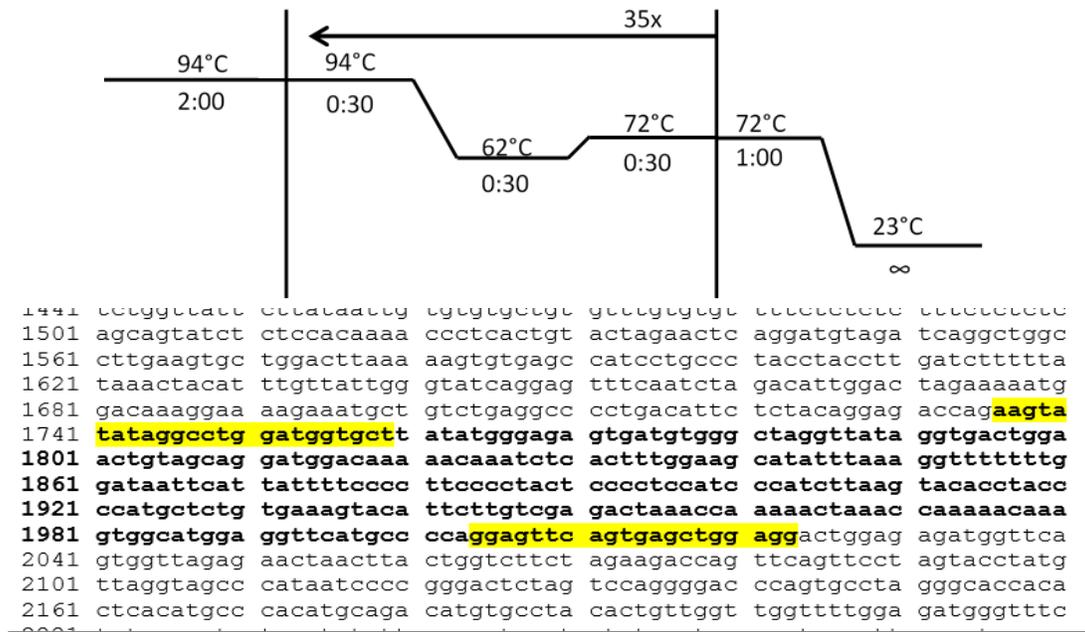


FIGURA 16. Reacción de PCR y secuencia de unión de los primers HT, WT y KO. Panel superior: esquema representativo de las condiciones utilizadas para la reacción de PCR. Panel inferior: por medio de la herramienta BLAST, se muestran las secuencias blanco en las cuales se unen los primers WT, KO y HT.

Después de determinar el genotipo de cada individuo, generamos una base de datos con el número de identificación del individuo, sexo, el genotipo determinado, el no. de su padre y madre, y la fecha de nacimiento. Los ratones hembra y macho de 8 a 10 semanas de edad fueron usados para el protocolo de investigación.

Modelo animal de inducción de daño y estrés del RE por tratamiento con tunicamicina.

Se trataron a los ratones con tunicamicina y se evaluó la respuesta inflamatoria y fibrosante. Ratones *atg4b*^{-/-} y controles fueron anestesiados con pentobarbital sódico, para recibir tunicamicina (10µg), por vía intra-traqueal en dosis única. La droga fue administrada en un volumen de 50 µl, los animales control fueron instilados con el mismo volumen de vehículo. Los animales fueron sacrificados en distintos periodos de tiempo (3, 14, y 21 días post-

tratamiento), para examinar tanto la respuesta inflamatoria, como la respuesta fibrosante. Después del sacrificio, se obtuvieron los pulmones y se evaluó la gravedad de la fibrosis a través de la medición semicuantitativa de las lesiones y la determinación de hidroxiprolina (**Figura 17**).

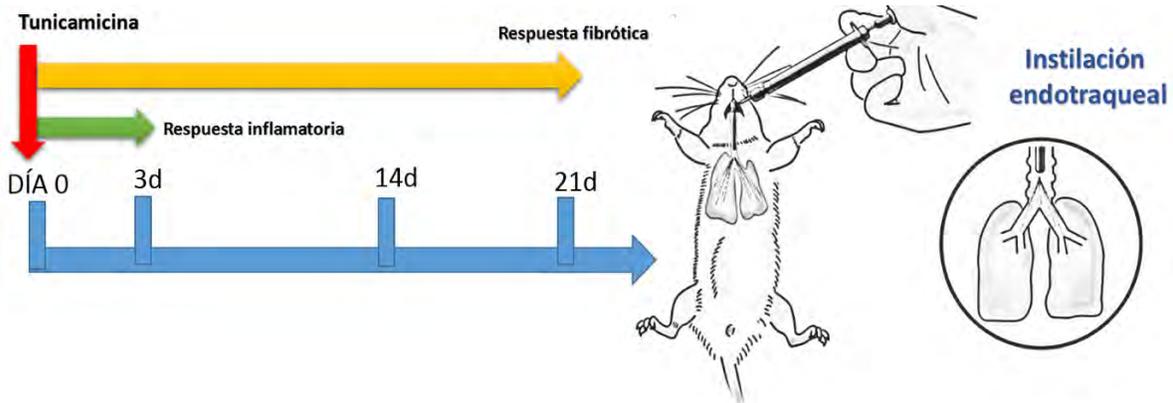


FIGURA 17. Modelo de inducción de estrés de RE con tunicamicina. Ratones WT y atg4b KO, fueron anestesiados para recibir tunicamicina (10 μ g), por vía intra-traqueal en dosis única. Después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados a diferentes tiempos para extraerles los pulmones y evaluar el daño al tejido.

Monitoreo del flujo de autofagia en pulmón de ratones wild type y deficientes de la proteasa Atg4b en condiciones basales.

La conversión de la forma LC3-I a LC3-II indica que se ha inducido autofagia. La cantidad de LC3-II correlaciona con el número de autofagosomas formados, por lo tanto en un inmunoblot, un aumento en la intensidad de la banda de LC3-II respecto a la banda correspondiente a LC3-I indica un aumento en el flujo de autofagia. Se evaluó el nivel de autofagia en extracto de pulmón derivado de animales WT y **Atg4B** KO por Western Blot utilizando un anticuerpo específico anti-LC3, tanto en condiciones basales como después del tratamiento con tunicamicina. Se realizó un análisis por densitometría con el software QuantityOne de BioRad, para cuantificar y comparar la intensidad de la banda de la forma LC3B-I vs. LC3B-II y posteriormente se normalizó con β -tubulina, el cual fue utilizado como control endógeno.

Degradación de sustratos específicos de autofagia en el pulmón.

La proteína p62, también conocida como SQSTM1/sequestosome 1, es selectivamente incorporada en los autofagosomas a través de su unión directa con LC3 y es degradada por autofagia. Los niveles de esta proteína se correlacionan inversamente con el flujo de autofagia, es decir, la acumulación de p62 indica una disminución en el flujo de autofagia y viceversa. Se evaluó el nivel de autofagia en extracto de pulmón derivado de animales WT y **Atg4B** KO por Western Blot, cuantificando el nivel de p62 usando un anticuerpo específico, tanto en condiciones basales como después del tratamiento con tunicamicina. Posteriormente, se realizaron análisis por densitometría con el software QuantityOne de BioRad, para

cuantificar la intensidad de p62 y se normalizó con β -tubulina, el cual fue utilizado como control endógeno.

Inmunoblot.

El tejido pulmonar o células MLE12 se homogenizaron en un buffer con Tris 20 mM, pH 7.4, que contenía NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1% (Sigma-Aldrich, T8787), EDTA 10 mM y un Cóctel Inhibidor de Proteasas UltraCruz (Santa Cruz Biotechnology, sc- 29131). Los extractos de tejidos y las células se centrifugaron a 15,000 rpm a 4 °C y se recuperaron los sobrenadantes. La concentración de proteína se cuantificó mediante la técnica del ácido bicinconínico (kit de ensayo de proteínas BCA, Pierce Biotechnology, 23225). Se cargó un total de 25 μ g de proteína en geles de SDS-poliacrilamida al 8% o al 13%. Después de la electroforesis, los geles se electrotransfirieron en membranas de polifluoruro de vinilo (PVDF, Millipore, IPV H00010) y luego se bloquearon las membranas con leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (solución salina tamponada con Tris con Tween 20 al 0,05% [Sigma-Aldrich, P9416]) y se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios diluidos en diluyente de anticuerpos (Thermo-Fisher Scientific, 003118): anti-ATG4B (Sigma-Aldrich, A2981), anti-SQSTM1 (Sigma-Aldrich, P0068), anti-ATG4B LC3B (Sigma-Aldrich, L7543), anti-TUBB4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-9104), anti- β -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), anti-XBP1 (Santa-Cruz, sc-7160), anti-CHOP (Sigma-Aldrich, NB600-1335), anti-BiP (Sigma-Aldrich, G8918), anti- CASP3 (caspasa 3) pro/activa (Novus Biologicals) o anti-NF κ B (Abcam). Después de 3 lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución 1: 3000 en leche al 1.5% en TBS-T, y se revelaron con sustrato de HRP quimioluminiscente Immobilon (Millipore, WBKLS0500).

Cuantificación de hidroxiprolina pulmonar.

La hidroxiprolina en pulmón fue cuantificada por la técnica colorimétrica desarrollada por Woessner. Brevemente, los tejidos pulmonares se homogenizaron en 500 μ L de H₂O y posteriormente se hidrolizaron con otros 500 μ L de HCl 12N, en un volumen final de 1000 μ L de HCl 12N, a una temperatura de 110°C por 24 horas. Alícuotas de este hidrolizado se utilizaron para el desarrollo de la técnica colorimétrica, utilizando el reactivo de Elrich. Los datos fueron expresados como microgramos de hidroxiprolina por pulmón. La hidroxiprolina se cuantificó por comparación con una curva patrón generada con concentraciones conocidas de 4-hidroxiprolina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Evaluación semicuantitativa del porcentaje de daño pulmonar, inflamación y fibrosis.

El pulmón derecho fue fijado por instilación a presión constante (25 cm H₂O) con paraformaldehído al 4% en PBS 1X. Posteriormente el tejido fue deshidratado en alcohol etílico (30, 50, 70, 96%) y finalmente en xilol, después el tejido fue embebido en parafina y se

hicieron cortes de 5µm. La extensión y grado de las lesiones, así como el porcentaje de inflamación y fibrosis, fueron evaluados después de la tinción de Masson y hematoxilina-eosina y se puntuaron a ciegas por la gravedad y magnitud de las lesiones pulmonares.

Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido se desparafinaron en xilol y luego se rehidrataron con etanol a diferentes concentraciones. Posteriormente, se bloquearon con H₂O₂ al 3% en metanol. La **exposición** del antígeno se realizó calentando en un microondas las laminillas embebidas en buffer de citratos 10 mM, pH 6,0. Las secciones tisulares se trataron con solución de bloqueo universal (BioGenex, HK085-5K) durante 10 min, y luego se incubaron durante la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-XBP1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7160), anti-CHOP (Sigma-Aldrich), anti-BiP (Sigma-Aldrich), anti-pro / activo-CASP3 / caspasa 3 y anti-NFκB. Finalmente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se usó una antiinmunoglobulina biotinilada como anticuerpo secundario, seguido de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (BioGenex, HK330-5K). Se utilizó 3-amino-9-etil-carbazol (BioGenex, HK092-5K) en buffer de acetatos que contenía 0,05% de H₂O₂ como sustrato. Las secciones fueron doblemente teñidas con hematoxilina. El anticuerpo primario se reemplazó por suero no inmune para los portaobjetos de control negativo.

Para la evaluación semicuantitativa, se seleccionaron aleatoriamente 10 campos a diferentes aumentos y la intensidad de la tinción se calificó como sin tinción = 0, tinción débil = 1, tinción moderada = 2, tinción fuerte = 3. El grado de positividad las células se calificaron como 0 = sin células positivas, 1 = que comprende <25%, 2 = 25 a 50%, 3 = 50 a 75% y 4 = 75 a 100% (el porcentaje de células marcadas, se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación: % = número de células marcadas / células totales contadas x 100). El puntaje final se determinó multiplicando los puntajes de intensidad por el grado de puntuación de las células con señal positiva, obteniendo un puntaje mínimo de 0 y un puntaje máximo de 20.

Estadística

Todos los datos experimentales se informan como la media ± desviación estándar (DE). Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student de 2 colas usando el software Graphpad Prism versión 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego CA) y los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos.

RESULTADOS

ESTUDIOS IN VITRO EN CÉLULAS EPITELIALES MLE-12.

La tunicamicina induce cambios en la morfología celular y rompimiento de las uniones intercelulares, y en presencia del inhibidor de autofagia, cloroquina, induce apoptosis en las células epiteliales MLE-12.

Numerosos estudios han demostrado que el daño de las células epiteliales alveolares y la apoptosis desempeñan un papel clave inicial en la patogénesis de la FPI (Korfei et al., 2008; Thannickal & Horowitz, 2006; Selman & Pardo, 2002). **Para investigar si de la autofagia** en las células epiteliales alveolares **ante** el estrés del RE, células MLE-12 fueron tratadas con tunicamicina, en presencia o ausencia del inhibidor de autofagia cloroquina, y se evaluó la morfología de las células, los biomarcadores de autofagia, y la apoptosis. La tunicamicina es un antibiótico derivado de la bacteria *Streptomyces sp* que induce estrés de retículo endoplásmico al inhibir a las enzimas N-acetilglucosamina transferasas encargadas de realizar los enlaces N-glucosídicos en las proteínas, esenciales para su correcto plegamiento (Heifetz et al., 1979). Por otro lado, la cloroquina es una base débil, que en la forma monoprotónada se difunde en el lisosoma, donde se convierte en diprotónada y queda atrapada en el interior, cambiando el pH lisosomal, de ácido a básico, lo que inhibe la actividad de catepsinas y la degradación autofágica en los autolisosomas (Mauthe et al., 2018). Las células se incubaron en presencia o ausencia del inhibidor cloroquina, y se trataron con 2 concentraciones de tunicamicina 0.5 y 1µg/mL durante 24 h. Como se muestra en la **Figura 18**, bajo microscopía de contraste de fases, la tunicamicina indujo cambios en la morfología celular; mientras que las células MLE-12 control tratadas con vehículo, tienen la morfología cuboidal típica de una célula epitelial. Por el contrario, las células tratadas con tunicamicina perdieron su forma cuboidal, los contactos célula-célula, y desarrollaron un fenotipo alargado con extensiones citoplasmáticas (**Figura 18, flechas rojas en los paneles inferiores**). El tratamiento de las células MLE-12 sólo con cloroquina resultó en la formación de pequeñas vacuolas perinucleares, pero preservaron su forma cuboidal típica, sin embargo, la combinación de tunicamicina 0.5 µg/mL + cloroquina indujo una acumulación de vacuolas de mayor tamaño, los contactos célula-célula se perdieron, y desarrollaron una forma alargada con extensiones citoplasmáticas. Observamos una reducción en el número de células MLE-12 tratadas con la combinación de tunicamicina 1µg/mL + cloroquina en el campo, además identificamos claramente la dilatación de los autolisosomas (**Figura 18, flechas azules en los insertos**), debido a que se éstos se fusionan cuando no ocurre la degradación del cargo y esto conduce a un incremento en su tamaño. La inhibición de la

autofagia por cloroquina durante el tratamiento con tunicamicina provocó un incremento en el número de células refringentes, con características de apoptosis, como presencia de núcleos condensados y forma redonda (**Figura 15 asteriscos amarillos**), mientras que no observamos estas características en las células control, o tratadas solo con cloroquina o con tunicamicina. La inducción de la apoptosis, fue corroborada posteriormente por citometría de flujo y a través de western blot evaluando la activación de caspasa-3. Estas observaciones indican que la inhibición de la autofagia durante el estrés de RE inducido por la tunicamicina puede sensibilizar a las células a la apoptosis.

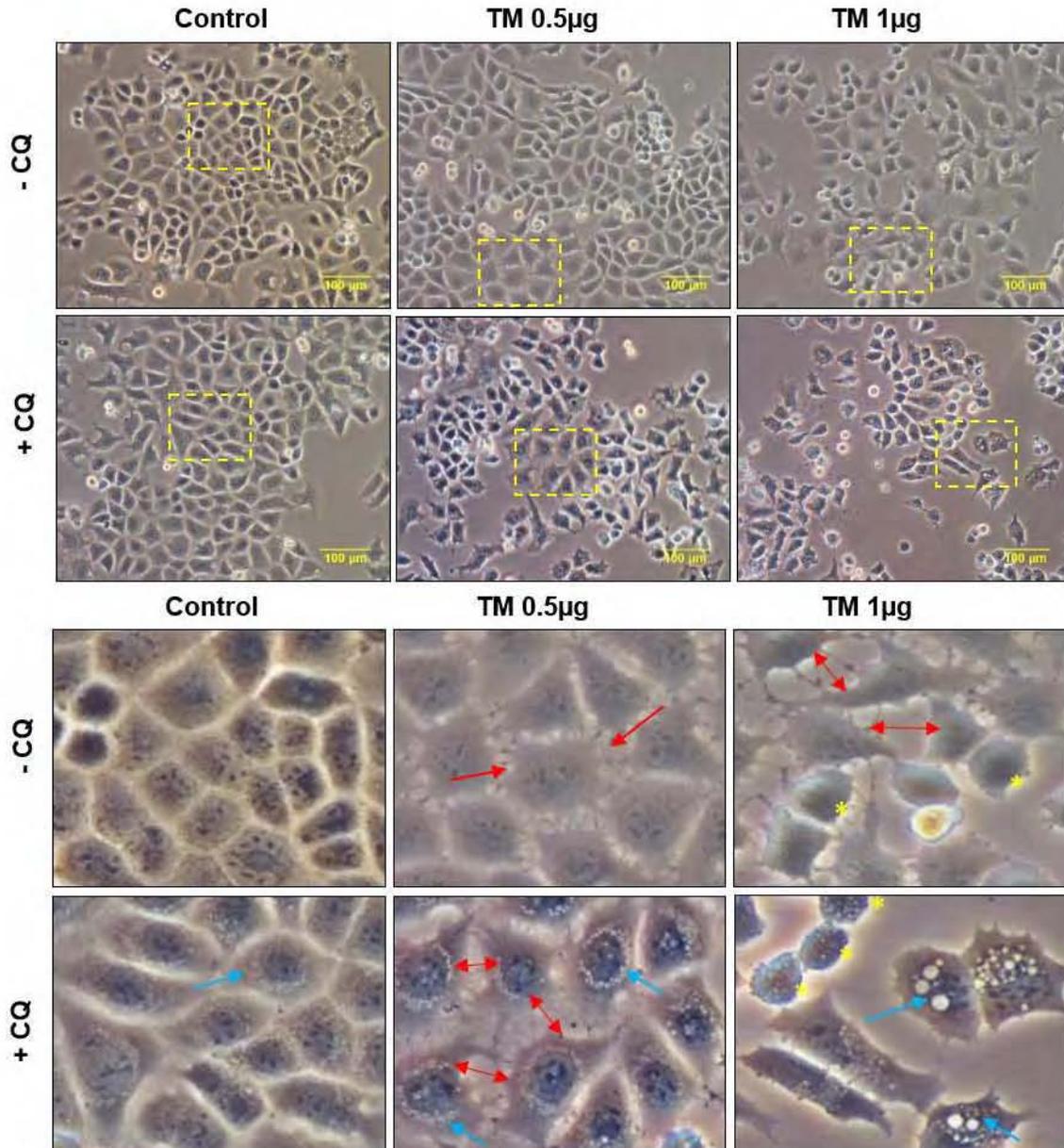


FIGURA 18. La tunicamicina induce cambios en la morfología celular y rompimiento de las uniones intercelulares. Imágenes de contraste de fases de células epiteliales de ratón MLE12 tratadas con vehículo o tunicamicina 0,5 y 1 µg/ml sola o en combinación con cloroquina 10µM durante 24 h. La barra de escala representa 100 µm. Los paneles inferiores representan imágenes ampliadas del área de los cuadros amarillos de los paneles superiores correspondientes. Las flechas rojas señalan la pérdida de contactos entre células y

células, las flechas azules indican la acumulación de vacuolas en el citoplasma y los asteriscos amarillos señalan las células con características típicas de apoptosis.

Evaluación de la actividad autofágica en las células MLE-12 después del tratamiento con tunicamicina.

Como he descrito en la introducción, en distintos tipos celulares se ha descrito que la autofagia se activa no solo durante condiciones de deficiencia de nutrientes, sino también frente a diversos tipos de estrés. Para evaluar si el estrés inducido por tunicamicina tenía un efecto en el flujo autofágico, evaluamos el recambio de los marcadores LC3B-II y p62, y los niveles de la proteasa ATGB4, mediante western blot, después del tratamiento con tunicamicina sola o en presencia de cloroquina. El tratamiento con tunicamicina indujo la activación de la autofagia, caracterizada por un aumento en el nivel de ATG4B, y el procesamiento de su sustrato LC3B-I a su forma lipidada LC3B-II (**Figura 19**). El tratamiento con cloroquina condujo a una acumulación significativamente mayor de LC3B-II comparado con las células control y las tratadas en combinación con la tunicamicina (**Figura 19**). La cloroquina también condujo a una acumulación de p62 en las células tratadas con tunicamicina en comparación con las células control. Estos resultados refuerzan la noción de que la actividad autofágica se induce después del estrés del RE en las células epiteliales alveolares.

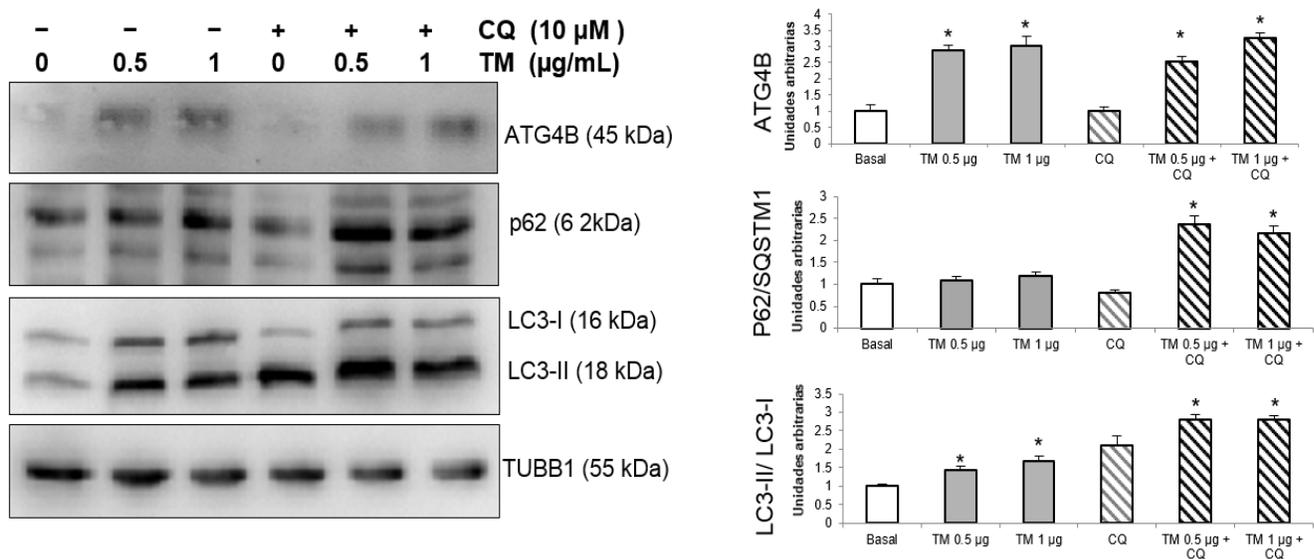


FIGURA 19. Activación de autofagia en células MLE12 tratadas con tunicamicina. Inmunoblots representativos de ATG4B, LC3-I / II y p62 en células epiteliales alveolares de ratón MLE12 tratadas con vehículo o tunicamicina 0,5 y 1 µg/ml sola o en combinación con cloroquina durante 24 h. La β-tubulina se usó como control de carga. A la izquierda la densitometría de los inmunoblots. Los niveles de proteína se normalizaron en comparación con el control basal más el vehículo. Los resultados representan la media ± DE. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía (* p < 0,05).

La inhibición de la autofagia durante el estrés de RE inducido por tunicamicina, promueve la apoptosis en células epiteliales de pulmón de ratón.

Para corroborar que la inhibición de la autofagia durante el estrés inducido por la tunicamicina puede sensibilizar a las células a la apoptosis, evaluamos el porcentaje de células positivas para anexina V y ioduro de propidio (PI) por citometría de flujo. **Con este método, se pueden distinguir dos poblaciones: las células Annexin V⁺ PI⁻, que se encuentran en la fase temprana de la apoptosis y las células Annexin V⁺ PI⁺, las cuáles están en la fase tardía de la apoptosis. Los valores de cada población, representan el número total de células apoptóticas (Annexin V⁺ PI⁻ + Annexin V⁺ PI⁺). Como se ilustra en la Figura 20 B, después de 24 horas del tratamiento con tunicamicina 0.5 µg/mL, hubo un incremento de aproximadamente 9% en el número de células apoptóticas totales (basal= 25.565 ± 2.7 vs TM 0.5µg= 53.85 ± 1.8). Este efecto se potenció significativamente con el tratamiento de cloroquina (TM 0.5µg= 53.85 ± 1.8 vs TM 0.5µg + CQ= 73.35 ± 3.1). Respecto a la concentración de tunicamicina 1 µg/mL, hubo un incremento de aproximadamente el 28% (basal= 25.565 ± 2.7 vs TM 1µg= 67.4 ± 1.8) en comparación con la apoptosis basal y el tratamiento con cloroquina exacerbó la apoptosis casi al 100% (TM 1µg= 67.4 ± 1.8 vs TM 1µg + CQ= 97.75 ± 1.5). La cloroquina sola no tuvo un efecto significativo en la apoptosis de las células MLE12 (Figura 20, A y B).**

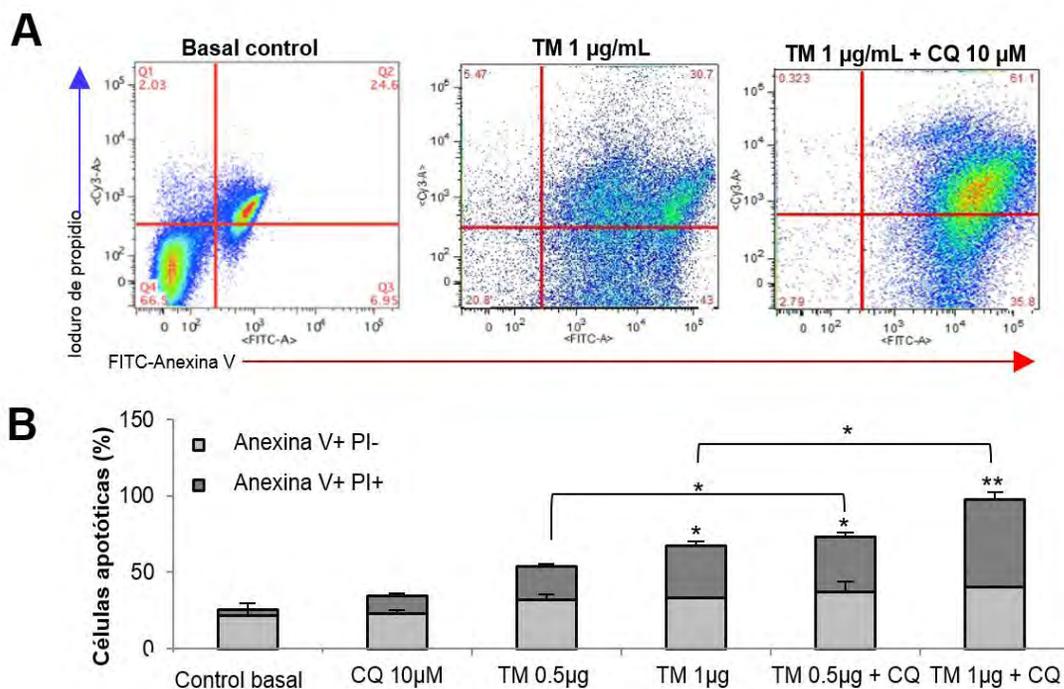


FIGURA 20. La inhibición de la autofagia hace a las células epiteliales alveolares de ratón más vulnerables a la apoptosis después del estrés del RE inducido por tunicamicina. Las células epiteliales alveolares de ratón MLE-12 se trataron con vehículo o tunicamicina 0.5 y 1 µg/ml sola o en combinación con 10 µM de cloroquina durante 24 h. La apoptosis se determinó mediante análisis de citometría de flujo de las células teñidas con Anexina-V-FITC / PI después de 24 horas. **(A)** Datos representativos y **(B)** datos acumulativos de 3 experimentos independientes.

La apoptosis se examinó adicionalmente mediante western blot utilizando un anticuerpo contra pro-caspasa 3 (32 kDa) y caspasa 3 activa (19 kDa). Observamos que la apoptosis inducida por tunicamicina aumenta en presencia de cloroquina, ya que hay mayores niveles de caspasa 3 activa (**Figura 21**). En conjunto con los resultados obtenidos por citometría de flujo, estos datos sugieren que la cloroquina podría inhibir el efecto citoprotector de la autofagia y de esta forma aumentar la citotoxicidad de la tunicamicina y promover la apoptosis. Estos hallazgos *in vitro*, apoyan la noción de que la actividad autofágica confiere protección contra el daño inducido por la tunicamicina en células epiteliales alveolares de pulmón.

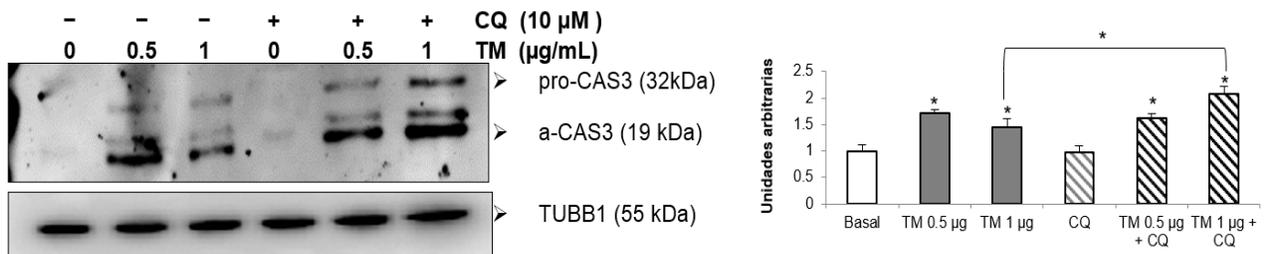


FIGURA 21. Incremento en la activación de caspasa 3 en las células MLE2 tratadas con tunicamicina en presencia de cloroquina. Inmunoblot representativo de CAS3 pro y activa en células epiteliales alveolares de ratón MLE12 tratadas como se indica. La β -tubulina se usó como control de carga. Densitometría en el panel derecho. Los niveles de proteína se normalizaron con el control basal. Los resultados representan la media \pm DE. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía (* $p < 0,05$).

MODELO IN VIVO

El estrés del RE es un estado patológico que implica la agregación aberrante de proteínas mal plegadas, que a su vez, da como resultado la activación de la respuesta UPR, que como ya se ha mencionado en la introducción, es un mecanismo que rescata a las células del estrés y restaura la homeostasis dentro del RE. Recientemente, se ha descrito que la autofagia es también un mecanismo que contribuye a restaurar la homeostasis del RE, ya que a través de la degradación en los autolisosomas, se eliminan los agregados de proteínas mal plegadas promoviendo de esta manera la supervivencia celular (Rashid et al., 2015). Una activación anormal de la vía UPR así como alteraciones en la autofagia han sido implicadas en el envejecimiento y en el desarrollo de diversas enfermedades crónico-degenerativas. Para investigar la asociación entre el estrés del RE y la autofagia *in vivo*, utilizamos el modelo deficiente de Atg4b, para evaluar si la inhibición en la autofagia tenía algún efecto en la homeostasis del RE en condiciones basales. Además, utilizamos el modelo deficiente de Atg4b para evaluar si las células del epitelio alveolar se volvían más susceptibles al daño inducido por tunicamicina, y si esto estaba asociado con el desarrollo de fibrosis pulmonar.

Determinación del genotipo para el establecimiento de los grupos experimentales.

El producto de amplificación del alelo WT corresponde a una banda de 287 pb (*Atg4b*^{+/+}), mientras que el producto de amplificación del alelo KO corresponde a una banda de 130 pb (*Atg4b*^{-/-}) y las muestras con ambas bandas, corresponden a ratones heterocigotos (*Atg4b*^{+/-}) (**Figura 22**). Para ampliar las colonias de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} realizamos cruces directos WT x WT y KO x KO y establecimos los grupos experimentales.

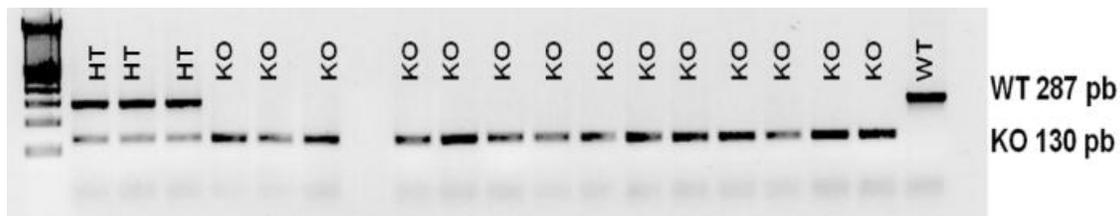


FIGURA 22. Productos de amplificación obtenidos por PCR. Imagen representativa de una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR para la determinación del genotipo de los ratones. En el carril 1 se encuentra el marcador de 100pb y a partir del carril 2, se observan las bandas de distintos tamaños que indican el genotipo de cada uno de los ratones.

Evaluación de la actividad autofágica en el pulmón de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} en condiciones basales.

Como se muestra en la **Figura 23 (panel superior)**, confirmamos por western blot la ausencia de la proteasa ATG4B en los pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-}. La deficiencia de ATG4B en el pulmón, resulta en una acumulación significativa de la forma de LC3 no conjugada o LC3-I, y la ausencia de la forma conjugada o LC3-II, en comparación con los pulmones de los ratones de control WT. También encontramos la acumulación de la proteína p62 en los pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-}, otro marcador relacionado con la autofagia, que como ya se mencionó, se une a proteínas blanco y es degradado en el autolisosoma. Para evaluar si la deficiencia de ATG4B y la disminución en la actividad autofágica podían estar relacionadas con un aumento espontáneo del estrés del RE, evaluamos mediante inmunoblot los niveles de la chaperona BiP/Grp78, CHOP y XBP1 en pulmones de los ratones WT y *Atg4b*^{-/-} en condiciones basales. Los niveles de XBP1, CHOP y BiP fueron ligeramente más elevados en los extractos totales de pulmón derivado de ratones *Atg4b*^{-/-} en comparación con los ratones WT, pero no alcanzaron significancia estadística (**Figura 23, panel inferior**).

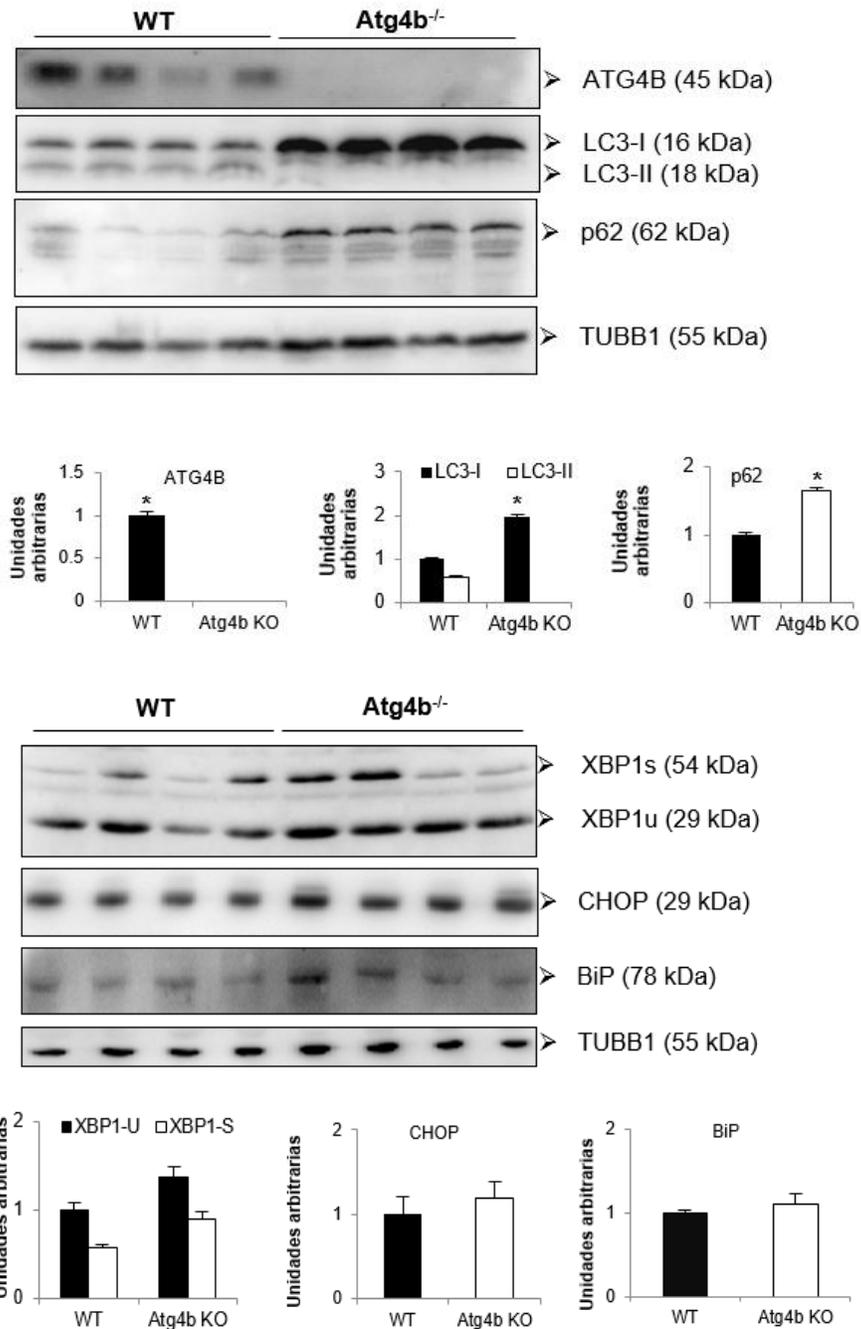


FIGURA 23. La inhibición de autofagia por deficiencia de *Atg4b* resulta en la activación moderada de biomarcadores de estrés del RE. Panel superior: Inmunoblots representativos de ATG4B, LC3-I / II y p62 en tejido pulmonar de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} en condiciones basales. Panel inferior: Inmunoblots representativos de biomarcadores de estrés del RE en tejido pulmonar de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} en condiciones basales. La β -tubulina se usó como control de carga. Debajo de cada inmunoblot se muestran los análisis de densitometría. Los resultados representan la media \pm DE. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía (* $p < 0,05$).

Análisis de la morfología del pulmón en ratones WT y *Atg4b*^{-/-} y localización de los biomarcadores de estrés del RE BiP/Grp78, CHOP y XBP1 en condiciones basales.

Para evaluar si en condiciones basales existían diferencias morfológicas en el pulmón debido a la ausencia de la proteasa ATG4B, analicé cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina de pulmón de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} por microscopia de luz. El análisis morfológico se hizo seleccionando por lo menos 10 campos diferentes por cada individuo y con asistencia de un patólogo. En condiciones basales, no se observó ningún cambio histológico que indicara alguna anomalía morfológica en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-} (**Figura 24**). Por inmunohistoquímica se evaluó la localización de los biomarcadores de estrés del RE BiP/Grp78, CHOP y XBP1 en pulmones derivados de ratones WT y *Atg4b*^{-/-}. Observamos una fuerte tinción positiva para XBP1 y CHOP en un pequeño número de células del epitelio bronquiolar en los pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-}, sin embargo, no encontramos tinción positiva para estos marcadores en los pulmones de los ratones WT (**Figura 24**). En el caso de la chaperona BiP/Grp78, identificamos una leve tinción en algunas células epiteliales alveolares, tanto en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-}, como en los pulmones de los ratones WT, sin embargo, el número de células positivas fue significativamente mayor en los ratones mutantes (**Figura 24**). Estos datos demuestran que en condiciones basales, la eliminación de ATG4B y la inhibición de la autofagia resultan en una activación leve de la vía UPR en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-}.

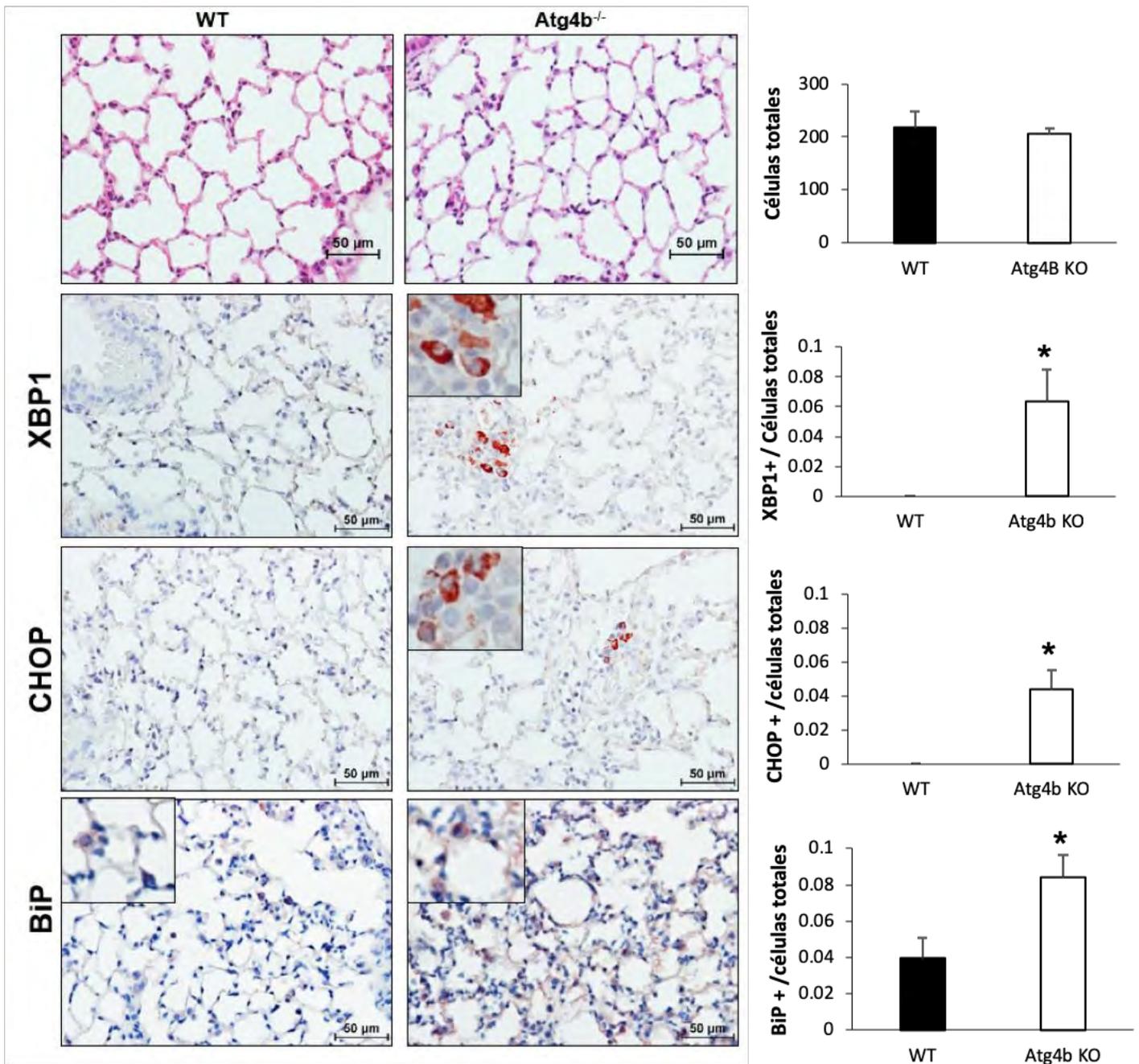


FIGURA 24. Localización de XBP1, CHOP y BiP en el pulmón de ratones WT y Atg4b^{-/-} en condiciones basales. Imágenes representativas de tinción inmunohistoquímica realizadas con anticuerpos primarios específicos contra XBP1, CHOP y BiP en secciones de tejidos pulmonares de WT y Atg4b^{-/-} en condiciones basales. Las células con señal positiva se observan en rojo. Todas las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. Todos los insertos muestran una ampliación 2 veces mayor. Del lado derecho se muestra la cuantificación del número total de células cuantificadas. Las gráficas subsecuentes muestran la normalización de las células teñidas vs las células totales. Los datos se obtuvieron mediante análisis cuantitativo de imágenes. Los resultados se muestran como media ± DE. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* p < 0,05).

imágenes. Los resultados se muestran como media \pm DE. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* p <0,05).

Para identificar específicamente la localización celular de BiP, CHOP y XBP1 durante la inflamación pulmonar inducida por tunicamicina, evaluamos la presencia estas proteínas mediante inmunohistoquímica en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-} y WT tratados con tunicamicina. A los 3 días post-tratamiento, encontramos tinción positiva para BiP en células epiteliales alveolares y macrófagos en los pulmones de ratones de ambos genotipos, sin embargo, el número de células positivas para BiP fue significativamente mayor en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-} (**Figura 26**). Como se describió previamente, no se detectó tinción positiva para XBP1 y CHOP en condiciones basales en el pulmón de los ratones WT, sin embargo, después del tratamiento con tunicamicina, observamos macrófagos, células del epitelio bronquial y células del epitelio alveolar con tinción positiva para XBP1 y CHOP, sin embargo, el número de células positivas fue significativamente mayor en pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-}. Otro hallazgo importante, es que observamos tinción nuclear positiva para XBP1 y CHOP en el epitelio bronquial del pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-}, pero no en el núcleo de células del epitelio bronquial del pulmón de los ratones WT, lo que significa que estos factores de transcripción se están translocando al núcleo ante la respuesta al estrés (**Figura 26, flechas en color rojo e insertos**). Estos datos indican que la activación de la UPR después del estrés ER inducido por la tunicamicina y la respuesta inflamatoria, están exacerbadas en los pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-}.

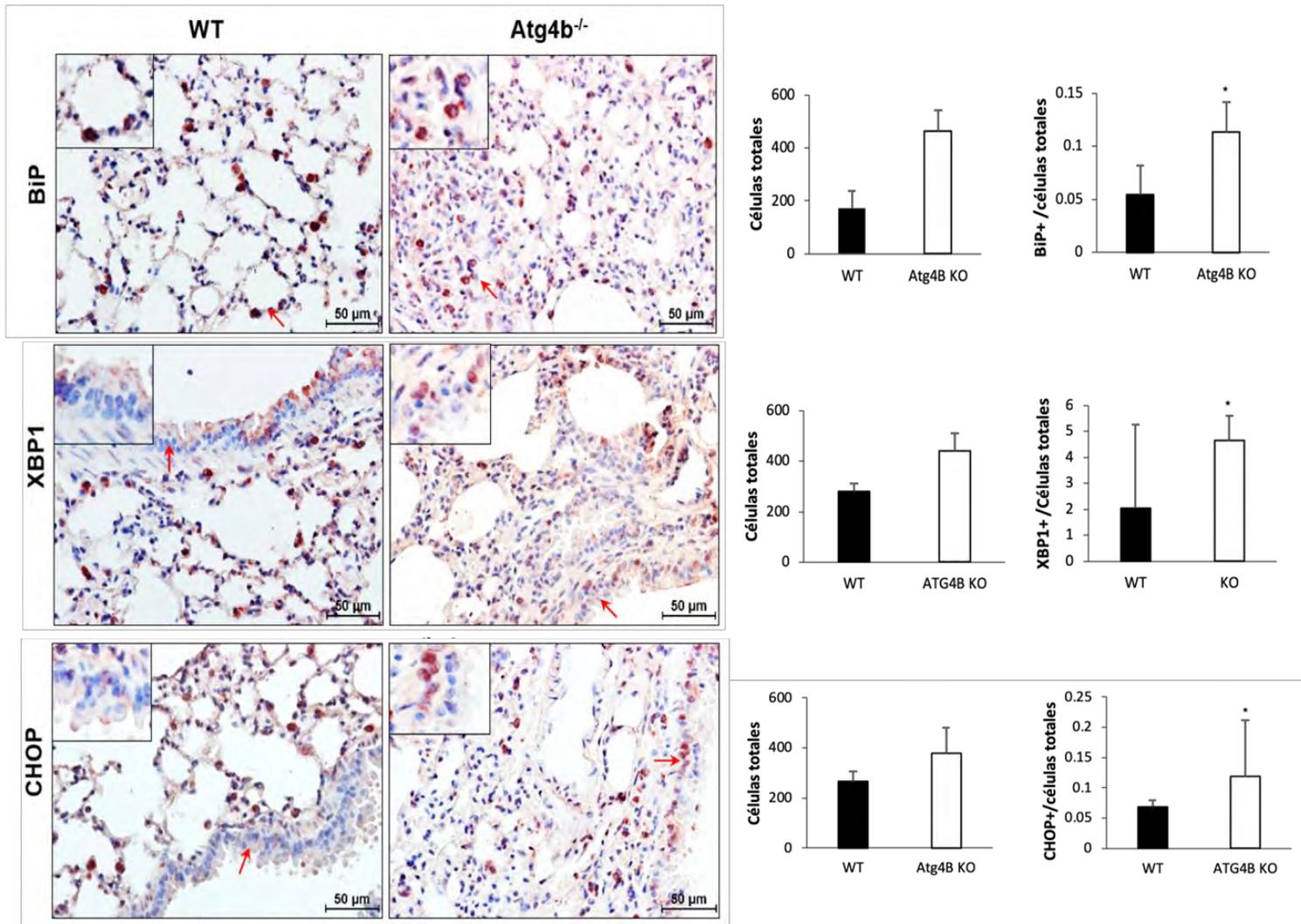


FIGURA 26. Localización de los marcadores de estrés BiP, XBP1 y CHOP en el pulmón de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} después de tres días de inducir estrés del RE con tunicamicina. Imágenes de microscopía de luz representativas de secciones de tejido de pulmón teñidas positivamente con BiP, XBP1 y CHOP de ratones tratados con tunicamicina nula WT y *Atg4b* a los 3 días (paneles superiores) en campo de 40X. Todas las inserciones muestran una ampliación 2 veces mayor. Debajo de cada inmunohistoquímica se muestra la cuantificación del número total de células y la normalización de las células teñidas vs las células totales. Los datos se obtuvieron mediante análisis cuantitativo de imágenes. Los resultados mostrados representan la media \pm DE. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$).

Evaluación de la respuesta UPR en la etapa inflamatoria.

Para evaluar si el tratamiento con tunicamicina conduce a un incremento en los biomarcadores de la vía UPR, se evaluaron las proteínas XBP1, CHOP y BiP, a los 3 días después de la instilación intratraqueal de tunicamicina en el pulmón de los ratones WT y *Atg4b*^{-/-}. Como se mencionó en la introducción, la proteína XBP1 está presente en dos isoformas, una de 29-kDa que es transcripcionalmente inactiva (XBP1u—de *unspliced*) y otra de 56 kDa que es transcripcionalmente activa (XBP1s— de *spliced*). Observamos que el tratamiento con tunicamicina indujo el procesamiento de XBP1u a su forma activa XBP1s, en los pulmones del WT al comparar con aquellos tratados solo con vehículo (**Figura 27, A**). Sin embargo, de forma interesante no se observó ningún procesamiento de XBP1u en los pulmones los ratones *Atg4b*^{-/-} tratados con tunicamicina en comparación con sus respectivos controles tratados con vehículo (**Figura 27, B**). Respecto a la chaperona BiP y al factor de transcripción CHOP, observamos que la instilación de tunicamicina provocó una aumento en la expresión de ambas proteínas en el pulmón de los ratones de ambos genotipos, *Atg4b*^{-/-} y WT, en comparación con sus respectivos controles tratados solo con vehículo (**Figura 27 A y B**). Un hallazgo importante es que el procesamiento de XBP1 probablemente está alterado en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-}, dado que no se observó un incremento en la forma XBP1s, sin embargo, si está presente aunque el nivel de expresión después del tratamiento es equivalente al nivel observado en los animales control. Paradójicamente, por inmunohistoquímica el número de células positivas para XBP1 fue significativamente mayor en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-} después de inducir estrés del RE. Adicionalmente, solo en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-} observamos tinción nuclear, y si sólo la forma XBP1s tiene un papel como factor de transcripción, y puede translocarse al núcleo, resulta paradójico que no podamos identificar por western blot, cambios en su procesamiento (**Figura 26, flechas en color rojo e insertos**).

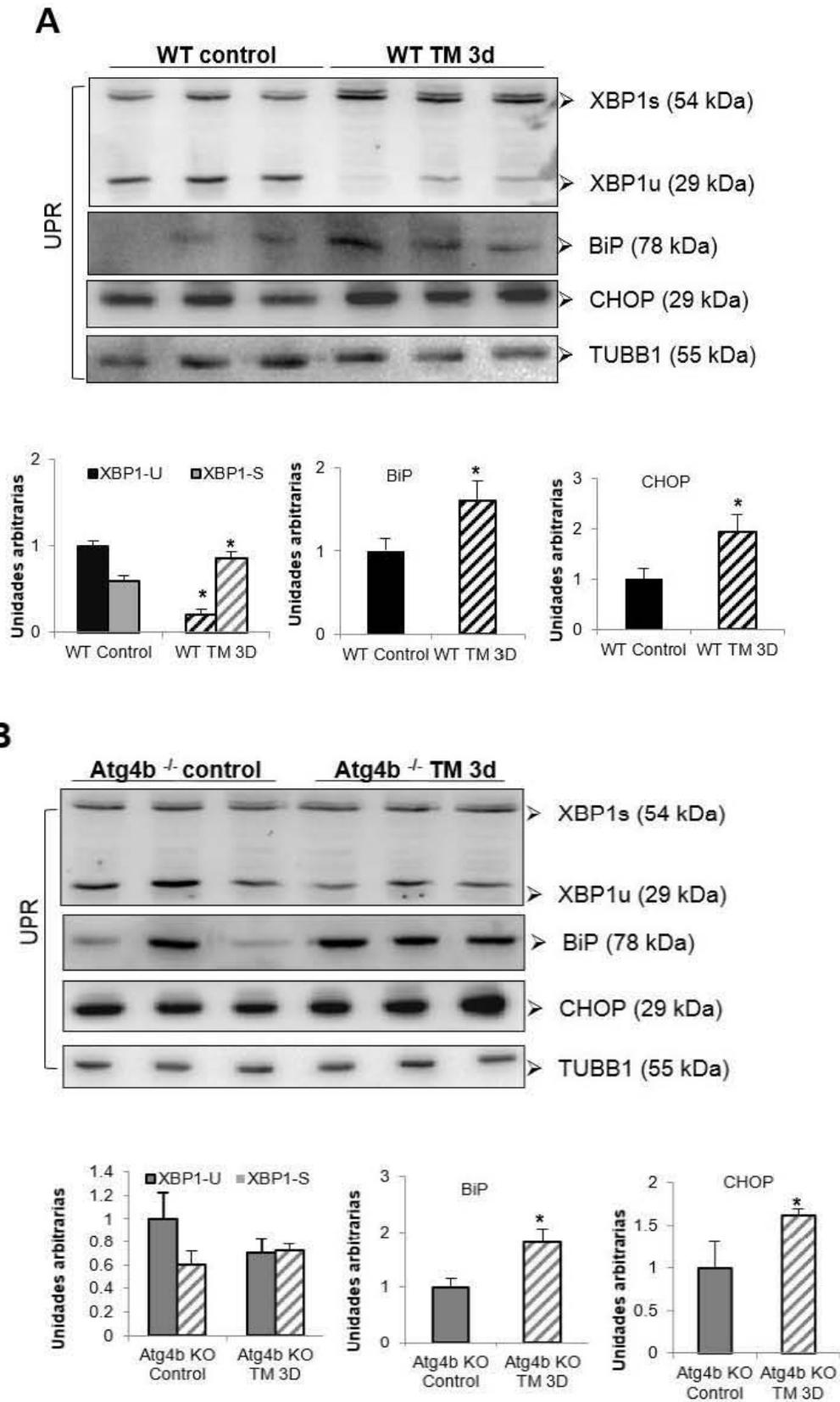


FIGURA 27. El tratamiento con tunicamicina induce un incremento en Bip y CHOP, pero no en XBP1, en pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-}. (A) Inmunoblots representativos de biomarcadores de estrés del RE en tejido pulmonar de WT vehículo-control y ratones tratados con tunicamicina WT a los 3 días después del

tratamiento. (B) Inmunoblots representativos de biomarcadores de estrés del RE en tejido pulmonar de los ratones deficientes de Atg4b control y tratados con tunicamicina a los 3 días después del tratamiento.

Evaluación de la actividad autofágica en la etapa inflamatoria.

La tunicamicina induce estrés del RE pero no activa la autofagia en pulmones de ratones Atg4b^{-/-}.

Estudios previos han demostrado que el estrés del RE puede estimular la activación de la autofagia como un mecanismo citoprotector que promueve la supervivencia celular (Bernal et al., 2006). En este estudio demostramos *in vitro*, que las células MLE-12 activan autofagia a través de la inducción de la proteasa ATG4B, y hay procesamiento de su sustrato LC3 en respuesta al tratamiento con tunicamicina. **Para evaluar si el tratamiento con tunicamicina induce la activación de la autofagia en el pulmón, se evaluaron las proteínas, ATG4B, LC3 y p62, a los 3 días después de la instilación intratraqueal de tunicamicina en el pulmón de los ratones WT y Atg4b^{-/-}.** Los extractos de tejido pulmonar de ratones WT tratados con tunicamicina mostraron un aumento significativo de la enzima ATG4B, y también una marcada acumulación de la forma LC3-II y p62, en comparación con el tejido pulmonar de los controles WT tratados con vehículo, lo que indica activación autofagia (**Figura 28 A**). Por el contrario, en pulmones de ratones Atg4b^{-/-} tratados con tunicamicina, se observó una fuerte acumulación de la forma LC3-I y la ausencia completa de la forma LC3-II, lo que indica que estos ratones no pueden activar la autofagia en respuesta al estrés del RE inducido por tunicamicina (**Figura 28B**). En resumen, estos resultados apoyan la noción de que concomitantemente con el estrés del RE inducido por tunicamicina, la autofagia y la expresión de ATG4B se inducen en los pulmones de los ratones WT, como un posible mecanismo para alcanzar la homeostasis celular. Si integramos esto con que el área de daño pulmonar y la respuesta inflamatoria estuvieron significativamente reducidos en los ratones WT, podemos concluir que la expresión de la proteasa ATG4B y la activación de la autofagia, podrían tener un papel citoprotector durante el estrés del RE en el pulmón. Por el contrario, debido a la interrupción de la expresión de ATG4B en los ratones deficientes, la autofagia no se activa, a pesar de las condiciones de estrés del RE, y esto podría explicar una respuesta inflamatoria más severa en estos ratones.

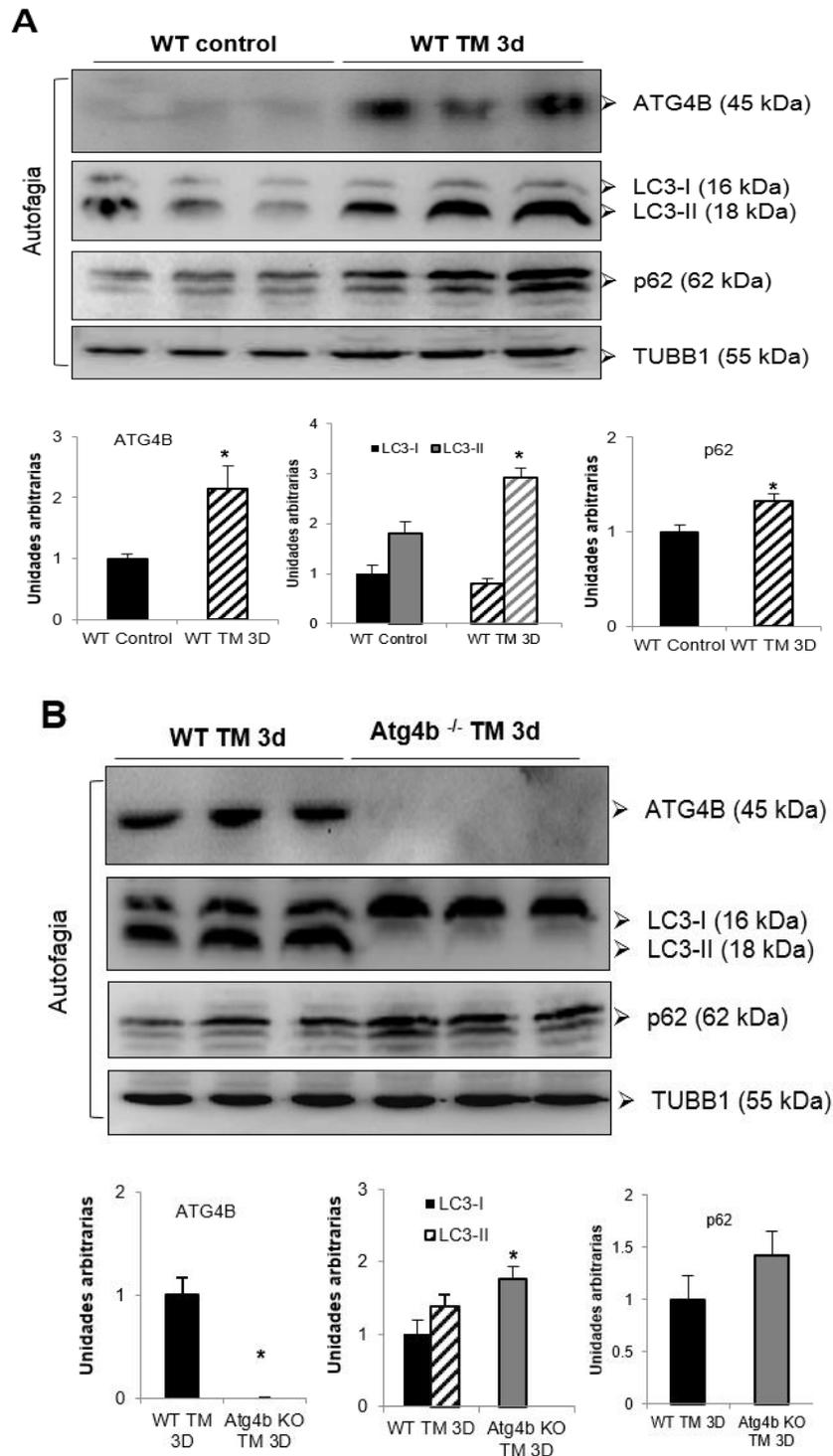


FIGURA 28. El tratamiento con tunicamicina induce la activación de autofagia en los pulmones de los ratones WT, pero no en el pulmón de los ratones *Atg4b*^{-/-}. (A) Inmunoblots representativos de ATG4B, LC3-I / II y p62 en tejido pulmonar de ratones WT tratados con vehículo y tratados con tunicamicina a los 3 días después de la exposición. (B) Inmunoblots representativos de ATG4B, LC3-I / II y p62 en tejido pulmonar de ratones WT, en comparación con tejido pulmonar de ratones *Atg4b*^{-/-} después de 3 días de tratamiento con tunicamicina. Se usó β -tubulina como control de carga en todos los experimentos. Análisis de densitometría (paneles inferiores). Los resultados se muestran como media \pm DE. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* p <0,05).

Evaluación de apoptosis en la etapa inflamatoria.

Hemos demostrado *in vitro* que la autofagia inducida por estrés del RE juega un papel clave en la citoprotección de las células epiteliales frente al daño inducido por la tunicamicina. Para identificar **qué** tipo de células experimentaron apoptosis en los pulmones de ratones WT y mutantes después de 3 días de la instilación de tunicamicina, se realizó inmunohistoquímica usando un anticuerpo primario contra caspasa-3 activa. La tinción positiva para CAS3 se observó principalmente en células epiteliales bronquiales y alveolares y también en macrófagos en los pulmones de ratones tanto *Atg4b*^{-/-}, como WT (**Figura 29 A y B**). Sin embargo, el número de células positivas para CAS3 fue significativamente mayor en los ratones *Atg4b*^{-/-}. Este hallazgo fue confirmado por inmunoblot en extractos de tejido pulmonar, donde observamos un aumento significativo en el nivel de proteína CAS3 activa, en comparación con los pulmones WT (**Figura 29 C**). Además, también evaluamos el nivel de NFκB/RelA (p65), un factor de transcripción clave que regula la inflamación y puede promover la apoptosis en respuesta al estrés celular (Khandelwal et al., 2011; Sun., 2017). Observamos un mayor número de células positivas para NFκB, así como niveles significativamente más altos de la proteína NFκB después de 3 días de la instilación con tunicamicina en los pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-} en comparación con los ratones WT (**Figura 29 A, B y C**). En resumen, nuestros datos revelan que la deficiencia de ATG4B y defectos en la activación de la autofagia, producen una respuesta UPR exacerbada y alterada que podría estar culminando en un aumento de la apoptosis y una mayor respuesta inflamatoria.

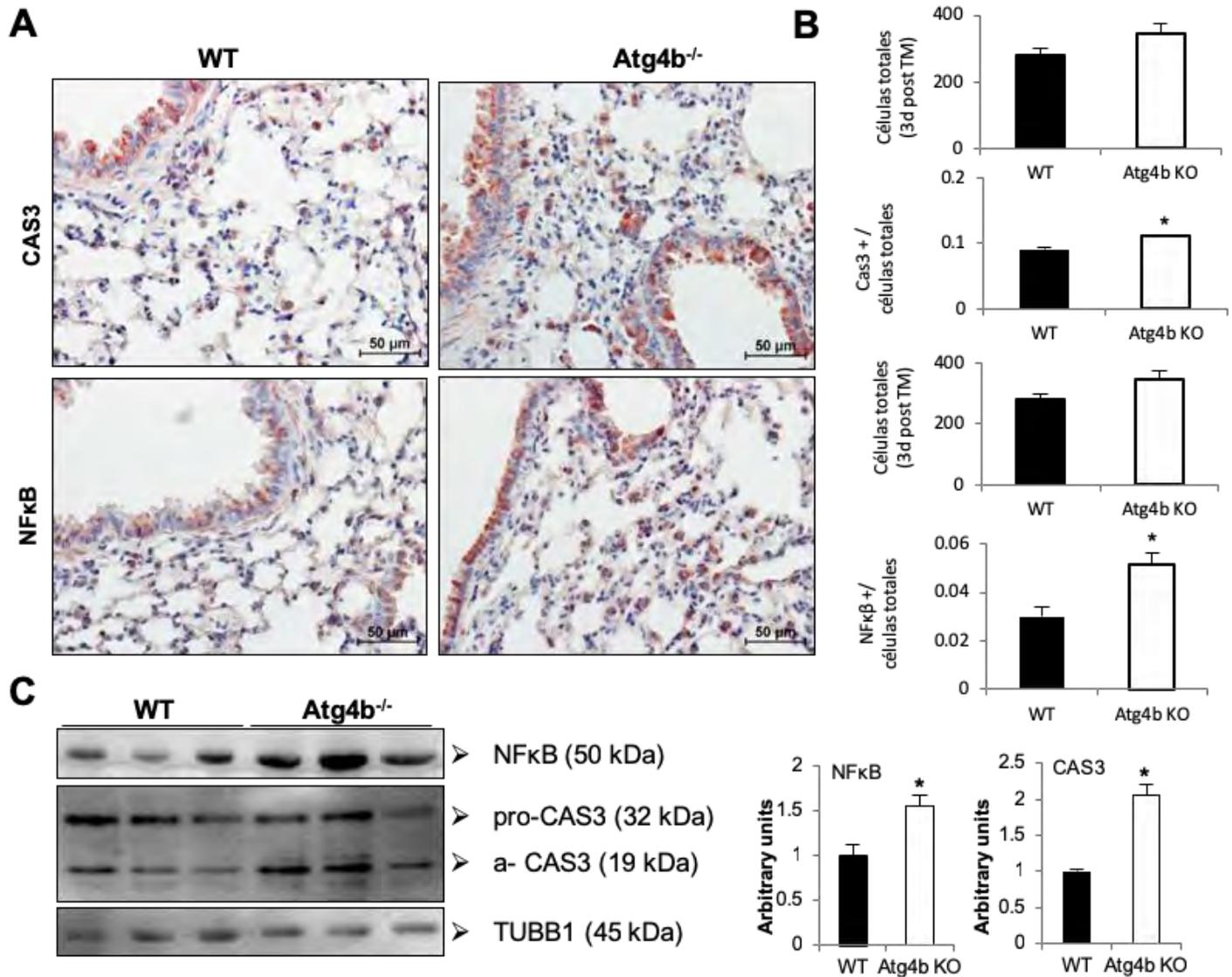


Figura 29. La deficiencia de Atg4b resulta en un aumento de la expresión de NFκB y CAS3 en el pulmón del ratón mutante a los 3 días después de la administración de tunicamicina. (A) Fotomicrografías representativas de la tinción inmunohistoquímica realizada con anticuerpos primarios específicos contra CAS3 activa y NFκB en tejidos pulmonares de ratones WT y *Atg4b*^{-/-}, 3 días después de la instilación con tunicamicina en un campo de 40X. La señal positiva se observa en rojo. Todas las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. **(B)** Al lado de cada inmunohistoquímica se muestran las gráficas con el número total de células cuantificadas y debajo de éstas, la normalización de las células teñidas positivamente vs las células totales. **(C)** Inmunoblots representativos de NFκB y CAS3 activa en el tejido pulmonar de ratones WT y *Atg4b*^{-/-} 3 días después de la instilación con tunicamicina (panel izquierdo) y análisis de densitometría (panel derecho). Los resultados se muestran como media ± DE. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* p < 0,05).

MODELO DE INDUCCIÓN DE ESTRÉS DEL RE Y RESPUESTA FIBRÓTICA.

El estrés del RE inducido por tunicamicina promueve la fibrosis pulmonar en ratones deficientes en *Atg4b* pero no en ratones WT.

La evidencia sugiere que el estrés del RE promueve la remodelación fibrótica a través de la activación de las vías pro-apoptóticas y la promoción de la respuesta inflamatoria (Tanjore et al., 2013; Kropski & Blackwell, 2018). Para determinar si el proceso inflamatorio observado en los ratones *Atg4b*^{-/-} después de inducir estrés del RE con tunicamicina podría progresar a la fibrosis pulmonar, ratones WT y *Atg4b*^{-/-} fueron tratados con una dosis intratraqueal de tunicamicina o de vehículo, y los pulmones fueron obtenidos en un período de 21 días después de la instilación (fase fibrótica). Se realizó el análisis histológico de los tejidos pulmonares teñidos con hematoxilina y eosina, y la tinción de tricrómica de Masson para identificar colágena. Después de 21 días se observaron focos de fibrosis en forma difusa en los pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-}, los cuales estuvieron caracterizados por la presencia de fibroblastos y por el depósito de colágenas fibrilares en los espacios intersticial e intraalveolar (**Figura 30 B, flechas azules**). Observamos que los ratones WT no desarrollaron fibrosis pulmonar, el parénquima se ve preservado y la morfología de los ratones tratados con tunicamicina fue similar a los pulmones de los ratones control tratados con vehículo (**Figura 30 A**); la colágena solo se identificó en las áreas que rodean los grandes vasos y las vías respiratorias mayores, lo cual es una condición normal. El análisis morfométrico de las áreas fibróticas así como la cuantificación de la concentración de hidroxiprolina confirmaron que el depósito de colágena fue significativamente mayor en los pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-} en comparación con los ratones WT (**Figura 30 A**). Además, por inmunohistoquímica se encontró un aumento en el número de células epiteliales bronquiolares y alveolares teñidas para CAS3 activa y NFκB en los pulmones de los ratones *Atg4b*^{-/-}, a los 21 días de tratamiento post-tunicamicina, mientras que muy pocas células con señal positiva para CAS3 activa y ninguna tinción para NFκB se encontró en los pulmones de los WT (**Figura 31**).

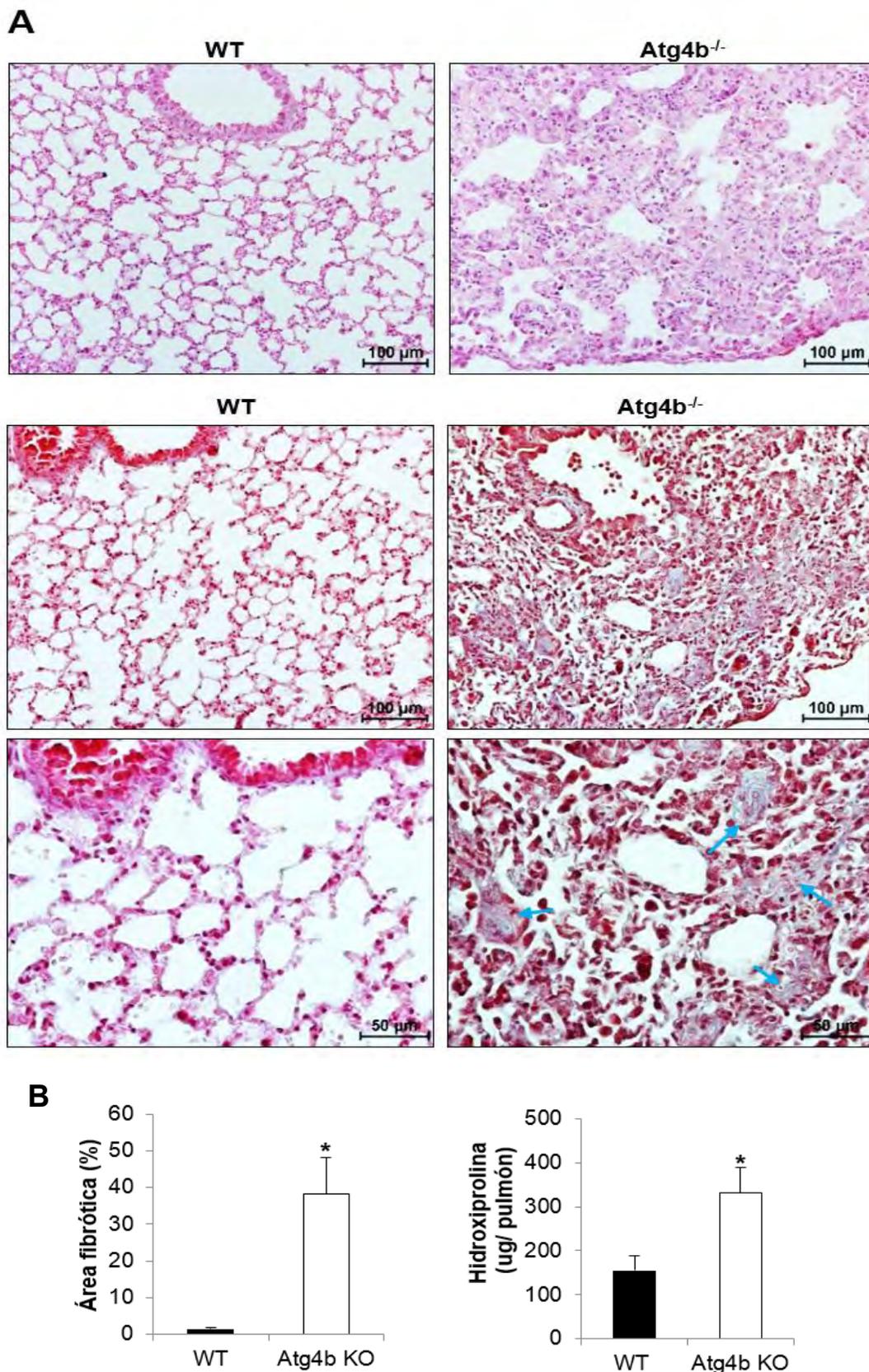


FIGURA 30. La ausencia de *Atg4b* y la deficiencia de la autofagia sensibilizan a los ratones al desarrollo de fibrosis pulmonar. (A) Imágenes representativas de microscopía óptica de secciones de tejido pulmonar teñidas con tricrómico de H & E y Masson de ratones WT y *Atg4b* nulos a los 21 días de la instilación de tunicamicina. **(B)** Porcentaje de extensión de fibrosis del área de tejido dañada en los campos pulmonares

mediante análisis cuantitativo de imágenes y contenido de hidroxiprolina en pulmones de ratones WT y Atg4b-deficientes tratados con tunicamicina.

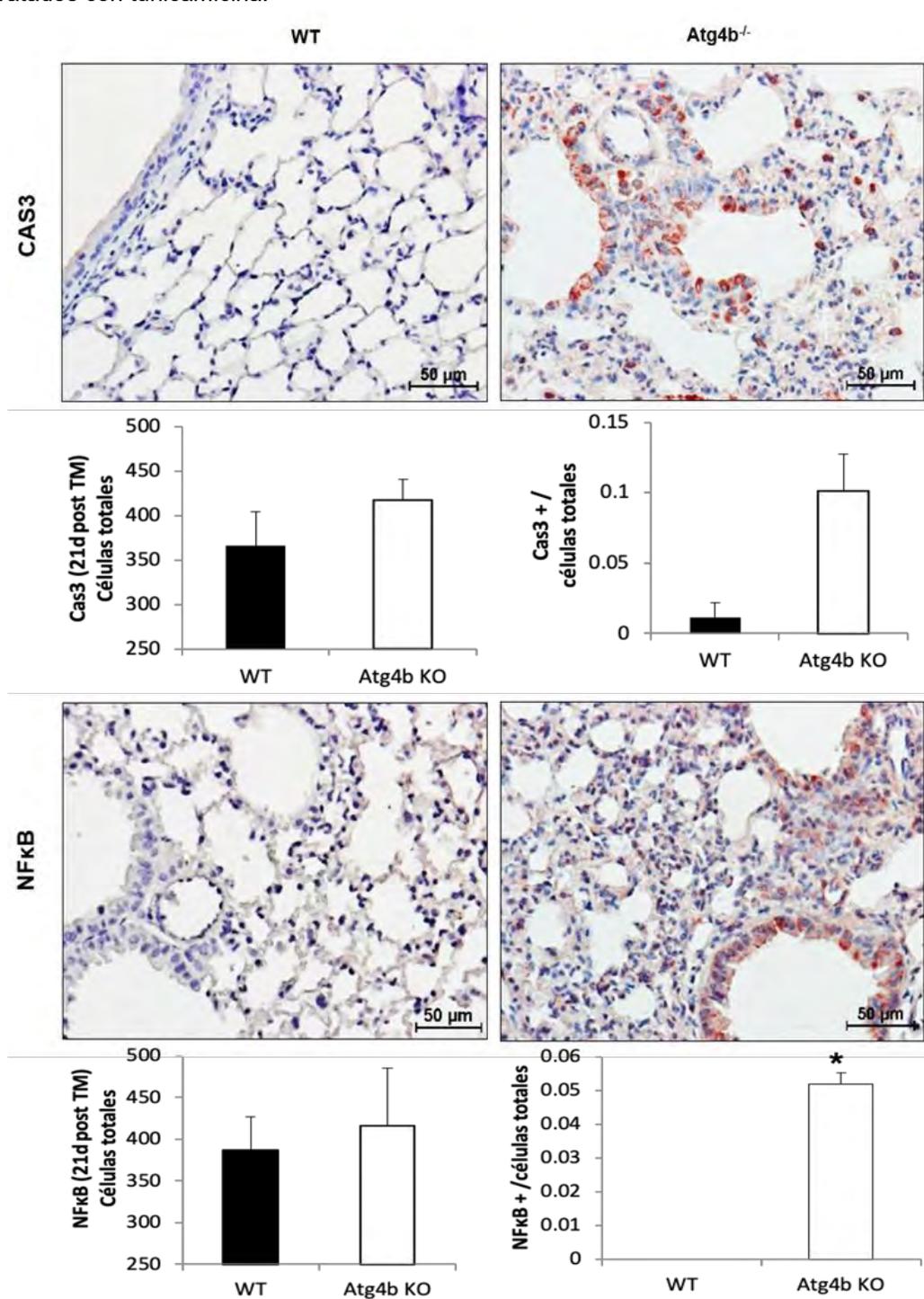


FIGURA 31. Actividad apoptótica e inflamatoria persistentes en el pulmón de los ratones Atg4b^{-/-} posterior a 21 días de la inducción de estrés del RE con tunicamicina. Imágenes de microscopía de luz representativas de secciones de tejido de pulmón de ratones tratados con tunicamicina WT y Atg4b^{-/-}, a los 21 días después del tratamiento con tunicamicina y teñidos positivamente para NFκB y CAS3. Debajo de cada inmunohistoquímica, se muestran las gráficas con el número total de células cuantificadas y la normalización de las células teñidas positivamente vs las células totales. Los resultados mostrados representan la media ± DE. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student (* p <0,05).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la activación de la autofagia en los pulmones de los ratones WT podría restaurar la proteostasis, al eliminar proteínas defectuosas y mal plegadas que se acumulan en el RE, atenuando el estrés, la apoptosis de las células epiteliales, y la respuesta inflamatoria, y previniendo con ello el desarrollo de fibrosis pulmonar. Por el contrario, en los ratones mutantes, la deficiencia de la proteasa ATG4B y la disminución en la actividad autofágica, podrían comprometer a las células del pulmón para alcanzar dicha proteostasis y aumentar la susceptibilidad de las células epiteliales a los estímulos pro-apoptóticos y pro-fibróticos inducidos por el estrés del RE.

DISCUSIÓN

En el envejecimiento, se ha reportado que hay una pérdida de la proteostasis caracterizada por una disminución en la expresión de proteínas que participan en la síntesis y plegamiento de las proteínas lo que altera las funciones del retículo endoplásmico, así como defectos en la actividad de los sistemas proteolíticos de la célula: la autofagia y el sistema ubiquitina-proteosoma, lo que resulta en alteraciones para eliminar la formación de agregados citotóxicos dentro de las células. Los agregados de proteínas, el estrés de RE y la activación de la respuesta UPR, así como una disminución de la actividad autofágica, son características que se encuentra en muchas patologías asociadas al envejecimiento, entre ellas, la fibrosis pulmonar idiopática. Aunque la etiología de la FPI aún no ha sido esclarecida, se ha propuesto que la apoptosis de las células epiteliales alveolares, es un factor determinante para el desarrollo de esta enfermedad. Diversos estudios han mostrado, que en el epitelio pulmonar de pacientes con FPI, hay una expresión elevada de distintos marcadores del estrés de RE. Asociado a esto, se ha visto que las mutaciones que afectan el procesamiento de la proteína surfactante C (SFTPC) (Korfei et al, 2008), el humo del cigarro (Jorgensen et al, 2008) las infecciones virales (Lawson et al, 2008) y la inhalación de partículas inorgánicas (Kamp et al, 2013) también favorecen un incremento en el estrés de RE, y se ha propuesto que esto hace que las células epiteliales alveolares sean más susceptibles a la apoptosis. Estos factores, también dan como resultado la activación de la respuesta UPR, probablemente como una respuesta adaptativa de las células para reestablecer la homeostasis del RE, sin embargo, su activación crónica tiene un efecto perjudicial. En el pulmón, es evidente que el estrés de RE está actuando como un mecanismo profibrótico, *in vitro*, en células epiteliales se ha sugerido que probablemente como un mecanismo para evitar la activación de la apoptosis en respuesta a la inducción del estrés de RE, las células empiezan a adquirir características **mesenquimales**, un proceso conocido como transición epitelio-mesénquima, el cual puede contribuir en el incremento de la población de miofibroblastos, exacerbando con ello el depósito de matriz extracelular en el pulmón (Tanjore et al., 2011; Zhong et al., 2011). Por otro lado, el estrés de RE induce la autofagia, un mecanismo que contribuye en la restauración de la homeostasis celular degradando los agregados de proteínas y promoviendo la supervivencia de las células. La sobreexpresión de una forma mutante de SFTPC en células epiteliales alveolares, resulta en la inducción de estrés de RE y la formación de agresomas que tienen una localización perinuclear (Mulugeta

et al., 2005). De forma interesante, cuando se induce la autofagia los lisosomas y los autofagosomas se localizan en la periferia del núcleo (Köchli et al., 2006) por lo que es probable que estos agregados sean degradados principalmente vía autofagia. En este trabajo, nosotros observamos que en células epiteliales la inducción de estrés de RE con tunicamicina, da como resultado cambios en la morfología celular que se caracterizaron por una pérdida en su forma cuboidal, mientras que desarrollaron un fenotipo alargado con extensiones citoplasmáticas. Aunque se ha reportado que esta morfología puede ser típica de células mesenquimales, nosotros no evaluamos si la inducción del estrés de RE incrementaba la expresión de proteínas mesenquimales. Por otro lado, en este trabajo demostramos por primera vez que en células epiteliales, el estrés de RE induce un incremento en la expresión de ATG4B lo que también está acompañado por una mayor actividad autofágica. Posteriormente, para evaluar cuál es el papel de la autofagia ante el estrés de RE en las células epiteliales, utilizamos cloroquina, un inhibidor de la autofagia, y observamos que cuando las células son tratadas con tunicamicina y cloroquina, son más susceptibles a la apoptosis, por lo cual la activación de la autofagia es necesaria para atenuar el estrés y con ello promover la supervivencia celular.

Diferentes estudios han mostrado que la activación de componentes de la vía UPR, tales como XBP1, BiP y ATF4 inducen la autofagia (Margariti et al., 2013; Li et al., 2008; Matsumoto et al., 2013). Así mismo, en linfocitos B y T, así como en células plasmáticas la ausencia de componentes de la autofagia como *Atg7* y *Atg5*, muestran una expansión del RE, defectos en la movilización del calcio y estrés de RE (Jia et al., 2011; Pengo et al., 2013). De hecho, la autofagia está encargada de degradar ciertas regiones del RE (un proceso denominado como reticulofagia), y cuando se inhibe este proceso la supervivencia celular disminuye (Khaminets et al., 2015). Por otro lado, se ha publicado que en fibroblastos, la deficiencia de p62 incrementa la susceptibilidad a la apoptosis inducida por el tratamiento con tunicamicina (Park et al., 2016). En la obesidad, se ha visto que la disminución de la autofagia también resulta en un incremento en el estrés de RE (Yang et al., 2010). Estas investigaciones indican que la autofagia, está involucrada en el mantenimiento de la homeostasis del RE, y atenúa las condiciones de estrés. Para evaluar si en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-}, la deficiencia en la autofagia conllevaba a la activación de la respuesta UPR, evaluamos los niveles de BiP, XBP1 y CHOP durante condiciones basales. Observamos que, en el pulmón de los ratones KO, había un ligero incremento en los niveles de estrés de RE comparado con los pulmones de ratones WT. La activación de la UPR en condiciones basales, probablemente esté

actuando como un mecanismo compensatorio para mantener la homeostasis del RE debido a la disminución de la actividad autofágica en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-}.

Otro de los objetivos principales en este estudio fue analizar *in vivo*, como el estrés de RE y la autofagia podrían estar relacionados en la muerte del epitelio alveolar y el desarrollo de fibrosis en el pulmón, ya que el papel de ambos mecanismos en el desarrollo de esta patología no ha sido estudiado simultáneamente.

En un modelo de ratón se ha visto que la sobreexpresión de una forma mutante de SFTPC en el epitelio alveolar, o la instilación con tunicamicina, generan estrés de RE y activación de la respuesta UPR, pero esto no es suficiente para inducir daño pulmonar o fibrosis. Sin embargo, cuando los ratones son tratados con bleomicina y tunicamicina, los animales desarrollan una fibrosis más severa comparada con los animales tratados únicamente con bleomicina (Lawson et al., 2011). Los autores sugieren que debido al estrés de RE, las células epiteliales son más susceptibles a la apoptosis y al daño generado por la bleomicina lo que resulta en un daño pulmonar exacerbado. En este estudio, mostramos que la instilación con tunicamicina sí ejerce un efecto en el pulmón, ya que a los 3 días post-instilación observamos un incremento en la expresión de los marcadores de estrés de RE, BiP, XBP1 y CHOP en el epitelio alveolar y bronquiolar, lo cual estuvo significativamente aumentado en los ratones *Atg4b*^{-/-}. La activación de la respuesta UPR en el epitelio bronquiolar fue un hallazgo interesante ya que se ha visto que niveles altos de estrés de RE, así como la inflamación en este tipo de epitelio, está asociado con una mayor síntesis de mucina, una glicoproteína que se encuentra en el moco del pulmón. En cultivos primarios de células humanas del epitelio bronquial, la producción de mucina está mediada por la activación de XBP1 e IRE1 β en condiciones fisiológicas. *In vivo*, las células Clara de pulmones de ratones *Ire1 β* ^{-/-}, producen niveles bajos de la mucina MUC5B después del daño con ovoalbúmina (Martino et al., 2013). Durante la inflamación de las vías respiratorias, la activación de IRE1 conlleva a la expansión de las reservas de Ca²⁺ del RE en las células ciliadas, lo que amplifica la señal para la secreción de citocinas proinflamatorias y la producción de mucina (Martino et al., 2013). Por otra parte, en pacientes con FPI se ha publicado que tienen niveles significativamente más altos de MUC5B la cual se localiza en células columnares secretorias bronquiales y en bronquiolos proximales más grandes. Así mismo, en FPI familiar y esporádica, se ha reportado un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen MUC5B (rs35705950). Sin embargo, la relación entre el estrés ER y la secreción de moco en los pulmones de pacientes con FPI aún no ha sido estudiada (Peljto et al., 2015; Seibold et al., 2012).

Se ha sugerido, que altos niveles de MUC5B en los bronquiolos respiratorios, pueden afectar la reparación alveolar al interferir con la interacción entre las células epiteliales alveolares tipo II y la matriz extracelular subyacente o al interferir con las propiedades de tensión superficial del surfactante, lo que conduce a una falla en la reepitelización (Peljto et al., 2015; Seibold et al., 2012). Sin embargo, la co-localización de esta proteína con biomarcadores de estrés RE en pulmones con FPI, no ha sido reportada hasta el momento.

Por otro lado, a los 3 días después del daño con tunicamicina, en el pulmón de ratones de ambos genotipos observamos un incremento en los niveles de proteína de XBP1s, BiP y CHOP. Sin embargo, en el pulmón de los ratones ATG4B KO, no observamos un aparente procesamiento de XBP1, ya que mientras que en los pulmones de ratones WT la forma no procesada (XBP1-U) disminuyó casi por completo, en ratones *Atg4b*^{-/-} seguimos observando la presencia de XBP1-U y la isoforma procesada o XBP1-S, no tuvo un incremento después de la inducción de estrés de RE. Olivares y Henkel, han demostrado que la eliminación del gen de *Xbp1* en el hígado, exacerba el daño hepático inducido por la tunicamicina. Los ratones con la delección hepática de XBP1, tienen una mayor activación de vías pro-apoptóticas y aunque activan la respuesta UPR, estos ratones no logran atenuar el estrés ya que 7 días después del tratamiento con tunicamicina, siguen mostrando una expresión elevada de *Chop*, *Bip* y *Atf4* (Olivares & Henkel, 2015). Por medio de inmunohistoquímica nosotros observamos que, a los 14 y 21 días post-tunicamicina, en pulmones de ratones *Atg4b*^{-/-}, las células del epitelio alveolar y bronquiolar seguían mostrando señal positiva para BiP y CHOP (resultados no mostrados). Estos datos indican que, la deficiencia de ATG4B probablemente esté alterando la correcta activación de la vía UPR y el procesamiento de XBP1, aunque para comprobar esto serían necesarios más estudios. Como se mencionó en la introducción, la isoforma XBP1-U puede unirse a XBP1-S para llevarlo a degradación vía proteosoma y de esta manera, apagar la respuesta UPR, por lo cual, no podemos descartar que la presencia de XBP1-U en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-} tratados con tunicamicina, sea un mecanismo compensatorio por el que se intenta disminuir la señal de estrés. El estrés de RE y la autofagia son procesos que están relacionados entre sí, por lo que es posible que defectos en alguno de estos dos mecanismos afecte la viabilidad celular.

Así mismo, a pesar de la inducción de estrés de RE en el pulmón, los ratones *Atg4b*^{-/-} no mostraron activación de la autofagia. Por el contrario, el pulmón de ratones WT mostró un incremento en la actividad autofágica caracterizada por altos niveles de LC3-II pero, sorprendentemente también observamos altos niveles de p62. Esto puede deberse a que

cuando la autofagia permanece activa durante largos periodos, se eleva la transcripción de p62 y por tanto, los niveles de proteína aumentan (Sahani et al., 2014). Además, durante el estrés de RE, se ha visto que XBP1 también regula la transcripción de p62 (Lee et al., 2003). En conjunto con los resultados observados *in vitro*, estos datos refuerzan el concepto de que la autofagia es activada como un mecanismo que protege a las células del pulmón de la muerte celular y contribuye a la atenuación del estrés de RE.

Además de los niveles elevados de estrés de RE, especialmente en el tejido de los ratones *Atg4b*^{-/-}, observamos señal positiva para caspasa-3 así como presencia de NFκB en el núcleo de células del epitelio alveolar y bronquiolar, lo cual fue persistente hasta 21 días después de la instilación con tunicamicina, mientras que en esta misma etapa específicamente, la señal para ambas proteínas fue indetectable en el pulmón de ratones WT. Diversos estudios han reportado que los tres sensores de la vía UPR pueden activar a NFκB (Tam et al., 2012; Garg et al., 2012) y adicionalmente, se ha reportado que un estímulo agudo puede favorecer que NFκB tenga una actividad pro-apoptótica (Kaltschmidt et al., 2000). Por otro lado, varios estudios han mostrado que CHOP se une al promotor de NFκB e incrementa su transcripción, lo que también está relacionado con una mayor secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6, TNF-α, entre otras (Willy et al., 2015; Schmitz et al., 2018). Adicionalmente, en este estudio nosotros observamos que después del daño con tunicamicina, CHOP tenía una localización nuclear en células alveolares y bronquiolares, así como en macrófagos alveolares, lo cual fue más evidente en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-}, y de manera interesante, en el epitelio alveolar de pulmones de pacientes con FPI, también se ha detectado señal nuclear para CHOP (Korfei et al., 2008). Cuando el estrés de RE es crónico y no se resuelve, CHOP inhibe la expresión de genes autofágicos como *p62*, *Atg7*, *Atg5*, *Atg10* y *Gabarap* e incrementa la transcripción de genes involucrados en la activación de la apoptosis (B'chir et al., 2014). En el modelo de bleomicina, la inhibición genética o farmacológica de CHOP disminuye significativamente la severidad de la fibrosis pulmonar, esto puede deberse a que por una parte, la ausencia de CHOP protege a las células epiteliales de la apoptosis y también porque inhibe que los macrófagos alveolares se diferencien hacia un fenotipo pro-fibrótico (Yao et al., 2016; Tanaka et al., 2015; Ayaub et al., 2016). Por otra parte, aunque no ha sido demostrado es probable que la deficiencia de CHOP también promueva que la actividad autofágica se mantenga y se atenúe de manera más eficiente el estrés de RE. De hecho, se ha sugerido que la estimulación de la autofagia podría estar protegiendo al pulmón del daño, ya que la activación de la autofagia por medio de

rapamicina atenúa el desarrollo de fibrosis pulmonar inducido con bleomicina en ratones (Patel et al., 2012). En otro estudio, recientemente se ha reportado que la instilación con esta droga induce estrés de RE, y el tratamiento con fármacos que inhiben a este último, atenúa significativamente el desarrollo de fibrosis pulmonar. De forma interesante, una de las drogas utilizadas en ese trabajo, inhibe la activación de mTOR, que como ya se mencionó en la introducción, es uno de los principales inhibidores de la autofagia (Hsu et al., 2017). Aunque el flujo autofágico no fue evaluado en los estudios mencionados, es probable que la inhibición farmacológica del estrés de RE o la deficiencia genética de los componentes de la UPR, también involucra la estimulación de la autofagia y con ello se disminuye el desarrollo de fibrosis.

Relacionando estos estudios con el trabajo aquí presentado, es evidente que la deficiencia de ATG4B y la disminución de la autofagia, dan como resultado mayores niveles de estrés de RE, el cual no es atenuado y se vuelve crónico en el pulmón. Al no resolverse adecuadamente el estrés en el pulmón de ratones *Atg4b*^{-/-}, se promueve un ambiente pro-inflamatorio y también se induce la activación de la apoptosis del epitelio alveolar, lo que finalmente da como resultado el desarrollo de fibrosis pulmonar, comparados con ratones WT, los cuales mostraron un daño mínimo en el pulmón.

Como ya se ha mencionado, la autofagia es considerada como un mecanismo de pro-supervivencia ya que contribuye a atenuar distintos tipos de estrés celular, participando en la degradación de componentes celulares que pueden ser dañinos para la célula. Se ha mostrado que la inhibición de la autofagia en distintos modelos animales, acelera el envejecimiento, y la homeostasis e integridad celular se ven disminuidas. Por el contrario, se ha reportado que un incremento en la autofagia podría ser una estrategia anti-envejecimiento ya que la inducción de la actividad autofágica está asociada con la longevidad y con una disminución en el desarrollo de diversas patologías. Por ejemplo, la sobreexpresión sistémica de *Atg5* en ratón, da como resultado un incremento en el flujo autofágico en diversos tejidos, entre ellos, el pulmón, y de manera importante, la longevidad de estos ratones transgénicos se incrementa significativamente comparados con ratones silvestres (Pyo et al., 2013). Así mismo, en los animales *Atg5* Tg la obesidad asociada al envejecimiento y los cambios asociados a este se disminuyen significativamente (Pyo et al., 2013). Sin embargo, en este estudio no está claro si el incremento en la longevidad en estos ratones se debe exclusivamente al incremento en la autofagia, ya que se ha visto que ATG5 además de regular este proceso, puede tener otras funciones adicionales. Recientemente, este último

punto fue abordado en otro un modelo murino en donde se publicó que inhibiendo la interacción entre Beclin1 y su regulador negativo Bcl2, se incrementa el flujo autofágico basal de manera constitutiva en diversos tejidos. Es importante mencionar, que Beclin1 además de la autofagia, también participa en procesos como la endocitosis, sin embargo, ésta no se ve alterada, por lo que los efectos observados debido a la disrupción del complejo Beclin1-Bcl2 se deben únicamente a mayores niveles de autofagia basal. Este incremento en la autofagia se mantiene hasta los 20 meses de edad, incrementando la longevidad y atenuando de manera significativa el desarrollo de fenotipos asociados al envejecimiento de los ratones, tales como daño al DNA, fibrosis en riñón y corazón, así como la disminución en la susceptibilidad al desarrollo de distintos tipos de cáncer. Adicionalmente, al cruzar ratones que tienen inhibida la interacción entre Beclin1 y Bcl2 con ratones deficientes en el gen *Klotho*, los cuales muestran un envejecimiento prematuro, los fenotipos asociados a este último tales como el bajo peso, tamaño reducido y alta letalidad, se atenúan de manera significativa y se rescata un fenotipo similar al observado en ratones WT. En humanos, se ha publicado que adultos mayores de cien años sin antecedentes de enfermedades crónico-degenerativas, tienen altos niveles de Beclin-1 comparado con adultos jóvenes quienes mostraban niveles significativamente menores de esta proteína (Emanuele et al., 2014) En este estudio, los autores proponen que la longevidad de adultos centenarios, podría deberse a una mayor actividad autofágica, sin embargo, en este estudio no se evalúan la formación de autofagosomas, el flujo autofágico u otros marcadores autofagia. En conjunto, estos resultados demuestran que incrementando la autofagia no sólo se promueve la longevidad sino que también, la activación de este proceso puede prevenir el desarrollo de diversas patologías asociadas al envejecimiento.

En conclusión, en este estudio demostramos que la disminución en la autofagia en el pulmón tiene como consecuencia defectos en la resolución del estrés de RE, y por primera vez mostramos como la alteración de ambos mecanismos mecanismos está involucrada en el desarrollo de fibrosis pulmonar. En este trabajo proponemos que la estimulación de la autofagia, puede ser una estrategia terapéutica que atenúe el estrés de RE observado en el pulmón de pacientes con FPI, promoviendo así la supervivencia de las células epiteliales alveolares.

CONCLUSIONES

- El tratamiento con tunicamicina en las células epiteliales alveolares MLE12 indujo la activación de autofagia.
- La inhibición de la autofagia inducida por cloroquina exacerbó los efectos citotóxicos de la tunicamicina.
- La ausencia de Atg4B y la consecuente disminución de la actividad autofágica induce una activación leve de la respuesta UPR en el pulmón, en condiciones basales.
- In vivo, la exposición del pulmón a tunicamicina induce un incremento en los niveles de BiP, CHOP y XBP1, tanto en ratones WT como en ratones Atg4b KO.
- In vivo, la exposición del pulmón a tunicamicina induce la activación de la autofagia sólo en ratones WT, mientras que en los ratones mutantes debido a la deficiencia de Atg4B no observamos activación de la autofagia, a pesar de la inducción del estrés de retículo endoplásmico.
- La infiltración de células inflamatorias fue significativamente mayor en el pulmón de los ratones Atg4B KO en comparación con los ratones WT, posterior a los 3 días del tratamiento con tunicamicina.
- El número de células apoptóticas y positivas para NFkB fue significativamente mayor en el pulmón de los ratones Atg4B KO en comparación con los ratones WT, posterior a los 3 días del tratamiento con tunicamicina.
- La apoptosis e inflamación exacerbada, asociadas con la deficiencia de autofagia conllevan al desarrollo de fibrosis pulmonar sólo en los ratones Atg4b KO, en un periodo de 21 días posterior al tratamiento con tunicamicina.
- La activación de la autofagia es esencial para la atenuación del estrés de retículo endoplásmico en las células epiteliales alveolares y promover su supervivencia.

REFERENCIAS

- Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. (2012). Autophagy in mammalian cells. *World J Biol Chem.* 26; 3(1): 1–6. Altered dynamics of the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J Cell Sci.* Mar 1;120(Pt 5):782-91. Epub 2007 Feb 6. DOI: 10.1242/jcs.001073
- Abraham DJ, Varga J. (2005). Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol.* 26(11):587-95.
- Alvers AL, Fishwick LK, Wood MS, et al. (2009). Autophagy and amino acid homeostasis are required for chronological longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging cell.* 8(4):353-369.
- Araya J1, Kojima J, Takasaka N, Ito S, Fujii S, Hara H, Yanagisawa H, Kobayashi K, Tsurushige C, Kawaishi M, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Kawabata Y, Hano H, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis. (2013). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*;304(1):L56-69. doi: 10.1152/ajplung.00213.2012.
- Ayaub EA, Kolb PS, Mohammed-Ali Z, Tat V, Murphy J, Bellaye PS1, Shimbori C1, Boivin FJ2, Lai R2, Lynn EG3, Lhoták Š3, Bridgewater D2, Kolb MR1,2, Inman MD1, Dickhout JG3, Austin RC3, Ask K1,2.(2016). GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Pathol.* 239(4):411-25. doi: 10.1002/path.4738.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., ... Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 182(4), 685–701. <http://doi.org/10.1083/jcb.200803137>.
- Barnett A, Brewer GJ. (2011). Autophagy in Aging and Alzheimer's Disease: Pathologic or Protective? *Journal of Alzheimer's disease : JAD.* 25(3):385-394.
- B'chir W1, Chaveroux C1, Carraro V1, Averous J1, Maurin AC1, Jousse C1, Muranishi Y1, Parry L1, Fafournoux P1, Bruhat A2. (2014). Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal.* 26(7):1385-91. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.03.009.
- Bejarano, E., Murray, J. W., Wang, X., Pampliega, O., Yin, D., Patel, B., ... Cuervo, A. M. (2018). Defective recruitment of motor proteins to autophagic compartments contributes to autophagic failure in aging. *Aging Cell*, 17(4), e12777. <http://doi.org/10.1111/accel.12777>
- Bernales, S., McDonald, K. L., & Walter, P. (2006). Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLoS Biology*, 4(12), e423. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040423>
- Bertolotti A1, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.*;2(6):326-32. DOI: 10.1038/35014014
- Bommiasamy, H., Back, S. H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., ... Brewer, J. W. (2009). ATF6 α induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 10), 1626–1636. <http://doi.org/10.1242/jcs.045625>
- Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(5), a013201. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a013201>
- Brehme, M., Voisine, C., Rolland, T., Wachi, S., Soper, J. H., Zhu, Y., ... Morimoto, R. I. (2014). A Chaperome Sub-Network Safeguards Proteostasis in Aging and Neurodegenerative Disease. *Cell Reports*, 9(3), 1135–1150. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.042>
- Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B. (2000). Age-related alterations of proteasome structure and function in aging epidermis. *Exp Gerontol.* 35(6-7):767-77.

- Cabrera, S., Maciel, M., Herrera, I., Nava, T., Vergara, F., Gaxiola, M., ... Pardo, A. (2015). Essential role for the ATG4B protease and autophagy in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Autophagy*, 11(4), 670–684. <http://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034409>
- Cardoso, C. M. P., Groth-Pedersen, L., Høyer-Hansen, M., Kirkegaard, T., Corcelle, E., Andersen, J. S., ... Nylandsted, J. (2009). Depletion of Kinesin 5B Affects Lysosomal Distribution and Stability and Induces Peri-Nuclear Accumulation of Autophagosomes in Cancer Cells. *PLoS ONE*, 4(2), e4424. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004424>
- Carrard G, Dieu M, Raes M, Toussaint O, Friguet B. (2003). Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 35(5):728-39.
- Cescon, M., Chen, P., Castagnaro, S., Gregorio, I., & Bonaldo, P. (2016). Lack of collagen VI promotes neurodegeneration by impairing autophagy and inducing apoptosis during aging. *Aging (Albany NY)*, 8(5), 1083–1098. <http://doi.org/10.18632/aging.100924>
- Chalil S1, Jaspers RT, Manders RJ, Klein-Nulend J, Bakker AD, Deldicque L. (2014). Increased endoplasmic reticulum stress in mouse osteocytes with aging alters Cox-2 response to mechanical stimuli. *Calcif Tissue Int.* 2015 Feb;96(2):123-8. doi: 10.1007/s00223-014-9944-6.
- Chen X1, Shen J, Prywes R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.*277(15):13045-52. Epub 2002 Jan 30. DOI: 10.1074/jbc.M110636200
- Chen, Y., & Brandizzi, F. (2013). IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends in Cell Biology*, 23(11), 10.1016/j.tcb.2013.06.005. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.06.005>
- Cherra, S. J., Kulich, S. M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B. W., & Chu, C. T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), 533–539. <http://doi.org/10.1083/jcb.201002108>
- Chilosi M, Carloni A, Rossi A, Poletti V. (2013). Premature lung aging and cellular senescence in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis and COPD/emphysema. *Transl Res.* 162(3):156-73. doi:10.1016/j.trsl.2013.06.004.
- Chondrogianni N, Petropoulos I, Franceschi C, Friguet B, Gonos ES. (2000). Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. *Exp Gerontol.* 35(6-7):721-8.
- Chondrogianni N, Stratford FL, Trougakos IP, Friguet B, Rivett AJ, Gonos ES. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J Biol Chem.* 278(30):28026-37.
- Cuervo AM, Dice JF. (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic.* Jul;1(7):570-83.
- Cuervo AM1, Dice JF. (2000). Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31505-13. DOI: 10.1074/jbc.M002102200
- Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., d' Azzo, A., & Dice, J. F. (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *The EMBO Journal*, 22(1), 47–59. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdq002>
- Cullinan SB1, Diehl JA. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* May 7;279(19):20108-17. DOI: 10.1074/jbc.M314219200
- Delire, B., Lebrun, V., Selvais, C., Henriët, P., Bertrand, A., Horsmans, Y., & Leclercq, I. A. (2017). Aging enhances liver fibrotic response in mice through hampering extracellular matrix remodeling. *Aging (Albany NY)*, 9(1), 98–111. <http://doi.org/10.18632/aging.101124>

- Emanuele E, Minoretti P, Sanchis-Gomar F, Pareja-Galeano H, Yilmaz Y, Garatachea N, Lucia A. (2014). Can enhanced autophagy be associated with human longevity? Serum levels of the autophagy biomarker beclin-1 are increased in healthy centenarians. *Rejuvenation Res.* 17(6):518-24. doi: 10.1089/rej.2014.1607.
- Fan, W., Nassiri, A., & Zhong, Q. (2011). Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7769–7774. <http://doi.org/10.1073/pnas.1016472108>
- Fernández, Á. F., & López-Otín, C. (2015). The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), 33–41. <http://doi.org/10.1172/JCI73940>
- Fernández ÁF, Sebti S, Wei Y, Zou Z, Shi M4, McMillan KL4, He C5, Ting T1,2, Liu Y1,2,3, Chiang WC1,2, Marciano DK2, Schiattarella GG2, Bhagat G6, Moe OW2,4,7, Hu MC8,9, Levine B. Disruption of the beclin-1-BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. (2018). *Nature*. 558(7708):136-140. doi: 10.1038/s41586-018-0162-7.
- Fujita, N., Hayashi-Nishino, M., Fukumoto, H., Omori, H., Yamamoto, A., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), 4651–4659. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08-03-0312>
- Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <http://doi.org/10.15252/embj.201796697>.
- Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. (2012). ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression?. *Trends Mol Med*. 18(10):589-98. doi: 10.1016/j.molmed.2012.06.010.
- Gavilán MP1, Pintado C, Gavilán E, Jiménez S, Ríos RM, Vitorica J, Castaño A, Ruano D. (2009). Dysfunction of the unfolded protein response increases neurodegeneration in aged rat hippocampus following proteasome inhibition. *Aging Cell*.;8(6):654-65. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00519.x.
- Ghosh, A. K., Garg, S. K., Mau, T., O'Brien, M., Liu, J., & Yung, R. (2015). Elevated Endoplasmic Reticulum Stress Response Contributes to Adipose Tissue Inflammation in Aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 70(11), 1320–1329. <http://doi.org/10.1093/gerona/glu186>
- Ghosh, A. K., Mau, T., O'Brien, M., Garg, S., & Yung, R. (2016). Impaired autophagy activity is linked to elevated ER-stress and inflammation in aging adipose tissue. *Aging (Albany NY)*, 8(10), 2525–2536. <http://doi.org/10.18632/aging.101083>
- Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, et al. (2010). Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med*. 16(11):1313-20. doi: 10.1038/nm.2247.
- Guo FJ, Xiong Z, Lu X3, Ye M4, Han X2, Jiang R5. (2014). ATF6 upregulates XBP1S and inhibits ER stress-mediated apoptosis in osteoarthritis cartilage. *Cell Signal*. 26(2):332-42. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.018.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A, Yoshimori T. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. Mar 21;495(7441):389-93. doi: 10.1038/nature11910.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem*. 282(52):37298-302.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441(7095):885-9.
- Harris J, Hartman M, Roche C, et al. (2011). Autophagy Controls IL-1 β Secretion by Targeting Pro-IL-1 β for Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(11):9587-9597.

- Heifetz A, Keenan RW, Elbein AD. (1979). Mechanism of action of tunicamycin on the UDP-GlcNAc:dolichylphosphate GlcNAc-1-phosphate transferase. *Biochemistry*. May 29;18(11):2186-92.
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. (2003). A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem*. 19; 278(51):51841-50.
- Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1088. <http://doi.org/10.1038/ncb3221>
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(10):682-96. doi: 10.1038/nrm2774.
- Horn, M. A., & Trafford, A. W. (2016). Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 93, 175–185. <http://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.11.005>
- Houck, S. A., Ren, H. Y., Madden, V. J., Bonner, J. N., Conlin, M. P., Janovick, J. A., ... Cyr, D. M. (2014). Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR. *Molecular Cell*, 54(1), 166–179. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.025>
- Hsu, H.-S., Liu, C.-C., Lin, J.-H., Hsu, T.-W., Hsu, J.-W., Su, K., & Hung, S.-C. (2017). Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Scientific Reports*, 7, 14272. <http://doi.org/10.1038/s41598-017-14612-5>
- Hunt, C. R., Dix, D. J., Sharma, G. G., Pandita, R. K., Gupta, A., Funk, M., & Pandita, T. K. (2004). Genomic Instability and Enhanced Radiosensitivity in Hsp70.1- and Hsp70.3-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 24(2), 899–911. <http://doi.org/10.1128/MCB.24.2.899-911.2004>
- Hussain SG1, Ramaiah KV. (2007). Reduced eIF2alpha phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochem Biophys Res Commun*. 6;355(2):365-70. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.01.156
- Hwang J, Qi L. (2018). Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci*. 43(8):593-605. doi: 10.1016/j.tibs.2018.06.005.
- Ishida Y1, Nagata K. (2009). Autophagy eliminates a specific species of misfolded procollagen and plays a protective role in cell survival against ER stress. *Autophagy*. 5(8):1217-9.
- Ishida, Y., Yamamoto, A., Kitamura, A., Lamandé, S. R., Yoshimori, T., Bateman, J. F., ... Nagata, K. (2009). Autophagic Elimination of Misfolded Procollagen Aggregates in the Endoplasmic Reticulum as a Means of Cell Protection. *Molecular Biology of the Cell*, 20(11), 2744–2754. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08-11-1092>
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, 6(6), 764–776. <http://doi.org/10.4161/auto.6.6.12709>
- Itakura, E., & Mizushima, N. (2011). p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *The Journal of Cell Biology*, 192(1), 17–27. <http://doi.org/10.1083/jcb.201009067>.
- Jahreiss, L., Menzies, F. M., & Rubinsztein, D. C. (2008). The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(4), 574–587. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00701.x>
- Jia, W., Pua, H. H., Li, Q.-J., & He, Y.-W. (2011). Autophagy Regulates Endoplasmic Reticulum Homeostasis and Calcium Mobilization in T Lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(3), 1564–1574. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.1001822>
- Jimenez-Sanchez, M., Thomson, F., Zavodszky, E., & Rubinsztein, D. C. (2012). Autophagy and polyglutamine diseases. *Progress in Neurobiology*, 97(2), 67–82. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.013>

- Jo, C., Gundemir, S., Pritchard, S., Jin, Y. N., Rahman, I., & Johnson, G. V. W. (2014). Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nature Communications*, 5, 3496. <http://doi.org/10.1038/ncomms4496>
- Jorgensen, E., Stinson, A., Shan, L., Yang, J., Gietl, D., & Albino, A. P. (2008). Cigarette smoke induces endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in normal and malignant human lung cells. *BMC Cancer*, 8, 229. <http://doi.org/10.1186/1471-2407-8-229>
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Dröge W, Schmitz ML. (2000). The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem*. 267(12):3828-35.
- Kang HT, Lee KB, Kim SY, Choi HR, Park SC. (2011). Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS One*.;6(8):e23367. doi: 10.1371/journal.pone.0023367.
- Khalil H, Tazi M, Caution K, et al. (2016). Aging is associated with hypermethylation of autophagy genes in macrophages. *Epigenetics*. 11(5):381-8.
- Khaminets A1, Heinrich T2, Mari M3, Grumati P1, Huebner AK2, Akutsu M4, Liebmann L2, Stolz A1, Nietzsche S5, Koch N6, Mauthe M3, Katona I7, Qualmann B6, Weis J7, Reggiori F3, Kurth I2, Hübner CA2, Dikic I8. (2015). Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature*.;522(7556):354-8. doi: 10.1038/nature14498.
- Kamp, D. W., Liu, G., Cheresh, P., Kim, S.-J., Mueller, A., Lam, A. P., ... Beri, R. (2013). Asbestos-Induced Alveolar Epithelial Cell Apoptosis. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress Response. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(6), 892–901. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0053OC>
- Khandelwal, N., Simpson, J., Taylor, G., Rafique, S., Whitehouse, A., Hiscox, J., & Stark, L. A. (2011). Nucleolar NF-κB/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocalization of nucleophosmin. *Cell Death and Differentiation*, 18(12), 1889–1903. <http://doi.org/10.1038/cdd.2011.79>
- Kiffin R1, Kaushik S, Zeng M, Bandyopadhyay U, Zhang C, Massey AC, Martinez-Vicente M, Cuervo AM. (2007). Kim I1, Xu W, Reed JC. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 7(12):1013-30. doi: 10.1038/nrd2755.
- Kim J, Huang WP, Klionsky DJ. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. (2001). *J Cell Biol*. 8; 152(1):51-64.
- Kimura S, Noda T, Yoshimori T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*. 2008;33(1):109-22.
- King JS. (2012). Autophagy across the eukaryotes: is *S. cerevisiae* the odd one out? *Autophagy*. 1; 8(7):1159-62.
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H., et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. (2000). *J Cell Biol*. 16; 151(2):263-76.
- Köchl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic*. Feb;7(2):129-45.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T., et al. (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441(7095):880-4.
- Kong, P., Christia, P., & Frangogiannis, N. G. (2013). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS, 71(4), 549-74.
- Korfei, M., Ruppert, C., Mahavadi, P., Henneke, I., Markart, P., Koch, M., ... Guenther, A. (2008). Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(8), 838–846. <http://doi.org/10.1164/rccm.200802-313OC>

- Korolchuk, V. I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F. H., Roberts, E. A., Imarisio, S., ... Rubinsztein, D. C. (2011). Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nature Cell Biology*, 13(4), 453–460. <http://doi.org/10.1038/ncb2204>
- Kouroku Y1, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 14(2):230-9. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401984.
- Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK, Mizushima N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*. 9(10):1491-9. doi: 10.4161/auto.25529.
- Kroemer G. (2015). Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J Clin Invest.* 125(1):1-4.
- Kropski JA, Blackwell TS1. (2018). Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of fibrotic disease. *J Clin Invest.* 128(1):64-73. doi: 10.1172/JCI93560.
- Kuang, E., Okumura, C. Y. M., Sheffy-Levin, S., Varsano, T., Shu, V. C.-W., Qi, J., ... Ronai, Z. A. (2012). Regulation of ATG4B Stability by RNF5 Limits Basal Levels of Autophagy and Influences Susceptibility to Bacterial Infection. *PLoS Genetics*, 8(10), e1003007. <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003007>
- Kumanomidou T1, Mizushima T, Komatsu M, Suzuki A, Tanida I, Sou YS, Ueno T, Kominami E, Tanaka K, Yamane T. (2005). The crystal structure of human Atg4b, a processing and de-conjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers. *J Mol Biol.* 355(4):612-8. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.018
- Labbadia, J., & Morimoto, R. I. (2015). The Biology of Proteostasis in Aging and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 435–464. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>
- Landajuela A, Hervás JH, Antón Z, Montes LR, Gil D2, Valle M2, Rodriguez JF, Goñi FM, Alonso A. (2016). Lipid Geometry and Bilayer Curvature Modulate LC3/GABARAP-Mediated Model Autophagosomal Elongation. *Biophys J.* Jan 19;110(2):411-422. doi: 10.1016/j.bpj.2015.11.3524.
- Lang T, Schaeffeler E, Bernreuther D., et al. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* 1; 17(13):3597-607.
- Lawson WE1, Crossno PF, Polosukhin VV, Roldan J, Cheng DS, Lane KB, Blackwell TR, Xu C, Markin C, Ware LB, Miller GG, Loyd JE, Blackwell TS. (2008). Endoplasmic reticulum stress in alveolar epithelial cells is prominent in IPF: association with altered surfactant protein processing and herpesvirus infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*;294(6):L1119-26. doi: 10.1152/ajplung.00382.2007.
- Lawson, W. E., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Tanjore, H., Polosukhin, V. V., Xu, X. C., ... Blackwell, T. S. (2011). Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10562–10567. <http://doi.org/10.1073/pnas.1107559108>.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7448–7459. <http://doi.org/10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003>
- Lee, I. H., & Finkel, T. (2009). Regulation of Autophagy by the p300 Acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6322–6328. <http://doi.org/10.1074/jbc.M807135200>
- Lee, J.-Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y.-S., ... Yao, T.-P. (2010). HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *The EMBO Journal*, 29(5), 969–980. <http://doi.org/10.1038/emboj.2009.405>
- Ley, B., & Collard, H. R. (2013). Epidemiology of idiopathic pulmonary fibrosis. *Clinical Epidemiology*, 5, 483–492. <http://doi.org/10.2147/CLEP.S54815>
- Li J1, Holbrook NJ. (2004). Elevated gadd153/chop expression and enhanced c-Jun N-terminal protein kinase activation sensitizes aged cells to ER stress. *Exp Gerontol.*;39(5):735-44. DOI: 10.1016/j.exger.2004.02.008.

- Li M, Hou Y, Wang J., et al. (2011). Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates. *J Biol Chem.* 4; 286(9):7327-38.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D., & Lee, A. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death and Differentiation*, 15(9), 1460–1471. <http://doi.org/10.1038/cdd.2008.81>
- Liu, C., Ma, H., Wu, J., Huang, Q., Liu, J. O., & Yu, L. (2013). Arginine68 is an essential residue for the C-terminal cleavage of human Atg8 family proteins. *BMC Cell Biology*, 14, 27. <http://doi.org/10.1186/1471-2121-14-27>
- Liu, E. Y., Xu, N., O'Prey, J., Lao, L. Y., Joshi, S., Long, J. S., ... Ryan, K. M. (2015). Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(3), 773–778. <http://doi.org/10.1073/pnas.1409563112>
- López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. (2016). Metabolic Control of Longevity. *Cell*. 11;166(4):802-821. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.031.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Margariti, A., Li, H., Chen, T., Martin, D., Vizcay-Barrena, G., Alam, S., ... Zeng, L. (2013). XBP1 mRNA Splicing Triggers an Autophagic Response in Endothelial Cells through BECLIN-1 Transcriptional Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(2), 859–872. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.412783>
- Mariño G, Uría JA, Puente XS, Quesada V, Bordallo J, López-Otín C. (2003). Human autophagins, a family of cysteine proteinases potentially implicated in cell degradation by autophagy. *J Biol Chem.* 278(6):3671-8. DOI: 10.1074/jbc.M208247200.
- Mariño, G., Fernández, A. F., Cabrera, S., Lundberg, Y. W., Cabanillas, R., Rodríguez, F., ... López-Otín, C. (2010). Autophagy is essential for mouse sense of balance. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2331–2344. <http://doi.org/10.1172/JCI42601>
- Martinez FJ, Collard HR, Pardo A3, Raghu G4, Richeldi L5, Selman M6, Swigris JJ7, Taniguchi H8, Wells AU9. (2017). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Nat Rev Dis Primers*.3:17074. doi: 10.1038/nrdp.2017.74.
- Martino, M., Jones, L., Brighton, B., Ehre, C., Abdulah, L., Davis, C., ... Ribeiro, C. (2013). The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunology*, 6(3), 639–654. <http://doi.org/10.1038/mi.2012.105>
- Matsumoto, H., Miyazaki, S., Matsuyama, S., Takeda, M., Kawano, M., Nakagawa, H., ... Matsuo, S. (2013). Selection of autophagy or apoptosis in cells exposed to ER-stress depends on ATF4 expression pattern with or without CHOP expression. *Biology Open*, 2(10), 1084–1090. <http://doi.org/10.1242/bio.20135033>
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., ... Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology*, 190(4), 511–521. <http://doi.org/10.1083/jcb.200911141>.
- Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S.(2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends Biochem Sci.* May;39(5):245-54. doi: 10.1016/j.tibs.2014.02.008.
- Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 20:1-21. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314.
- McEwan, D. G., & Dikic, I. (2011). The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation. *Trends in Cell Biology*, 21(4), 195–201. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.12.006>
- McLaughlin, T., Falkowski, M., Park, J. W., Keegan, S., Elliott, M., Wang, J. J., & Zhang, S. X. (2018). Loss of XBP1 accelerates age-related decline in retinal function and neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 13, 16. <http://doi.org/10.1186/s13024-018-0250-z>

- Meiners S1, Eickelberg O2, Königshoff M2. (2015). Hallmarks of the ageing lung. *Eur Respir J.*;45(3):807-27. doi: 10.1183/09031936.00186914.
- Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, et al. (2003). Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science*. 301(5638):1387-91.
- Meléndez, A., & Neufeld, T. P. (2008). The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development (Cambridge, England)*, 135(14), 2347–2360. <http://doi.org/10.1242/dev.016105>.
- Minagawa, S., Araya, J., Numata, T., Nojiri, S., Hara, H., Yumino, Y., ... Kuwano, K. (2011). Accelerated epithelial cell senescence in IPF and the inhibitory role of SIRT6 in TGF- β -induced senescence of human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 300(3), L391–L401. <http://doi.org/10.1152/ajplung.00097.2010>.
- Minakshi, R., Rahman, S., Jan, A. T., Archana, A., & Kim, J. (2017). Implications of aging and the endoplasmic reticulum unfolded protein response on the molecular modality of breast cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(11), e389–. <http://doi.org/10.1038/emm.2017.215>
- Mizushima N, Komatsu M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- Mizushima N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev*. Nov 15;21(22):2861-73. DOI: 10.1101/gad.1599207
- Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y, Nakatogawa H. (2015). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature*.;522(7556):359-62. doi: 10.1038/nature14506.
- Mora, A. L., Bueno, M., & Rojas, M. (2017). Mitochondria in the spotlight of aging and idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 405–414. <http://doi.org/10.1172/JCI87440>
- Mulugeta, S., Nguyen, V., Russo, S. J., Muniswamy, M., & Beers, M. F. (2005). A Surfactant Protein C Precursor Protein BRICHOS Domain Mutation Causes Endoplasmic Reticulum Stress, Proteasome Dysfunction, and Caspase 3 Activation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 32(6), 521–530. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2005-0009OC>
- Naidoo N1, Giang W, Galante RJ, Pack AI. (2005). Sleep deprivation induces the unfolded protein response in mouse cerebral cortex. *J Neurochem*.;92(5):1150-7. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02952.x
- Naidoo, N., Davis, J. G., Zhu, J., Yabumoto, M., Singletary, K., Brown, M., ... Baur, J. A. (2014). Aging and sleep deprivation induce the unfolded protein response in the pancreas: implications for metabolism. *Aging Cell*, 13(1), 131–141. <http://doi.org/10.1111/accel.12158>
- Naidoo, N., Ferber, M., Master, M., Zhu, Y., & Pack, A. I. (2008). Aging impairs the unfolded protein response to sleep deprivation and leads to pro-apoptotic signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(26), 6539–6548. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5685-07.2008>
- Nair U, Yen WL, Mari M., et al. (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 1; 8(5):780-93.
- Nakamura S, Yoshimori T. (2017). New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*.130(7):1209-1216. doi: 10.1242/jcs.196352.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*. 13; 130(1):165-78.
- Nakatogawa H, Ishii J, Asai E, Ohsumi Y. (2012). Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy*. 1; 8(2):177-86.

- Nakatogawa H. (2013). Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem.*;55:39-50. doi: 10.1042/bse0550039.
- Nalysnyk L1, Cid-Ruzafa J, Rotella P, Esser D. (2012). Incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis: review of the literature. *Eur Respir Rev.*;21(126):355-61. doi: 10.1183/09059180.00002512.
- Nho, R. S., & Hergert, P. (2014). IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-induced cell death by suppressing low autophagy via aberrant Akt/mTOR kinases. *PLoS one*, 9(4), e94616. doi:10.1371/journal.pone.0094616
- Noda NN1, Ohsumi Y, Inagaki F. (2010). Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett.*;584(7):1379-85. doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.018.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., ... Imaizumi, K. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress . *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9220–9231. <http://doi.org/10.1128/MCB.01453-06>
- Olivares, S., & Henkel, A. S. (2015). Hepatic Xbp1 Gene Deletion Promotes Endoplasmic Reticulum Stress-induced Liver Injury and Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 30142–30151. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.676239>
- Olzmann, J. A., Kopito, R. R., & Christianson, J. C. (2013). The Mammalian Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), 10.1101/cshperspect.a013185 a013185. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a013185>
- Oyadomari S1, Mori M. (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* Apr;11(4):381-9. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401373.
- Pardo A, Selman M. (2016). Lung Fibroblasts, Aging, and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann Am Thorac Soc.* 5:S417-S421. doi: 10.1513/AnnalsATS.201605-341AW.
- Park JS1, Oh SY2, Lee DH1,3, Lee YS1, Sung SH1, Ji HW1, Lee MJ1, Lee YH4, Rhee SG1, Bae SH1. (2016). p62/SQSTM1 is required for the protection against endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic cell death. *Free Radic Res.* 50(12):1408-1421.
- Patel, A. S., Lin, L., Geyer, A., Haspel, J. A., An, C. H., Cao, J., ... Morse, D. (2012). Autophagy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *PLoS ONE*, 7(7), e41394. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0041394>
- Peljto, A. L., Selman, M., Kim, D. S., Murphy, E., Tucker, L., Pardo, A., ... Fingerlin, T. E. (2015). The MUC5B Promoter Polymorphism Is Associated With Idiopathic Pulmonary Fibrosis in a Mexican Cohort but Is Rare Among Asian Ancestries. *Chest*, 147(2), 460–464. <http://doi.org/10.1378/chest.14-0867>
- Pengo N1, Scolari M, Oliva L, Milan E, Mainoldi F, Raimondi A, Fagioli C, Merlini A, Mariani E, Pasqualetto E, Orfanelli U, Ponzoni M, Sitia R, Casola S, Cenci S. (2013). Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production. *Nat Immunol.* 14(3):298-305. doi: 10.1038/ni.2524.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., ... Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), 2190–2199. <http://doi.org/10.1172/JCI33585>
- Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., & Walter, P. (2010). BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. *PLoS Biology*, 8(7), e1000415. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000415>
- Pluquet O1, Pourtier A2, Abbadie C2. (2015). The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.*;308(6):C415-25. doi: 10.1152/ajpcell.00334.2014.
- Povedano JM, Martinez P, Flores JM2, Mulero F3, Blasco MA4. (2015) Mice with Pulmonary Fibrosis Driven by Telomere Dysfunction. *Cell Rep.*;12(2):286-99. doi: 10.1016/j.celrep.2015.06.028.

- Pyo JO, Yoo SM, Ahn HH, et al. (2013). Overexpression of Atg5 in mice activates autophagy and extends lifespan. *Nat Commun.* 4:2300.
- Qiao, S., Dennis, M., Song, X., Vadysirisack, D. D., Salunke, D., Nash, Z., ... Ellisen, L. W. (2015). A REDD1/TXNIP pro-oxidant complex regulates ATG4B activity to control stress-induced autophagy and sustain exercise capacity. *Nature Communications*, 6, 7014. <http://doi.org/10.1038/ncomms8014>
- Qin L1, Wang Z, Tao L, Wang Y. (2010) ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy*.6(2):239-47.
- Ramesh Babu J1, Lamar Seibenhener M, Peng J, Strom AL, Kemppainen R, Cox N, Zhu H, Wooten MC, Diaz-Meco MT, Moscat J, Wooten MW. (2008). Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. *J Neurochem*;106(1):107-20. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05340.x.
- Rana, T., Shinde, V. M., Starr, C. R., Kruglov, A. A., Boitet, E. R., Kotla, P., ... Gorbatyuk, M. S. (2014). An activated unfolded protein response promotes retinal degeneration and triggers an inflammatory response in the mouse retina. *Cell Death & Disease*, 5(12), e1578-. <http://doi.org/10.1038/cddis.2014.539>
- Rashid, H.-O., Yadav, R. K., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2015). ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 11(11), 1956–1977. <http://doi.org/10.1080/15548627.2015.1091141>
- Sahani, M. H., Itakura, E., & Mizushima, N. (2014). Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*, 10(3), 431–441. <http://doi.org/10.4161/auto.27344>
- Romero Y, Bueno M, Ramirez R, Álvarez D, Sembrat JC, Goncharova EA, Rojas M, Selman M, Mora AL, Pardo A. (2016). mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell*. 15(6):1103-1112. doi: 10.1111/accel.12514.
- Sadighi Akha, A. A., Harper, J. M., Salmon, A. B., Schroeder, B. A., Tyra, H. M., Rutkowski, D. T., & Miller, R. A. (2011). Heightened Induction of Proapoptotic Signals in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Primary Fibroblasts from a Mouse Model of Longevity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30344–30351. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.220541>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)*, 4(3), 166–175.
- Salmon, A. B., Akha, A. A. S., Buffenstein, R., & Miller, R. A. (2008). Fibroblasts from Naked Mole-Rats Are Resistant to Multiple Forms of Cell Injury, But Sensitive to Peroxide, UV Light, and ER Stress. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(3), 232–241.
- Satoo, K., Noda, N. N., Kumeta, H., Fujioka, Y., Mizushima, N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2009). The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *The EMBO Journal*, 28(9), 1341–1350. <http://doi.org/10.1038/emboj.2009.80>
- Schaaf MB, Keulers TG, Vooijs MA, Rouschop KM. (2016). LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.* 30(12):3961-3978. DOI: 10.1096/fj.201600698R
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, 26(7), 1749–1760. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>
- Schneider, J. L., Suh, Y., & Cuervo, A. M. (2014). Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metabolism*, 20(3), 417–432. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.009>
- Schneider, J. L., Villarroya, J., Diaz-Carretero, A., Patel, B., Urbanska, A. M., Thi, M. M., ... Cuervo, A. M. (2015). Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell*, 14(2), 249–264. <http://doi.org/10.1111/accel.12310>

- Schuck, S., Gallagher, C. M., & Walter, P. (2014). ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *Journal of Cell Science*, 127(18), 4078–4088. <http://doi.org/10.1242/jcs.154716>
- Seibold, M. A., Wise, A. L., Speer, M. C., Steele, M. P., Brown, K. K., Loyd, J. E., ... Schwartz, D. A. (2011). A Common MUC5B Promoter Polymorphism and Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal of Medicine*, 364(16), 1503–1512. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1013660>
- Selman, M., & Pardo, A. (2002). Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respiratory Research*, 3(1), 3. <http://doi.org/10.1186/rr175>
- Selman M, Buendía-Roldán I, Pardo A. (2016). Aging and Pulmonary Fibrosis. *Rev Invest Clin*. Mar-Apr;68(2):75-83.
- Selman M, Pardo A. (2006). Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*.;3(4):364-72. DOI: 10.1513/pats.200601-003TK
- Selman M, López-Otín C, Pardo A. (2016). Age-driven developmental drift in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*.;48(2):538-52. doi: 10.1183/13993003.00398-2016.
- Selman M, Rojas M, Mora AL, Pardo A. (2010). Aging and interstitial lung diseases: unraveling an old forgotten player in the pathogenesis of lung fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 31(5):607-17. doi: 10.1055/s-0030-1265901.
- Selman M, Pardo A. (2014). Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med*. 189(10):1161-72. doi: 10.1164/rccm.201312-2221PP.
- Schmitz, M. L., Shaban, M. S., Albert, B. V., Gökçen, A., & Kracht, M. (2018). The Crosstalk of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Pathways with NF-κB: Complex Mechanisms Relevant for Cancer, Inflammation and Infection. *Biomedicines*, 6(2), 58. <http://doi.org/10.3390/biomedicines6020058>
- Shen, J., Snapp, E. L., Lippincott-Schwartz, J., & Prywes, R. (2005). Stable Binding of ATF6 to BiP in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Molecular and Cellular Biology*, 25(3), 921–932. <http://doi.org/10.1128/MCB.25.3.921-932.2005>
- Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, et al. (2012). Activation of Autophagy by Inflammatory Signals Limits IL-1β Production by Targeting Ubiquitinated Inflammasomes for Destruction. *Nature immunology*. 13(3):255-263.
- Skytte Rasmussen, M., Mouilleron, S., Kumar Shrestha, B., Wirth, M., Lee, R., Bowitz Larsen, K., ... Johansen, T. (2017). ATG4B contains a C-terminal LIR motif important for binding and efficient cleavage of mammalian orthologs of yeast Atg8. *Autophagy*, 13(5), 834–853. <http://doi.org/10.1080/15548627.2017.1287651>.
- Slobodkin MR, Elazar Z. (2013). The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*. 55:51-64.
- Snetselaar, R., van Batenburg, A. A., van Oosterhout, M. F. M., Kazemier, K. M., Roothaan, S. M., Peeters, T., ... van Moorsel, C. H. M. (2017). Short telomere length in IPF lung associates with fibrotic lesions and predicts survival. *PLoS ONE*, 12(12), e0189467. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0189467>
- Song, Y., Shen, H., Du, W., & Goldstein, D. R. (2013). Inhibition of x-box binding protein 1 reduces tunicamycin-induced apoptosis in aged murine macrophages. *Aging Cell*, 12(5), 794–801. <http://doi.org/10.1111/ace1.12105>
- Sriburi, R., Jackowski, S., Mori, K., & Brewer, J. W. (2004). XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology*, 167(1), 35–41. <http://doi.org/10.1083/jcb.200406136>
- Stranks AJ, Hansen AL, Panse I, et al. (2015). Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun*. 7(4):375-91.

- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y., et al. (2004). The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8. *Genes Cells*. 9(7):611-8.
- Sugawara K, Suzuki NN, Fujioka Y., et al. (2005). Structural basis for the specificity and catalysis of human Atg4B responsible for mammalian autophagy. *J Biol Chem*. 2; 280(48):40058-65.
- Sun, S.-C. (2017). The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(9), 545–558. <http://doi.org/10.1038/nri.2017.52>
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*, 13(3), 184–190. <http://doi.org/10.1038/ncb0311-184>
- Tam, A. B., Mercado, E. L., Hoffmann, A., & Niwa, M. (2012). ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. *PLoS ONE*, 7(10), e45078. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0045078>
- Tam, A. B., Koong, A. C., & Niwa, M. (2014). Ire1 Has Distinct Catalytic Mechanisms for XBP1/HAC1 Splicing and RIDD. *Cell Reports*, 9(3), 850–858. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.016>
- Tanaka Y, Ishitsuka Y, Hayasaka M1, Yamada Y1, Miyata K3, Endo M3, Kondo Y1, Moriuchi H4, Irikura M5, Tanaka K6, Mizushima T6, Oike Y3, Irie T7. (2015). The exacerbating roles of CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the preventive effects of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) against pulmonary fibrosis in mice. *Pharmacol Res*. 99:52-62. doi: 10.1016/j.phrs.2015.05.004.
- Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 36(12):2503-18.DOI: 10.1016/j.biocel.2004.05.009
- Tanida I1, Sou YS, 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. *J Biol Chem*.;279(35):36268-76. DOI: 10.1074/jbc.M401461200
- Tanjore, H., Cheng, D.-S., Degryse, A. L., Zoz, D. F., Abdolrasulnia, R., Lawson, W. E., & Blackwell, T. S. (2011). Alveolar Epithelial Cells Undergo Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(35), 30972–30980. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.181164>
- Tanjore, H., Lawson, W. E., & Blackwell, T. S. (2013). Endoplasmic reticulum stress as a pro-fibrotic stimulus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832(7), 940–947. <http://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.011>
- Teckman JH1, Perlmutter DH. (2000). Retention of mutant alpha(1)-antitrypsin Z in endoplasmic reticulum is associated with an autophagic response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.;279(5):G961-74. DOI: 10.1152/ajpgi.2000.279.5.G961
- Thannickal, V. J., & Horowitz, J. C. (2006). Evolving Concepts of Apoptosis in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(4), 350–356. <http://doi.org/10.1513/pats.200601-001TK>
- Thomas AQ1, Lane K, Phillips J 3rd, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J, Roberts R, Haines J, Stahlman M, Loyd JE. (2002). Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med*.;165(9):1322-8. DOI: 10.1164/rccm.200112-123OC
- Till, A., & Subramani, S. (2010). A balancing act for autophagin. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(7), 2273–2276. <http://doi.org/10.1172/JCI43238>
- Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, Ono A, Ohara J, Baba T, Murata S, Tanaka K, Kasahara M. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am J Pathol*. Mar;180(3):963-72. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.11.012.

- Tooze SA, Yoshimori T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol.*12(9):831-5. doi: 10.1038/ncb0910-831.
- Torres C, Lewis L, Cristofalo VJ. (2006). Proteasome inhibitors shorten replicative life span and induce a senescent-like phenotype of human fibroblasts. *J Cell Physiol.* 207(3):845-53.
- Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N. (2016). The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science.* Nov 25;354(6315):1036-1041.
- Tumbarello, D. A., Waxse, B. J., Arden, S. D., Bright, N. A., Kendrick-Jones, J., & Buss, F. (2012). Autophagy-receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nature Cell Biology*, 14(10), 1024–1035. <http://doi.org/10.1038/ncb2589>
- Uemura A1, Oku M, Mori K, Yoshida H. (2009). Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response. *J Cell Sci.* Aug 15;122(Pt 16):2877-86. doi: 10.1242/jcs.040584.
- Urban ML, Manenti L, Vaglio A. (2015). Fibrosis--A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med.* ;373(1):95-6. doi: 10.1056/NEJMc1504848.
- Varadarajan, S., Bampton, E. T. W., Smalley, J. L., Tanaka, K., Caves, R. E., Butterworth, M., ... Cohen, G. M. (2012). A novel cellular stress response characterised by a rapid reorganisation of membranes of the endoplasmic reticulum. *Cell Death and Differentiation*, 19(12), 1896–1907. <http://doi.org/10.1038/cdd.2012.108>
- Voeltz, G. K., Rolls, M. M., & Rapoport, T. A. (2002). Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports*, 3(10), 944–950. <http://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf202>.
- Walter P, Ron D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science.*334(6059):1081-6. doi: 10.1126/science.1209038.
- Wang P, Li J, Tao J, Sha B. (2018). The luminal domain of the ER stress sensor protein PERK binds misfolded proteins and thereby triggers PERK oligomerization. *J Biol Chem.*;293(11):4110-4121. doi: 10.1074/jbc.RA117.001294. Epub 2018 Jan 31.
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., & Lee, A. S. (2009). Role of the Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP in Development, Cancer, and Neurological Disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(9), 2307–2316. <http://doi.org/10.1089/ars.2009.2485>
- Wang Y, Li Y, Wei F, Duan Y. (2017). Optical Imaging Paves the Way for Autophagy Research. *Trends Biotechnol.* 35(12):1181-1193. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.08.006.
- Willy, J. A., Young, S. K., Stevens, J. L., Masuoka, H. C., & Wek, R. C. (2015). CHOP links endoplasmic reticulum stress to NF-κB activation in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Molecular Biology of the Cell*, 26(12), 2190–2204. <http://doi.org/10.1091/mbc.E15-01-0036>
- Wu F, Li Y, Wang F, Noda NN, Zhang H. (2012). Differential function of the two Atg4 homologues in the aggrephagy pathway in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem.* 24; 287(35):29457-67.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2656–2664. <http://doi.org/10.1172/JCI26373>
- Yang, L., Li, P., Fu, S., Calay, E. S., & Hotamisligil, G. S. (2010). Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 11(6), 467–478. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.005>
- Yang, H.-C., & Fogo, A. B. (2014). Fibrosis and renal aging. *Kidney International Supplements*, 4(1), 75–78. <http://doi.org/10.1038/kisup.2014.14>

- Yang, I. V., Pedersen, B. S., Rabinovich, E., Hennessy, C. E., Davidson, E. J., Murphy, E., ... Schwartz, D. A. (2014). Relationship of DNA Methylation and Gene Expression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(11), 1263–1272. <http://doi.org/10.1164/rccm.201408-1452OC>
- Yang, Z., Wilkie-Grantham, R. P., Yanagi, T., Shu, C.-W., Matsuzawa, S., & Reed, J. C. (2015). ATG4B (Autophagin-1) Phosphorylation Modulates Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26549–26561. <http://doi.org/10.1074/jbc.M115.658088>
- Yao, Y., Wang, Y., Zhang, Z., He, L., Zhu, J., Zhang, M., ... Xu, Y. (2016). Chop Deficiency Protects Mice Against Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis by Attenuating M2 Macrophage Production. *Molecular Therapy*, 24(5), 915–925. <http://doi.org/10.1038/mt.2016.36>
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell*. Dec;6(6):1355-64.
- Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 5(8):1180-5.
- Yoshida H1, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*.107(7):881-91.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of Cell Biology*, 172(4), 565–575. <http://doi.org/10.1083/jcb.200508145>
- Yu ZQ, Ni T, Hong B., et al. (2012). Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy*. 8(6):883-92.
- Zhong, Q., Zhou, B., Ann, D. K., Mino, P., Liu, Y., Banfalvi, A., ... Borok, Z. (2011). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Epithelial–Mesenchymal Transition of Alveolar Epithelial Cells: Effects of Misfolded Surfactant Protein. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(3), 498–509. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2010-0347OC>