



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**RESPUESTAS DE ESTRÉS ANTE LA AUSENCIA/REINTRODUCCIÓN DE
GLUCOSA Y SU FUNCIÓN EN LA SOBREVIVENCIA NEURONAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. CRISTIAN GERÓNIMO OLVERA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN
Instituto de Fisiología Celular
DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ
Instituto de Biotecnología

Ciudad de México. enero, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Financiamiento de proyectos IN204213 and IN205416 PAPIIT (UNAM) y CB239607 CONACYT

Financiamiento para la asistencia a congresos nacionales e internacionales Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)

Apoyo de beca del Estímulo a la Investigación Médica, 2017 de la Fundación Miguel Alemán Valdéz

Apoyo económico de Ayudante de investigador (Exp. 7169) de la Dra. Lourdes Massieu Trigo (Exp. 12630)

Se agradece ampliamente la asesoría técnica que me brindó la Bióloga Teresa Montiel Montes para la realización de este trabajo.

Organización de la Tesis

La presente tesis comprende las siguientes secciones:

I. Introducción. Comprende una breve descripción de la principal patología asociada a la falta de glucosa en el cerebro, así como los mecanismos celulares y moleculares asociados al daño neuronal hipoglucémico. Posteriormente se presentan 2 secciones: 1) comprende la descripción de mecanismo de autofagia, su asociación con otros mecanismos y su función en la sobrevivencia celular. 2) comprende la descripción de la respuesta a proteínas mal plegadas, su interacción con la autofagia y su función en la sobrevivencia neuronal.

II. Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

III. Metodología. Se describen los fundamentos, pasos y técnicas a seguir para dar respuesta a las preguntas planteadas en la tesis.

IV Resultados. Comprende dos secciones:

Sección I. Descripción de la dinámica de la autofagia en respuesta a la AG/RG y su función en la sobrevivencia neuronal

Sección II. Descripción de la dinámica de la UPR en respuesta a la AG/RG, su función en la sobrevivencia neuronal y su interacción con la autofagia.

VI. Discusión global de los resultados obtenidos en el trabajo de tesis y una conclusión general.

VII. Artículo publicado con los resultados que corresponden a la sección I.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1.0 Autofagia	9
1.1 Mecanismo de la autofagia	10
1.2 Autofagia y la sobrevivencia celular.....	11
1.3 Interacción entre la autofagia y la apoptosis.....	13
2.0 El estrés reticular y la UPR	14
2.1 Estrés reticular, UPR y apoptosis	16
2.2 Autofagia y su relación con el estrés reticular	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
HIPÓTESIS	20
OBJETIVO	20
OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
METODOLOGÍA	21
1. Cultivo Neuronal	21
2. Tratamientos	21
3. Inmunodetección (Western blot).....	22
4. Inmunocitoquímica.....	22
5. Viabilidad Celular.....	23
5.1 MTT.....	23
5.2 Liberación de LDH	23
5.3 Ensayo de muerte/vida	23
6. Monitoreo de células positivas a Anexina V	24
7. Formación de autofagosomas en células vivas	24
8. Silenciamiento de Atg7	24
9. Tinción de Lysotracker	25
10. Ensayo de integridad de la membrana lisosomal (Naranja de acridina).....	25
RESULTADOS.....	26
Sección I.....	26
I. La AG/RG induce la formación de autofagosomas	26
I.II La autofagia participa en la muerte neuronal inducida por la AG/RG	31
I.III La actividad de la calpaína durante la RG induce la disfunción autofágica y contribuye a la muerte neuronal.	31
Sección II.....	36
II. La UPR se activa rápidamente en respuesta a la AG	36
II.I Estrés reticular y la muerte neuronal apoptótica.....	38
II.II La activación de la autofagia tardía es dependiente de la vía de IRE1	40
DISCUSIÓN.....	42
REFERENCIAS.....	49

ABREVIATURAS

AG ausencia de glucosa

RG reintroducción de glucosa

ROS especies reactivas de oxígeno

UPR respuesta a proteínas mal plegadas

RE retículo endoplásmico

LDH lactato deshidrogenasa

LMP permeabilidad de la membrana lisosomal

CTSB catepsina B

MTT bromuro 3-(4, 5-dimitiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio

NMDA N-metil-D-aspartato

PARP-1 Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1

LAMP2a proteína asociada a la membrana lisosomal 2

CMA autofagia mediada por chaperonas

mTOR blanco de rapamicina de células de mamífero

ULK1 cinasa activadora de autofagia de tipo unc-51

BECN1 beclina 1

FIP200 proteína de 200 kDA relacionada a las cinasas de la familia FAK

PI3K fosfatidil inositol 3 cinasa

VPS34 proteínas de clasificación vacuolar 34

LC3 proteína de asociación a microtúbulos de cadena ligera 3

ATG genes relacionados a la autofagia

Rab7 proteína relacionada a Ras 7

P62/SQSTM1 sequestrosoma 1

3-MA 3-metil adenina

BCL2 proteína de linfoma 2 de células B

Hsp70.1 proteína de choque térmico 70.1

DRAM1 modulador 1 de autofagia regulado en respuesta al daño a ADN

BAX proteína X asociada a Bcl-2

BID proteína BH3 de tipo Bax
PERK cinasa del RE de tipo proteína cinasa RNA
ATF6 factor de transcripción activador 6
IRE1 cinasa dependiente e inositol 1
GRP78 proteína regulada por glucosa de 78 kDa
eIF2 subunidad alfa de factor 2 de iniciación eucariótico
CHOP proteína homologa de C/EBP
XBP1 proteína 1 de unión a la caja X
TRAF2 factor 2 asociado al receptor de necrosis tumoral α
ASK1 cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis
JNK cinasas C-jun N terminal
Bcl-xL proteína extra larga de linfoma de célula B
Bim proteína 11 de tipo Bcl-2
BAK antagonista homologo de Bcl-2
ERO1 retículo endoplásmico oxigenasa
DAPK1 proteína cinasa asociada a la muerte 1
CQ cloroquina (inhibidor de la degradación autofágica)

RESUMEN

En respuesta al estrés energético las células activan diversos mecanismos adaptativos para mantener o restablecer la homeostasis celular entre los que se encuentran la autofagia y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). En el sistema nervioso, la disfunción en la autofagia y la activación crónica de la UPR están implicadas en las enfermedades neurodegenerativas y en el daño isquémico. Sin embargo, su participación en el daño hipoglucémico no se conoce del todo y la interacción entre ambas vías no ha sido estudiada bajo estas condiciones. En el presente trabajo analizamos la dinámica de activación de la autofagia y de la UPR, siguiendo mediante inmunoblot los niveles de proteínas relacionadas con cada mecanismo a lo largo de la ausencia de glucosa (AG) y reintroducción de glucosa (RG). Asimismo, investigamos la interacción entre la autofagia y la UPR, y su función en la supervivencia neuronal. De acuerdo con los resultados, la AG induce una deficiencia en el flujo autofágico, el cual es restablecido cuando la glucosa se reintroduce. Durante la RG las neuronas mueren progresivamente por apoptosis correlacionando con el incremento en la actividad de la calpaína, que resulta en la disfunción lisosomal a través del corte de la proteína LAMP2. Por tanto la inhibición de la calpaína previene la disfunción lisosomal, la salida de la catepsina B y la muerte neuronal. Por otra parte, la activación temprana de las vías PERK e IRE1 de la UPR en respuesta a la AG, cumplen una función adaptativa, ya que al inhibirse disminuyen la supervivencia. Sin embargo la activación crónica de estas vías durante la RG contribuye al daño neuronal y al inhibirse aumenta la supervivencia. La vía de PERK interrumpe el flujo autofágico provocando la acumulación de autofagosomas, mientras que la vía de IRE1, a través de la activación de JNK, induce la formación de autofagosomas en las etapas tardías de la RG.

ABSTRACT

In response to energy stress cells activate several adaptive mechanisms, including autophagy and the unfolded protein response (UPR) to maintain or reestablish cellular homeostasis. In the central nervous system, autophagy dysfunction and the chronic activation of the UPR have been implicated both in neurodegenerative diseases and ischemic damage. However, their role in the hypoglycemic damage is not completely understood and the crosstalk between autophagy and the UPR has not been explored. In the present study, we have analyzed the dynamics of autophagy and the UPR following the levels of proteins related with autophagy or UPR along glucose deprivation (GD) and glucose reintroduction (GR). Moreover, we have explored the interplay between the autophagy and the UPR and their role in neuronal survival. According to the results, GD induced the impairment of the autophagy flux, which was reestablished upon GR. During GR, neurons progressively died by apoptosis, which correlated with lysosome dysfunction and LAMP2 cleavage mediated by calpain activation. Therefore, inhibition of calpain prevents lysosome dysfunction, cathepsin B release and the neuronal death. On the other hand, the early activation of the PERK and the IRE1 branches of the UPR in response to GD play a role as adaptive mechanisms, since their inhibition decreased neuronal survival. However, chronic activation of PERK and IRE1 during GR contribute to neuronal damage and their inhibition during this phase prevents neuronal death. PERK pathway activation disrupts the autophagy flux leading to autophagosome accumulation, while IRE1 activation through JNK activity induce the formation of autophagosome at late stages of GR.

INTRODUCCIÓN

El cerebro requiere del aporte continuo de oxígeno y glucosa de la circulación sanguínea para su buen funcionamiento (McKenna et al., 2006). La disminución de los niveles de glucosa sanguínea (hipoglucemia) pueden causar alteraciones en la función cerebral y conducir al daño neuronal (Cryer, 2007). La hipoglucemia resulta de la complicación en el tratamiento con insulina y la falla de la respuesta contra-reguladora simpato-adrenal en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 (Cryer, 2007). Así mismo, se considera a la hipoglucemia como un componente importante de la neuropatología isquémica producida por la presencia de un coágulo o un émbolo en alguna arteria cerebral o por un derrame cerebral.

La concentración de glucosa en plasma normalmente se encuentran entre 70-110 mg/dl (3.9-6.1 mmol/l). Cuando los niveles de glucosa disminuyen a 81 mg/dl (4.5 mmol/l) se activan defensas fisiológicas como el decremento en la secreción de insulina. Si la concentración de glucosa continúa bajando hasta 68 mg/dl (3.8 mmol/l) se incrementa la secreción de glucagón y adrenalina. La hipoglucemia moderada se presenta cuando la glucosa en plasma alcanza niveles menores a (60 mg/dl; 3.3 mmol/l). Durante este periodo se produce una respuesta más intensa que da lugar a síntomas que pueden ser de dos tipos: neurogénicos (sudor, mareos, náusea, temblores) provocados por la liberación de noradrenalina y adrenalina, y síntomas neuroglucopénicos causados por la ausencia de glucosa (AG) cerebral (debilidad, visión borrosa, confusión) que inducen a la ingesta de alimento. Finalmente, si las defensas tanto fisiológicas como conductuales no restablecen la caída de glucosa en plasma se puede presentar la hipoglucemia severa (<40mg/dl; 2.2 mmol/l) (Cryer, 2007).

Episodios prolongados de hipoglucemia severa que llevan al estado de coma causan falla cerebral y muerte neuronal irreversible (Cryer, 2007). Tras 30-60 minutos de hipoglucemia severa con coma, el cerebro sufre daño principalmente en áreas vulnerables como la corteza, el hipocampo y el estriado, mientras que otras áreas como el tallo cerebral y el cerebelo son menos vulnerables (Auer et al., 1985). No obstante, se ha demostrado que episodios prolongados de hipoglucemia severa en ausencia de coma causan

daño celular, aunque limitado, en la corteza cerebral (Tkacs et al., 2005; Ennis et al., 2008; Haces et al. 2010).

La excitotoxicidad inducida por la liberación de aminoácidos excitadores y la activación de receptores de glutamato es el mecanismo iniciador del daño hipoglucémico (Wieloch, 1985). El tratamiento con antagonistas del receptor de glutamato de tipo NMDA reduce significativamente el daño producido por el coma hipoglucémico (Wieloch, 1985). En condiciones de AG (hipoglucemia) o de inhibición de la oxidación de la glucosa (inhibición de la glicólisis) la entrada de calcio extracelular y la liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares participan en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hernández-Fonseca & Massieu 2005, 2008; Páramo et al. 2010). Diversos sistemas productores de ROS se activan produciendo daño a componentes celulares, entre los que se encuentran la mitocondria y enzimas pro-oxidantes como la xantina oxidasa, la lipooxigenasa y la NADPH oxidasa (Páramo et al., 2010). Por otra parte, se conoce que la presencia de ROS favorece la activación de la calpaína, una proteasa dependiente de calcio, que se considera como un importante ejecutor de la muerte producida por excitotoxicidad (Páramo et al., 2013). Asimismo, durante la privación de glucosa se propicia el estrés reticular, particularmente la activación de la vía de la cinasa PERK de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), la cual precede la activación de la caspasa 12 (García de la Cadena et al., 2014). A pesar del gran número de procesos que son iniciados durante la AG, la muerte neuronal no resulta necesariamente de la falla energética inicial, si no de la secuencia de eventos iniciados durante este periodo y que prosiguen durante la reintroducción de glucosa (RG) (Suh et al., 2007).

Cuando la concentración de glucosa en sangre se restablece, la actividad cerebral se normaliza y los niveles extracelulares de aspartato y glutamato disminuyen (Sandberg et al., 1986). Sin embargo, el daño celular continua durante la fase de reintroducción de glucosa atribuyéndose a la excesiva generación de ROS, de especies reactivas de nitrógeno, a la disminución de glutatión reducido y a la activación de la PARP-1, los cuales contribuyen de manera importante a la muerte neuronal hipoglucémica (Suh et al., 2003; 2004; Kim et al., 1999). Es más, los niveles de ROS y el grado de muerte neuronal

dependen de la concentración de glucosa alcanzada durante el periodo de reperfusión (Suh et al., 2007). Entre mayor sean los niveles de glucosa alcanzados en sangre, mayor muerte neuronal se producirá.

En respuesta al estrés energético y a la excitotoxicidad, la célula cuenta con diversos mecanismos que le ayudan a mantener o restaurar la homeostasis celular y finalmente sobrevivir. Dentro de estas respuestas se encuentran la autofagia y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), encargadas de mantener la proteostasis, eliminar componentes celulares dañados y evitar la acumulación de agregados.

1.0 Autofagia

La autofagia es un mecanismo catabólico intracelular mediado por los lisosomas, responsable de la degradación o reciclamiento de componentes citoplasmáticos, proteínas u organelos dañados y disfuncionales (Mizushima and Komatsu 2011). Dependiendo de cómo se incorporan los componentes citoplasmáticos hacia los lisosomas, se han caracterizado 3 tipos de autofagia: micro-autofagia, autofagia mediada por chaperonas (CMA) y macro-autofagia.

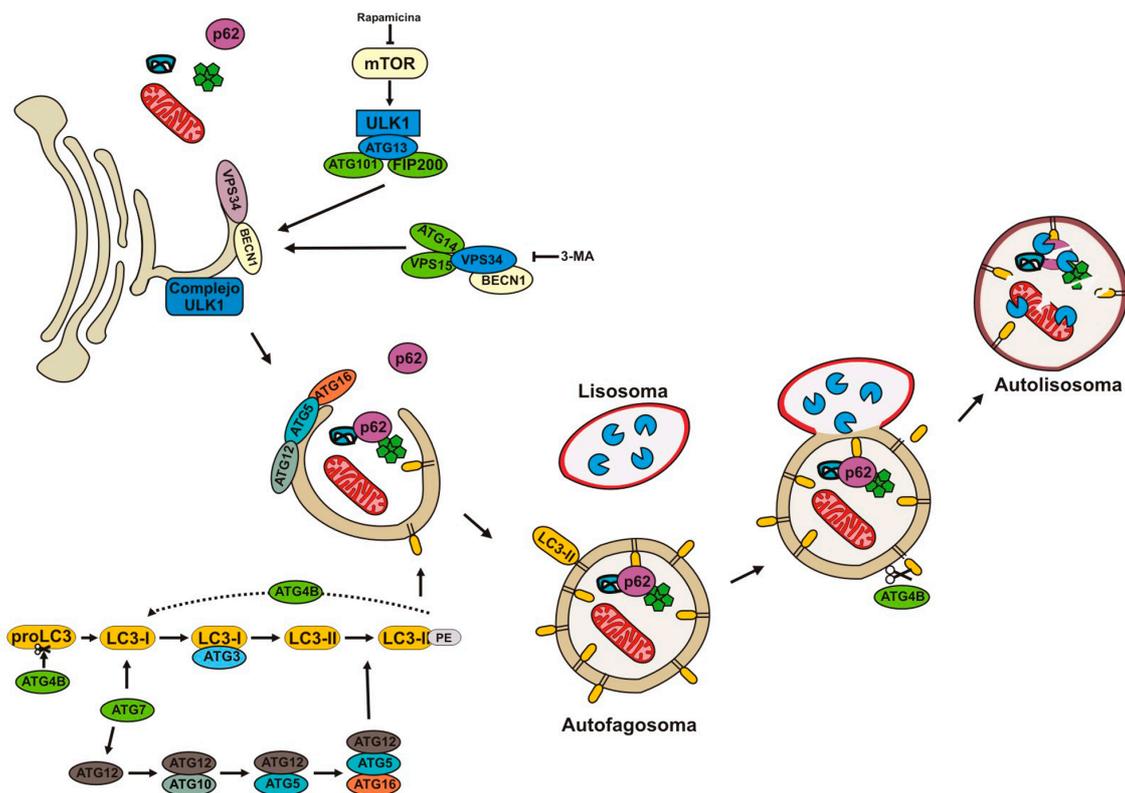
La macro-autofagia (referida comúnmente como autofagia): Se caracteriza por la captura de los componentes del citoplasma en vesículas de doble o multi-membrana, denominadas autofagosomas, que finalmente se fusionarán con los lisosomas para formar autolisosomas donde el contenido se degrada por proteasas lisosomales (Klionsky et al., 2016). La micro-autofagia involucra la captura de pequeñas porciones del citoplasma a través de invaginaciones de la membrana del lisosoma (Li et al., 2012). Por otra parte, en la CMA las proteínas blanco se etiquetan y redirigen hacia el lisosoma donde se translocan a través de la membrana lisosomal por medio de la proteína LAMP2a (Cuervo 2010)

Diversos estímulos extracelulares e intracelulares son capaces de inducir la autofagia, la cual representa un mecanismo de adaptación ante condiciones de estrés, principalmente la falta de nutrientes. Sin embargo, la autofagia ocurre a niveles basales en todos los tipos celulares manteniendo la homeostasis

celular, proteostasis y balance energético (Ravikumar et al., 2010; Tanida, 2011).

1.1 Mecanismo de la autofagia

Un gran número de complejos proteicos están involucrados en la regulación de la autofagia. Bajo condiciones normales mTORC1 inhibe la autofagia, sin embargo en condiciones de estrés o falta de nutrientes mTORC1 es inactivado permitiendo la formación de complejo ULK1, compuesto por ULK1, ATG13, FIP200 y ATG101. La activación de ULK1 propicia la formación del fagóforo y el reclutamiento del complejo PI3K clase III, formado por VPS34, BECN-1, ATG14 y VPS15 (Rubinztein et al., 2012) (Esquema 1).



Esquema 1: En el mecanismo de autofagia participan un gran número de complejos proteicos para la formación del autofagosoma el cual captura el contenido citosólico. Finalmente el autofagosoma se fusiona con el lisosoma formando el autolisosoma. En el autolisosoma las enzimas catalíticas degradan el contenido citosólico para proveer a la célula de componentes esenciales y energía.

La formación del autofagosoma se regula por dos series de reacciones de tipo ubiquitinación iniciadas por la enzima activadora de ubiquitina E1, ATG7. En la primera, el complejo ATG12-ATG5-ATG16 se recluta en la membrana de aislamiento (membrana que dará lugar al fagóforo y finalmente al autofagosoma) propiciando su crecimiento para la captura de los componentes citoplasmáticos y se disocia cuando el autofagosoma está completamente formado (He & Klionsky, 2009; Ravikumar et al., 2010; Tanida, 2011). La segunda reacción de tipo ubiquitinación involucra la proteína LC3, la cual se proteolisa por ATG4B para producir la forma citosólica LC3-I. LC3-I se conjuga con fosfatidil etanolamina en su proceso dependiente de ATG7 y ATG3 para formar LC3-II, la cual se asocia a ambos lados del autofagosoma (Esquema 1).

Los autofagosomas se movilizan hacia los lisosomas a través del transporte dependiente de dineína, donde la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma, proceso dependiente de las proteínas LAMP-2 y Rab7. La degradación de la vesícula interna del autofagosoma y su contenido incluida LC3-II, es un proceso dependiente de hidrolasas lisosomales tales como la catepsina B, D y L. El contenido degradado del autolisosoma se libera hacia el citosol para la síntesis proteica y el mantenimiento de la homeostasis celular (He & Klionsky, 2009). El proceso de formación de los autofagosomas, su fusión con los lisosomas y degradación del contenido autolisosomal es conocido como flujo autofágico (Esquema 1).

El secuestro de los cargos citosólicos puede ser un proceso selectivo donde receptores o adaptadores son responsables de la selectividad reconociendo los cargos previamente etiquetados con señales de degradación. La proteína de unión a ubiquitina p62/SQSTM1 es el receptor autofágico mejor caracterizado y su degradación dentro del autofagosoma ha sido ampliamente utilizada como medida del flujo autofágico (Stolz et al., 2014).

1.2 Autofagia y la sobrevivencia celular

En células post-mitóticas como las neuronas la autofagia tiene una función crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la sobrevivencia neuronal. La importancia de su función como mecanismo de control de calidad, se evidencia en los modelos animales en los cuales genes esenciales de la autofagia fueron

suprimidos genéticamente. Ratones deficientes de *Atg5*, *Atg7* y FIP200, muestran déficit neurológico, conductual y neurodegeneración que resulta en la muerte temprana de los animales (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Liang et al., 2010).

Además de su función en el mantenimiento de la homeostasis, la autofagia actúa como una respuesta adaptativa que ejerce funciones citoprotectoras y anti-inflamatorias bajo condiciones de estrés. Por tanto, la inhibición farmacológica o genética de la autofagia disminuye la capacidad de las células para responder en contra del estrés, indicando que la respuesta adaptativa de la autofagia contribuye al restablecimiento de las condiciones fisiológicas. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, sobre todo de daño agudo (i.e. isquemia, TBI), el mecanismo de autofagia puede dar lugar a la muerte autofágica, ejerciendo una función citotóxica (Liu et al., 2013; Galluzi et al., 2016).

La función de la autofagia en la muerte celular ha sido controversial. En un principio un gran número de estudios correlativos asociaron el incremento de los marcadores de autofagia con la muerte celular, sin contar con evidencias contundentes de que la autofagia era la causa de la muerte celular ó que ésta estaba acompañada de un proceso de muerte como el apoptótico. Es así que la muerte por autofagia se define como aquella que resulta del incremento en el flujo autofágico y no por el incremento en los marcadores de autofagia, siendo independiente de la muerte apoptótica y que puede ser bloqueada por la inhibición farmacológica o genética de sus componentes (Liu and Levine 2015).

En distintos modelos *in vivo* o *in vitro* de isquemia se ha observado la activación de la autofagia, así como su función tanto citoprotectora como citotóxica (Adhami et al., 2006; Rami et al., 2008; Galluzi et al., 2016). En estos modelos su papel en la muerte se ha sugerido usando inhibidores de la autofagia como el 3-metil adenina (3-MA) ó el silenciamiento de genes que participan en la autofagia, los cuales se ha observado que previenen el daño (Wen et al., 2008; Carloni et al., 2008; Koike et al., 2008; Qin et al., 2008). Por el contrario su papel en la sobrevivencia se ha sugerido al observar que la inducción de la autofagia tiene un efecto de pre-condicionamiento isquémico que previene el daño (Sheng et al., 2010). La función en la sobrevivencia

neuronal parece depender del modelo, intensidad o duración del daño. Particularmente en el modelo de ausencia y reintroducción de glucosa (AG/RG), en células de neuroblastoma (neuro2a) se observó que la interrupción del flujo autofágico durante el periodo de RG propicia la muerte neuronal (Jang et al., 2013). No obstante, poco se conoce de la autofagia adaptativa en este modelo y en menor medida en respuesta a la hipoglucemia inducida in vivo. Se desconoce si ésta contribuye al daño neuronal hipoglucémico.

1.3 Interacción entre la autofagia y la apoptosis

Existe una compleja interacción entre la autofagia y la apoptosis. Diversos estudios han demostrado la participación de ambos mecanismos de manera simultánea o subsecuente en la ejecución de la muerte. Los mecanismos moleculares y celulares por los cuales dichos procesos pueden interactuar son diversos y aún no se conocen del todo.

El mecanismo más estudiado es la interacción entre BECN1 y BCL2. Originalmente BECN1 fue identificada como una proteína de unión a la proteína anti-apoptótica BCL2, donde la unión de BCL2 a BECN1 inhibe la autofagia. Así, células con mutaciones en BCL2 incapaces de unirse a BECN1 pierden su efecto inhibitor e inducen niveles excesivos de autofagia y por tanto muerte autofágica. Estos resultados han llevado a hipotetizar que la interacción entre BECN1-BCL2 actúa como una especie de freno de la autofagia (Pattingre et al., 2005).

Por otra parte, las calpaínas, proteasas dependientes de calcio, pueden actuar como enlaces moleculares entre la autofagia y la apoptosis. En células deficientes de calpaína 1, la autofagia se activa eficientemente, sugiriendo que la calpaína regula a la autofagia (Demarchi et al., 2006). Diversas proteínas involucradas en la autofagia son blancos proteolíticos de la calpaína durante la muerte celular e influyen en la función de la autofagia (Norman et al., 2010). Células de la retina expuestas a isquemia sufren la inhibición de la autofagia debido al corte proteolítico de BECN1, mediado por la activación de la calpaína (Russo et al., 2011). Bajo condiciones apoptóticas ATG5 puede ser cortado por calpaína produciendo un fragmento de 24 kDa el cual promueve la actividad de

la caspasa-3. La inhibición de las calpaínas 1 y 2 bloquea por completo la aparición del fragmento de 24 kDa de ATG5 y disminuye la muerte apoptótica (Yousefi et al., 2006). Asimismo, la calpaína también corta proteínas presentes en la membrana lisosomal como Hsp70.1 (Sahara & Yamashima, 2010), LAMP2 (Villalpando Rodriguez & Torriglia, 2013) y la subunidad b2 de la v-ATPase (Arnandis et al., 2012), produciendo la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) y en consecuencia la salida de los componentes lisosomales.

Algunas otras proteínas lisosomales han sido involucradas en la muerte celular, por ejemplo DRAM 1 (DNA-damage regulated autophagy modulator 1), es una proteína localizada en la membrana lisosomal la cual participa en la activación de la autofagia y estimula el flujo autofágico potenciando la actividad de la v-ATPasa y la acidificación lisosomal (Zhang et al., 2013; Guan et al., 2015). En cultivos celulares expuestos a la toxina mitocondrial ácido 3-nitropropionico, DRAM1 recluta a la proteína BAX hacia los lisosomas donde se propicia la liberación de la catepsina B. La liberación del lisosoma de la proteasa lisosomal induce el corte de BID llevando a la activación de la vía apoptótica mitocondrial (Guan et al., 2015).

2.0 El estrés reticular y la UPR

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo encargado del plegamiento, modificación post-traducciona l y secreción de proteínas (Deegan et al., 2012). Las chaperonas residentes del RE son las encargadas del plegamiento apropiado de las proteínas, así como de la identificación y marcado de proteínas mal plegadas que finalmente serán degradadas.

La homeostasis del RE puede ser fácilmente alterada por diversas condiciones como el cambio en el estado redox intrareticular, la salida de calcio del RE, la disminución en la glicosilación de proteínas y la disminución de los niveles de ATP. En estas condiciones se acumulan proteínas desplegadas o mal plegadas lo que desata el estrés reticular y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, por sus siglas en inglés). La UPR favorece la sobrevivencia celular, atenuando la síntesis proteica e incrementando la expresión de la maquinaria de plegamiento como chaperonas residentes del RE. Finalmente,

se incrementa la degradación a través del sistema de degradación asociado al RE (ERAD) y la autofagia. Sin embargo, cuando dichos mecanismos no son capaces de mitigar el estrés reticular, se activa la muerte celular programada (Deegan et al., 2012; Rashid et al., 2015).

La UPR está orquestada por 3 receptores transmembranales del RE: 1) Kinasa del RE de tipo proteína cinasa RNA (PERK), 2) El factor de transcripción activador 6 (ATF6), y 3) La cinasa dependiente de inositol 1 (IRE1). En condiciones fisiológicas libres de estrés reticular, la chaperona residente del RE, GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa) se une e inhibe a los 3 sensores transmembranales de la UPR. Sin embargo, bajo condiciones de estrés la acumulación de proteínas en el lumen del RE produce la disociación de GRP78 llevando a la activación de la UPR (Merksamer & Papa 2010). A continuación se describen las 3 ramas de la UPR.

Vía de PERK: La actividad cinasa de PERK fosforila la subunidad alfa de factor 2 de iniciación eucariótico (eIF2 α) resultando en la disminución de la traducción de los mRNAs con cap en el extremo 5'. Sin embargo, el factor de transcripción ATF4 es selectivamente traducido y activa el factor de transcripción CHOP (proteína homóloga de C/EBP), que regula genes relacionados con el metabolismo de aminoácidos, balance redox, plegamiento proteico, autofagia y apoptosis (Hetz 2012).

Vía de ATF6: La activación de ATF6 provoca su translocación y procesamiento en el aparato de Golgi, donde es cortado por dos proteasas S1P y S2P formando un fragmento activo de 50 kDa el cual se transloca hacia el núcleo y actúa como factor de transcripción. ATF6 es responsable de la regulación transcripcional de XBP1 que posteriormente será procesado por la vía de IRE1. Además ATF6 regula la expresión de chaperonas (GRP78 y GRP94) y miRNAs que mitigan el estrés reticular.

Vía de IRE1: es la vía más conservada evolutivamente y posee dos actividades: endoribonucleasa y un dominio cinasa. Tras su activación, la actividad RNasa permite la escisión del intron del mensajero de XBP1. La actividad transcripcional de XBP1 induce la traducción estable de factores de transcripción involucrados en la activación de proteínas reguladoras del RE.

Por otra parte, el dominio cinasa de IRE1, se une al factor 2 asociado al receptor de necrosis tumoral α (TRAF2) el cual recluta a la cinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) resultando en la activación de JNK1 (Hetz 2012).

2.1 Estrés reticular, UPR y apoptosis

El mantenimiento de la proteostasis y la capacidad para responder ante los disturbios en la función del retículo endoplásmico es crucial para la sobrevivencia neuronal. Sin embargo el estrés reticular crónico o sin resolver da lugar a la apoptosis. La activación prolongada de cualquiera de las vías de la UPR puede inducir la apoptosis bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas a través de distintos mecanismos moleculares.

En condiciones de estrés prolongado la actividad endorribonucleasa de IRE1 induce la degradación de mRNAs a través de un proceso denominado RIDD. En principio la actividad RIDD ayuda a las células a aliviar el estrés reticular limitando la carga de mRNAs y por tanto la síntesis de nuevas proteínas. No obstante, este mecanismo degrada mRNAs de proteínas que favorecen la sobrevivencia celular (i.e. proteínas de la familia BCL2), resultando en la muerte celular apoptótica (Hollien & Weissman 2006). Por otra parte la activación de la vía IRE1/TRAF2/JNK finaliza en la muerte celular, ya que la activación de JNK promueve la inhibición de proteínas anti-apoptóticas (BCL2, Bcl-xL) por fosforilación y la activación de proteínas pro-apoptóticas (Bim, Bad).

Otro mecanismo por el cual el estrés reticular induce la apoptosis a través de IRE1, es mediante la interacción de proteínas involucradas en la señalización apoptótica mitocondrial tales como BAX y BAK. Estas proteínas forman un complejo en la membrana del RE e interactúan con IRE1 modulando su activación en respuesta al estrés reticular (Hetz et al., 2006).

La activación de CHOP en respuesta al estrés reticular crónico induce la muerte celular a través de la represión transcripcional de BCL2, que finalmente se traduce en la activación de la apoptosis por la vía mitocondrial (Tabas & Ron 2011). Asimismo, se ha implicado a CHOP en la muerte celular por estrés oxidativo, ya que CHOP induce la expresión de la retículo endoplásmico

oxigenasa (ERO1a) promoviendo condiciones oxidantes en el RE (Marciniak et al., 2004).

El estrés reticular también puede inducir la apoptosis a través de la activación de la caspasa-12. Se ha propuesto que el mecanismo de activación es por medio de la interacción con IRE1/TRAF2; sin embargo, poco se conoce de este mecanismo así como de los sustratos de esta caspasa (Tabas & Ron 2011). Como hemos mencionado con anterioridad, durante la AG en cultivos de neuronas de hipocampo se produce la activación de la caspasa-12 contribuyendo al daño neuronal. La activación de la caspasa-12 bajo condiciones de AG está mediada por la activación de la calpaína y la caspasa-7 (García de la Cadena et al., 2014).

2.2 Autofagia y su relación con el estrés reticular

La autofagia se considera como el mecanismo de degradación de proteínas asociado al RE de tipo II (ERAD II), que ayuda a restablecer la homeostasis del RE. Aunque la UPR y la autofagia pueden funcionar independientemente, también cumplen funciones en común, como proteger a la célula disminuyendo el estrés o induciendo la muerte celular bajo condiciones extremas. Por otra parte, la estrecha relación entre ambos mecanismos es compleja y puede determinar la sobrevivencia o muerte celular.

La manipulación genética de la UPR evidencia la relación existente entre la autofagia y el estrés del retículo. La delección de ATF6 resulta en la intolerancia contra el estrés reticular y la disminución de la autofagia a través de la disminución de DAPK1, quien al fosforilar a BECN1 induce la pérdida de afinidad del complejo BECN1/BCL2 estimulando la autofagia. Esto sugiere que la autofagia puede ser regulada a través de esta vía (Gade et al., 2014). En contraste, el knock-down condicional de IRE1 o XBP1 resulta en el incremento de la autofagia (Margaritti et al., 2013). Estas evidencias, sugieren que la UPR puede regular la autofagia de distintas maneras en condiciones de estrés reticular.

El estrés reticular inducido con tunicamicina o tapsigargina propicia la activación de la autofagia como mecanismo de sobrevivencia, a través de la vía

de IRE1. Particularmente, la fosforilación de JNK1 subsecuente a la activación del dominio cinasa de IRE, induce la autofagia como mecanismo que le permite a la células adaptarse ante el estrés reticular (Ogata et al., 2006). El principal blanco de la activación de JNK1 es BCL2. La fosforilación de esta proteína desestabiliza su interacción con BECN1, promoviendo la autofagia a través de la activación de la PtdIns3K-III. La activación de JNK1 en condiciones de estrés puede mediar la inducción de autofagia o apoptosis, sugiriendo que dicha cinasa actúa como regulador molecular de la transición autofagia-apoptosis. La activación transitoria de JNK1 promueve la autofagia mediante la disociación del complejo BCL2/BECN1, sin afectar la interacción BCL2/BAX. Sin embargo, la activación sostenida de JNK1 induce apoptosis debido a la completa disociación de BCL2 y BAX (Wei et al., 2008).

Por el contrario, la activación de la vía IRE/XBP1 inhibe la autofagia a través de la regulación negativa de FoxO1, regulador transcripcional de genes relacionados con la autofagia (Zhao et al., 2010). Es así que la deficiencia de XBP1 confiere un efecto protector al estimular la autofagia y disminuir el número de agregados proteicos en modelos *in vivo* e *in vitro* de la enfermedad de Huntington (Vidal et al., 2012).

Otro nivel de regulación de la autofagia por parte del estrés reticular se da a nivel transcripcional. Muchos de los genes necesarios para la formación de los autofagosomas deben ser regulados transcripcionalmente para mantener el flujo autofágico. Los genes de ATG5, ATG12 y LC3 son regulados a través de la vía de PERK por medio de ATF4 o CHOP (Deegan et al., 2012). Particularmente la formación de agregados de polyQ72, involucrados en la enfermedad de Huntington, induce la formación de autofagosomas por medio de la vía PERK/eIF2a, mediante el incremento en la expresión de ATG12, resultando en la formación del complejo ATG12-ATG5-ATG16 (Kouroku et al., 2007). Por otra parte, la activación de CHOP también puede inducir la formación de autofagosomas por medio de la disminución en la expresión de BCL2, y por tanto el aumento de BECN1 libre necesaria para la activación del complejo PI3K-III (McCullough et al., 2001). La activación de la autofagia por medio de PERK/eIF2a/ATF4 tiene una función principalmente protectora permitiendo a la célula contrarrestar el estrés del retículo endoplásmico. Sin

embargo, bajo ciertas circunstancias y dependiendo de la duración e intensidad del estrés, la inducción de la autofagia a través de esta vía puede contribuir a la muerte celular (Senft & Ronai 2015).

Por su parte la actividad transcripcional de ATF6 regula la inducción de la autofagia, a través de la expresión de GRP78, la cual forma un complejo con Akt evitando su activación por fosforilación y por tanto la actividad de mTOR (Yung et al., 2001). Es más, el pre-condicionamiento isquémico incrementa los niveles de GRP78 y la formación de autofagosomas, esto a través de la regulación de la vía AMPK-mTOR (Zhang et al., 2015). Por otra parte, ATF6 también induce la expresión de DAPK1 que a su vez induce la pérdida de afinidad del complejo BECN1/Bcl-2 mediante la fosforilación de BECN1 estimulando la autofagia (Gozuacik et al., 2008). Es así que células deficientes de ATF6, fallan en inducir autofagia debido a la disminución en la expresión de DAPK1 (Gade et al., 2014).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La homeostasis celular depende de la acción coordinada de sistemas celulares de control de calidad, los cuales bajo condiciones normales sensan y rectifican cualquier alteración en la homeostasis. El buen funcionamiento del retículo endoplásmico a través de la maquinaria de plegamiento de proteínas y de los sistemas de degradación como la autofagia, son responsables del mantenimiento de la proteostasis y de la homeostasis celular. Bajo condiciones de estrés energético como la AG/GR, estos sistemas se encargan de preservar la función celular, sin embargo si el estrés persiste su capacidad se rebasa produciendo citotoxicidad y muerte celular.

En experimentos previos hemos demostrado la activación de la autofagia y de la UPR en respuesta al estrés energético inducido por la AG/RG (García de la Cadena et al., 2014; Camberos-Luna et al., 2016). A pesar de esto, cerca del 60 % de las células mueren, sugiriendo que estas respuestas fallan en contrarrestar el estrés celular, o que incluso pueden contribuir a la muerte. De aquí que es importante conocer como es la dinámica de la autofagia y de la

UPR durante el estrés energético en neuronas, determinar si existe una relación entre ambas y dilucidar si la falla en estas respuestas contribuye a la muerte neuronal.

HIPÓTESIS

El estrés energético causado por la AG/GR produce el desbalance de la homeostasis neuronal desencadenando la activación de la autofagia y de la UPR como respuestas adaptativas. Sin embargo, la autofagia ocurrirá de manera deficiente debido a la interrupción del flujo autofágico y fallará en prevenir el daño neuronal. Por su parte la activación sostenida de la UPR contribuirá a la disfunción del flujo autofágico y por tanto al daño neuronal.

OBJETIVO

Determinar la dinámica de la autofagia y de la UPR, así como la interacción entre ambas vías y su participación en la sobrevivencia neuronal en respuesta al estrés energético.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar la presencia de autofagia y de las distintas vías de la UPR en cultivos de neuronas corticales sometidos a la AG/RG.

Determinar la contribución de la autofagia a la sobrevivencia neuronal inducida por la AG/RG.

Determinar la contribución de la UPR a la sobrevivencia neuronal inducida por la AG/RG.

Estudiar el mecanismo de interacción entre la UPR y la autofagia durante el daño neuronal inducido por la AG/RG.

METODOLOGÍA

1. Cultivo Neuronal

A partir de tejido fetal de ratas Wistar de 17 días de gestación se realiza la disección de la corteza cerebral. El tejido se corta utilizando un rebanador de tejido (McIlwan laboratory Engineering Co.) y disocia con Tripsina-EDTA en solución Ringer Krebs (KRB) durante 3 minutos a 37°C. La reacción de disociación se detiene utilizando inhibidor de tripsina al 0.08% y DNAsa al 0.52%. Para asegurar una disociación completa, las células se disgregan mecánicamente pasándolas por una malla. Finalmente las células se resuspenden en medio Neurobasal (25 mM glucosa) suplementado con 2 % de B27 mixto (50% con antioxidantes y 50 % sin antioxidantes), 0.5 mM L-glutamina y 0.02 mg/ml gentamicina. Las células se siembran en cajas precubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml) a una densidad de 2.2×10^5 células/cm². Las células se mantienen por 8 días in vitro (DIV) a 37°C con una atmósfera de 5 % de CO₂-95 % aire; al 4 DIV se añade medio Neurobasal fresco, suplementado con 2 % B27 sin antioxidantes y 0.9 µM de citosina arabinosa.

2. Tratamientos

A los 8 DIV los cultivos son expuestos a un medio libre de glucosa DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) por diferentes periodos de tiempo (periodo de AG); finalizado este periodo el medio libre de glucosa es sustituido por el medio en el que inicialmente fueron sembradas las células (periodo de reintroducción de glucosa, RG). Las células se trataron con 3-metil adenina (3-MA) 10 mM (inhibidor de PtdIns3K-III; Sigma-Aldrich), Pepstatina A 2 µM (inhibidor de Catepsina D; Sigma-Aldrich), CA074 50 µM (inhibidor de Catepsina B; Sigma-Aldrich), Cloroquina (CQ) 20 µM (inhibidor del flujo autofágico; Sigma-Aldrich), NH₄Cl 20 µM, MDL 20 µM (inhibidor de Calpaína; Biomol international), Calpastatina 1 µM (inhibidor endógeno de Calpaína; Tocris), QVD-OPH 20 µM (inhibidor general de caspasas; MP Biomedicals 03OPH109), Z-DEVD-FMK 20 µM (inhibidor de Caspase 3/7, Sigma-Aldrich), GSK2606414 5 µM (inhibidor de PERK), STF083010 30 µM (inhibidor de la actividad RNasa IRE1) y SP600125 10 µM (inhibidor de JNK). Estos inhibidores se añadieron durante la AG o RG.

3. Inmunodetección (Western blot)

Después del periodo de exposición a la AG/RG, las células se lavaron con PBS 0.1 M y se homogenizaron con buffer de lisis que contiene (Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sodio 0.5% and SDS 1%) y 2 mg/ml de inhibidores de proteasas (Complete, Roche). La concentración de proteínas se determinó por el ensayo de Lowry y 30 µg de muestra se separaron por SDS-PAGE y transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos: LC3 (MBL international) 1:1000, BECN1 (Sigma-Aldrich) 1:1000 and SQSTM1/p62 (Cell signaling technology) 1:500, CTSB (Santa Cruz Biotechnology) 1:250, α -Spectrin (Chemicon Millipore) 1:3500, LAMP2 (Sigma-Aldrich) 1:1000, p-eIF2 α (Cell signaling technology) 1:500, ATF4 (Cell signaling technology) 1:500, p-IRE1 (Abcam) 1:1000, p-JNK (Cell signaling technology) 1:500, JNK (Cell signaling technology) 1:500, GRP78 1:3000, GRP94 1:1000. La reacción del anticuerpo primario se detectó utilizando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, cabra anti-ratón o cabra anti-conejo (Jackson Immunoresearch Laboratories) y la inmunoreactividad se detectó con sustrato HRP quimioluminiscente (Millipore Corporation). Actina (1:7000; Merck Millipore) se utilizó como control de carga.

4. Inmunocitoquímica

Las células se sembraron sobre cubreobjetos y sometidas a la AG/RG. Al finalizar el tratamiento se realiza 1 lavado con PBS 0.1 M; posteriormente se fijaron con metanol 100% durante 20 minutos sobre hielo. Las células se permeabilizaron con una solución de Tritón X al 0.1% en PBS por 5 min. El bloqueo se realizó con PBS-Albúmina 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario se incubó durante 1 noche a 4°C en solución de PBS-Albumina 2%. El anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora en PBS-Albúmina 5% protegido de la luz a temperatura ambiente.

5. Viabilidad Celular

5.1 MTT

Las células se expusieron a 2 h de AG y 22 h después se evaluó la sobrevivencia a través de la reducción del bromuro 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT), que es un índice de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. Se añadieron 60 µg/ml de MTT y se incubó durante 1 hora a 37°C; al término la sal de formazán se disolvió con isopropanol-HCl y se determinó la absorbancia con un espectrómetro de luz visible a 570 nm.

5.2 Liberación de LDH

Como índice de sobrevivencia también se cuantificó la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de las mismas células en las que se midió el MTT. Las células se expusieron a 2 h AG y 22 h RG, se colectó medio para determinar la actividad de la LDH. Las muestras fueron incubadas con NADH 9.4 mM en buffer K_2HPO_4/KH_2PO_4 1mM durante 5 min a temperatura ambiente. La reacción se inició con piruvato 20 mM y se cuantificó la disminución de la fluorescencia del NADH a 340 nm durante 5 minutos.

5.3 Ensayo de muerte/vida

La Calceína-AM es un fluoróforo verde (488nm) que se transporta a través de la membrana plasmática y transforma por la actividad de esterasas en las células vivas. Por el contrario el homodímero de etidio (EtH) es un fluoróforo rojo (594nm) impermeable a la membrana plasmática, que se internaliza en las células muertas o con daños en la membrana e interacciona con el ADN. Después del periodo de exposición a la AG/RG, las células fueron incubadas con EtH (EtH) 1µM y Calceína-AM 2 µM durante 20 min a 37°C. Tras la incubación las células se lavaron con solución Lockey que contiene (NaCl 154 mM, KCl 5.6 mM, $NaHCO_3$ 3.6 mM, $CaCl_2$ 2.6 mM, HEPES 5 mM pH 7.4 y glucosa 5.6 mM). Los cultivos se observaron en un microscopio de epifluorescencia y se cuantificaron las células positivas a Calceína-AM/EtH.

6. Monitoreo de células positivas a Anexina V

Para realizar el monitoreo de células apoptóticas se utilizó Anexina V-Alexa 594, un fluorocromo acoplado a la proteínas anexina V la cual tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina, un marcador de apoptosis el cual se transloca a la cara externa de la membrana plasmática. Las células se cultivaron sobre cubreobjetos y expuestas a AG/RG. Después del tratamiento, el fluorocromo contra Anexina V (Life technologies) y el fluorocromo marcador de autofagosomas, Cyto-ID (ver más adelante) se incubaron durante 20 min a 37 °C. Tras la incubación las células se lavaron con solución Lockey y las imágenes confocales se tomaron después de 20 h de RG con un microscopio Leica TCS SP5 utilizando un objetivo 63x en inmersión de agua con un láser UV-405 nm para Hoechst 33342, Arg-488 nm para Cyto-ID y He/Ne-543 para Anexina V.

7. Formación de autofagosomas en células vivas

Después del periodo de exposición a la AG/RG, las células se incubaron con Cyto-ID (Enzo life sciences) un fluorocromo verde que tiñe específicamente autofagosomas y no autolisosomas o lisosomas, ya que la fluorescencia verde es lábil en un ambiente ácido. Antes del inicio de la AG, el Cyto-ID fue incubado durante 20 min a 37°C. El medio Neurobasal fue sustituido progresivamente por medio DMEM; después de 2 h de AG el medio fue sustituido por medio Neurobasal. Las imágenes confocales se tomaron al inicio de la AG y a diferentes tiempos después de haber iniciado el periodo de AG ó de RG con un microscopio Leica TCS SP5 utilizando un objetivo 63x en inmersión de agua con un láser UV-405 nm para Hoechst y Arg-488 nm para Cyto-ID. Se utilizó Hoechst 33342 para marcar los núcleos. El número de autofagosomas se determinó utilizando el software FIJI para análisis de imágenes como se describió en Camberos-Luna et al. (2016), considerando tres experimentos independientes y tres repeticiones de cada muestra

8. Silenciamiento de Atg7

A los 4 DIV las células se trataron con Atg7 RNAi. El medio de cultivo fue remplazado por medio Accell RNAi delivery (GE Healthcare Dharmacon)

suplementando con 2% B27 conteniendo 50 nM o 100 nM de Smart pool Atg7 RNAi o 100 nM de scrambled RNAi. Después de 8 h de incubación el medio Accell fue remplazado por el medio en el que originalmente fueron cultivadas las neuronas. Las células se mantuvieron por 8 DIV en las condiciones previamente descritas.

9. Tinción de LysoTracker

Las células cultivadas en cubreobjetos se expusieron a AG/RG. Después del tratamiento se incubaron con LysoTracker (Life technologies, DND-99) por 20 min a 37°C. Las imágenes confocales se capturaron después de 20 h de RG con un microscopio Leica TCS SP5 utilizando un objetivo 63x en inmersión de agua con un láser UV-405 nm para Hoechst y He/Ne-543 para LysoTracker. Se utilizó Hoechst 33342 como co-tinción de núcleos. El número de vesículas positivas a LysoTracker se cuantificó utilizando el software FIJI para análisis de imágenes, considerando tres experimentos independientes y tres repeticiones de cada muestra. Utilizando la proyección máxima, el análisis de las partículas se hizo con las siguientes especificaciones: tamaño de área 0.2-25 μm^2 y circularidad 0.1-1.

10. Ensayo de integridad de la membrana lisosomal (Naranja de acridina)

Las células fueron expuestas a 2 h de AG y 12 h de RG. Después del tratamiento se incubaron con 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de naranja de acridina por 10 min a 37°C y se lavaron con solución Lockey. El naranja de acridina es un fluoróforo que es capturado en los compartimentos ácidos (i.e. lisosomas y/o autolisosomas). Bajo condiciones de pH bajo emite una fluorescencia anaranjada/roja. Sin embargo, en condiciones de permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) el naranja de acridina es liberado de los lisosomas e interactúa con los ácidos nucleicos emitiendo una fluorescencia verde. Las imágenes confocales se tomaron con un microscopio Leica TCS SP5 utilizando un objetivo 63x de inmersión de agua con un láser Arg 458/650 nm (rojo; vacuolas ácidas) y Arg 488/525 nm (verde; núcleos). El número de partículas positivas a naranja de acridina fue determinado como se describió para los lisosomas.

11. Fraccionamiento sub-celular

Células sembradas en cajas Petri de 100 mm se expusieron a 2 h de AG y 12 h de RG. Después del tratamiento se lavaron con PBS 0.1 M a 4°C y recolectaron con PBS 0.1 M con 2mg/ml de inhibidores de proteasas. Las muestras se centrifugaron por 10 min, 1000 g a 4°C. El pellet se homogenizó con 15 pases utilizando un embolo de teflón en sacarosa 0.32 M con 2 mg/ml de inhibidores de proteasas. Los homogenizados fueron centrifugados a 1000 g por 5 min para precipitar los núcleos. El sobrenadante fue centrifugado a 3000 g por 10 min. Posteriormente el sobrenadante fue centrifugado a 17000 g por 15 min para obtener una fracción lisosomal enriquecida. El sobrenadante se cnetrifugó a 60000 g por 30 min para limpiar completamente la fracción citosólica.

RESULTADOS

Sección I

I. La AG/RG induce la formación de autofagosomas

Para investigar la dinámica de la autofagia en respuesta a la AG/RG, analizamos 3 proteínas que participan en diferentes etapas de la autofagia. BECN1 proteína necesaria para la iniciación de la autofagia, muestra la disminución de sus niveles durante la AG y primeras horas de la RG. A las 4 h de RG los niveles de BECN1 se recuperan e incrementan al final de la RG (Fig. 1A). Posteriormente se evaluó la lipidación de LC3-I a LC3-II, marca característica de la formación de autofagosomas, y p62/SQSTM1 como indicativo del flujo autofágico. LC3-II y p62/SQSTM1 incrementaron significativamente durante el periodo de AG (Fig. 1B-C). La inhibición de la degradación lisosomal con CQ durante este periodo no incrementó los niveles de ambas proteínas (Fig. 2A y B), sugiriendo la deficiencia en el flujo autofágico debido a la falla energética. Sin embargo, inmediatamente después de la RG, LC3-II y p62/SQSTM1 disminuyeron significativamente (Fig. 1B-C) y el tratamiento con CQ durante 2 y 4 h de RG incrementó los niveles de LC3-II y p62/SQSTM1 (Fig. 2A y B) sugiriendo el restablecimiento del flujo autofágico. Finalmente en etapas tardías de la RG, LC3-II y p62/SQSTM1 mostraron un

segundo pico de acumulación, indicando la acumulación de autofagosomas y la disminución del flujo autofágico (Fig. 1B-C).

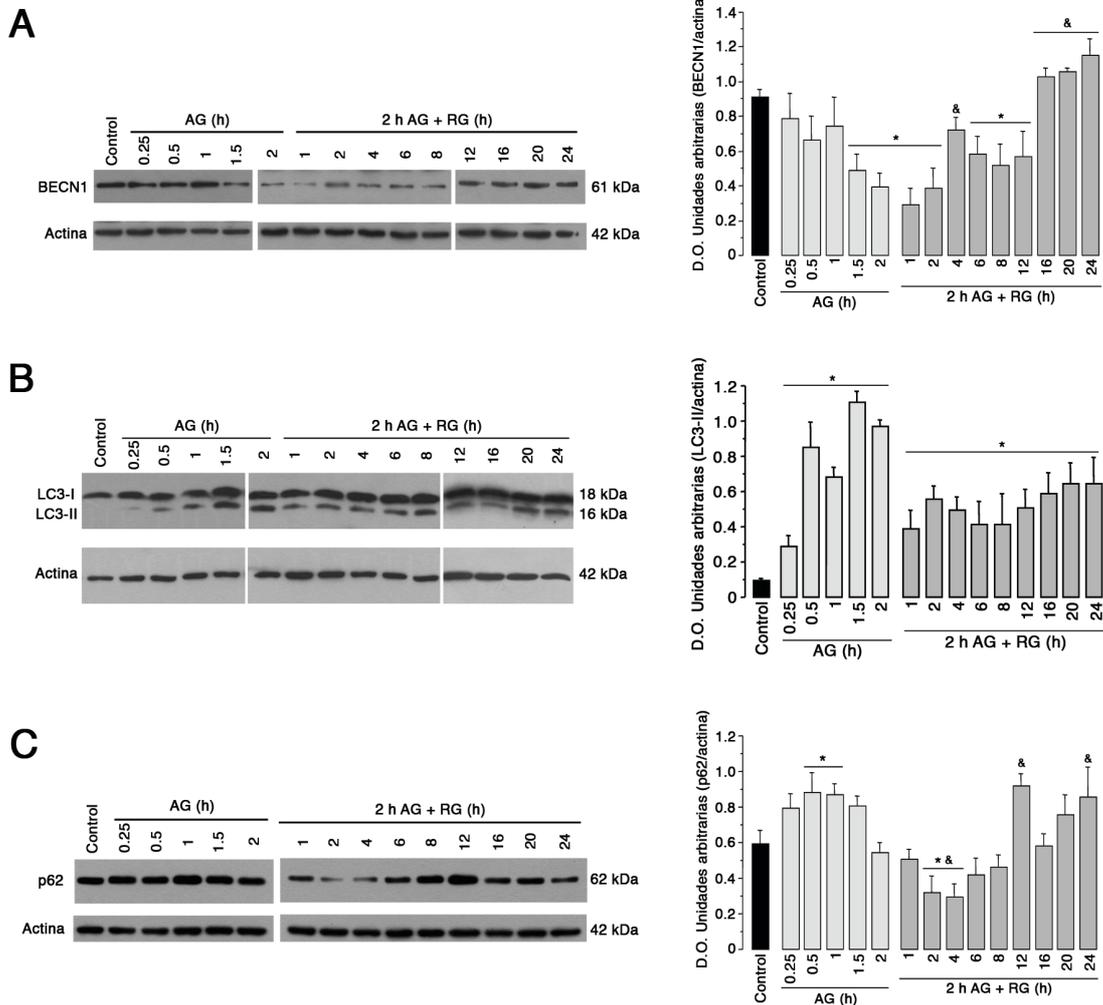


Figura 1. Incremento en la formación de autofagosomas en los cultivos corticales expuestos a AG/RG. Inmunoblot representativo y cuantificación de BECN1/actina (A), LC3-II/actina (B) y p62/SQSTM1/actina (C). Las barras representan la media \pm ES (n=4-5). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Fisher * $p < 0.05$ vs control, and & $p < 0.05$ vs 2 h of GD.

Para corroborar la formación de autofagosomas, se realizó un curso temporal en células vivas utilizando Cyto-ID, un fluorocromo verde que marca específicamente autofagosomas. Después de 15 min de AG, autofagosomas aparecieron en la mayoría de la neuronas y permanecieron durante todo el periodo de AG. Sin embargo desaparecieron durante la primera hora de RG, sugiriendo la maduración a autolisosomas (Fig. 3A y C). Durante las etapas tardías de RG, los autofagosomas sólo se observaron en aquellas células que presentaban un núcleo intacto sugiriendo su viabilidad (Fig. 3B y C). Estos

resultados son consistentes con las proteínas analizadas por western-blot y sugieren la rápida acumulación de autofagosomas debida al deficiente flujo autofágico, el cual es restablecido con la RG. Durante los tiempos tardíos de RG la autofagia es reactivada formando autofagosomas en aquellas neuronas con un núcleo intacto.

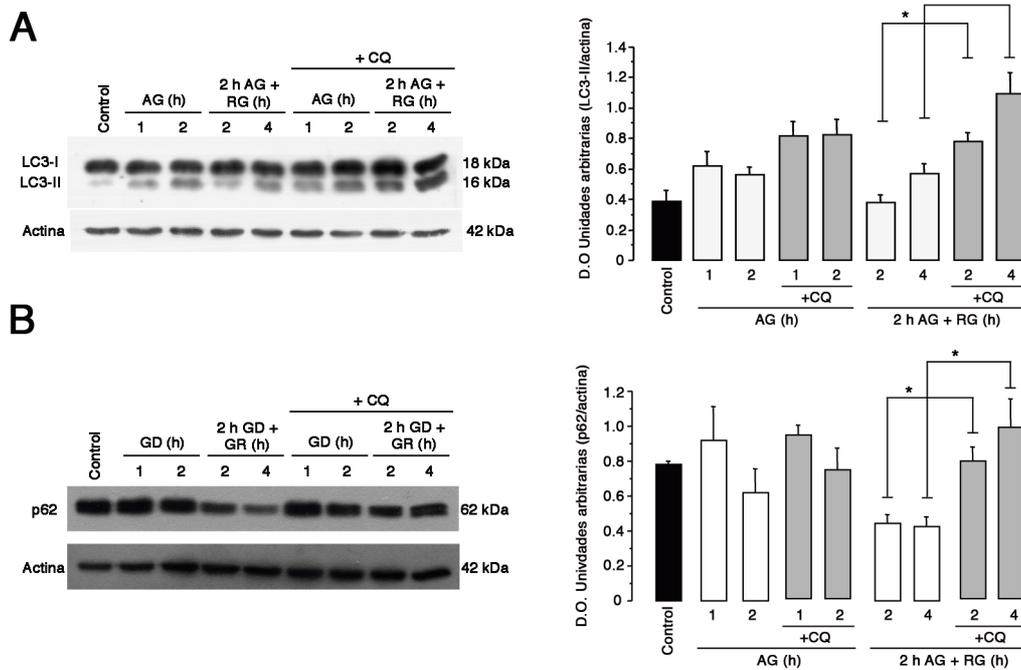


Figura 2. Restablecimiento del flujo autofágico durante la RG. Inmunoblot representativo y cuantificación de LC3-II/actina (A) y p62/SQSTM1/actina (B) en presencia o ausencia de CQ. Las barras representan la media \pm ES (n=4-5). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de la prueba de Fisher *p<0.05.

I.I La muerte neuronal ocurre durante la RG

De acuerdo con los resultados anteriores, únicamente aquellas neuronas con un núcleo bien preservado muestran autofagosomas. Para determinar el progreso de la muerte neuronal durante la AG/RG, se realizó un curso temporal utilizando el ensayo de muerte/vida (homodímero de etidio/calceína AM). Los cultivos expuestos únicamente a la AG no mostraron cambios en la viabilidad. Sin embargo, cuando los cultivos fueron expuestos a 2 h de AG y diferentes tiempos de reintroducción, se observó la aparición progresiva de neuronas muertas (positivas EtH), acompañado de la disminución de neuronas vivas (positivas a calceína-AM) a partir de las 8-24 h de RG (Fig. 4A). Estos datos sugieren que la ejecución de la muerte neuronal ocurre durante la RG.

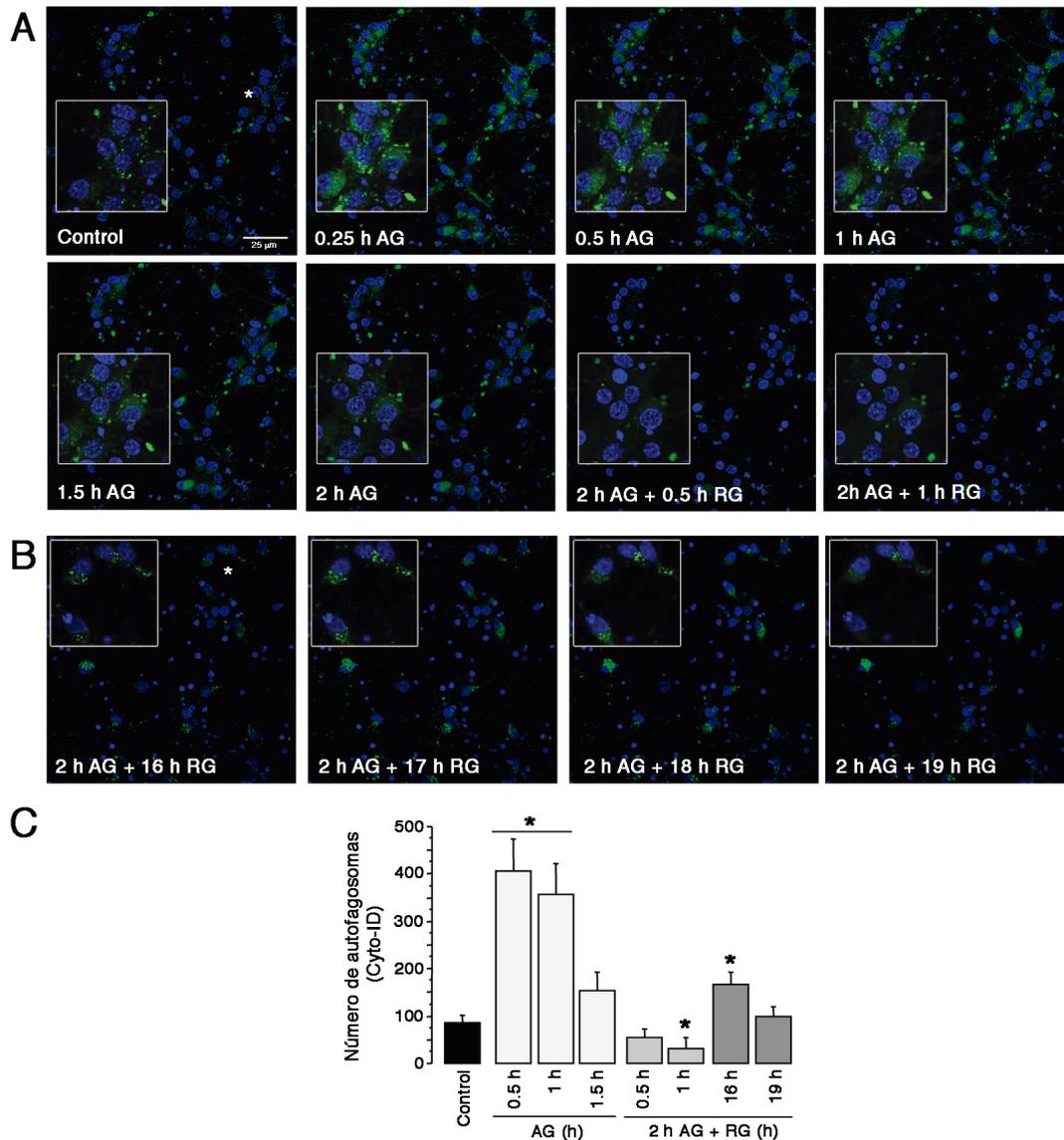


Figura 3. La formación de autofagosomas se presenta durante la AG y etapas tardías de la RG. Imágenes representativas del curso temporal de la formación de autofagosomas de los cultivos corticales expuestos a AG/RG utilizando el kit Cyto ID (verde) y Hoechst como co-tinción (azul) (A y B). La Gráfica muestra el número de autofagosomas a diferentes tiempos de la AG/RG (C). Los asteriscos indican las zonas de magnificación. Las barras representan la media \pm ES (n=3-6). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher * $p < 0.05$ vs control.

Posteriormente para evaluar el mecanismo por el cual las neuronas están muriendo durante la RG y si la autofagia es partícipe del daño, se realizó un curso temporal de Cyto-ID y Anexina V como marcador de la muerte apoptótica. Las células positivas a Anexina V (rojas) incrementaron significativamente a partir de las 12-20 h de RG (Fig. 4B), contrario a la disminución en las células positivas a Cyto-ID. Interesantemente, las células positivas a Anexina V no mostraron autofagosomas, sugiriendo que las células en proceso de apoptosis, no forman autofagosomas. Es más, el tratamiento

durante la RG con QVD-OPH (inhibidor general de caspasas) y Z-DEVD-FMK (inhibidor de caspasas-3, -7) incrementó la sobrevivencia neuronal y disminuyó el número de núcleos positivos a TUNEL (Fig. 4C), confirmando que la muerte es ejecutada durante el periodo de RG por apoptosis.

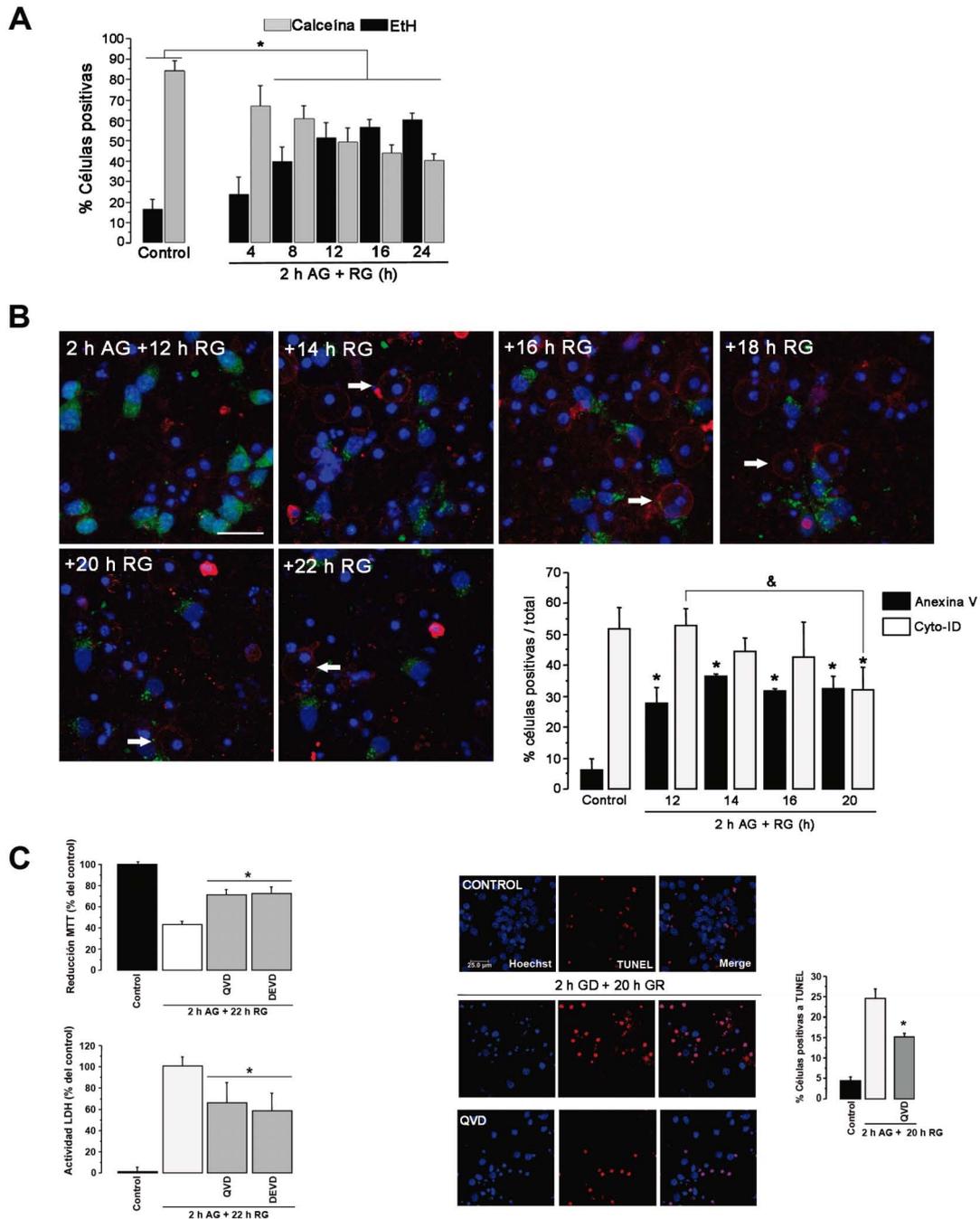


Figura 4. La muerte neuronal se presenta durante la RG. Cuantificación de neuronas vivas/muertas utilizando Eth y calceína-AM (A). Imágenes representativas y cuantificación de neuronas apoptóticas y con autofagosomas utilizando Cyto-ID (verde), Annexina V (rojo; flechas) y Hoechst (azul) a diferentes tiempos de la RG (B). Las gráficas muestran el porcentaje de células positivas a Eth y calceína-AM (A) ó Annexina V y Cyto-ID (B) a diferentes tiempos de RG. Ensayos de sobrevivencia MTT y LDH (C; panel izq.) ensayo de TUNEL (C; panel der.) en presencia o ausencia de inhibidores de caspasas. Las barras representan la media \pm ES (n=3-4). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher * $p < 0.05$.

I.II La autofagia participa en la muerte neuronal inducida por la AG/RG

Los resultados anteriores sugieren que las neuronas sobrevivientes inducen autofagia posiblemente como mecanismo de sobrevivencia, mientras que las apoptóticas no fueron capaces de formar autofagosomas. Por tanto, analizamos si la inhibición de la autofagia reduciría la sobrevivencia neuronal. Sin embargo, la inhibición de la formación de autofagosomas con 3-MA, inhibidor de la PtdIns3K-III, protegió a las neuronas de la muerte cuando fue incubado durante el periodo RG (Fig. 5A-B). Para confirmar este resultado, se silenció la expresión de Atg7 utilizando un RNAi. El silenciamiento, redujo significativamente la expresión de ATG7 e incrementó la viabilidad neuronal (Fig. 5C). Este resultado confirma que la inhibición de la formación de autofagosomas previene la muerte neuronal. Además analizamos si la degradación autofágica contribuye al daño neuronal. La inhibición de la degradación con CQ o NH₄Cl durante la RG incrementó la sobrevivencia neuronal (Fig. 4A). Estos resultados sugieren que la autofagia no es capaz de prevenir la muerte neuronal, más aún contribuye al daño neuronal. Sin embargo, aquellas neuronas sobrevivientes a la RG fueron capaces de reactivar la autofagia ya que presentan autofagosomas y se observa lipidación de LC3-II en las fases finales de la RG.

I.III La actividad de la calpaína durante la RG induce la disfunción autofágica y contribuye a la muerte neuronal.

Como se mencionó anteriormente, las calpaínas participan como enlaces moleculares entre la autofagia y la apoptosis ya que pueden cortar proteínas que participan en el proceso de autofagia ó proteínas de la membrana lisosomal. Previamente hemos reportado que la activación de la calpaína durante la AG contribuye a la muerte neuronal en cultivos de neuronas de hipocampo (García de la Cadena et al., 2014). Para demostrar si la calpaína contribuye a la disfunción autofágica y a la subsecuente muerte neuronal, se realizó un curso temporal de su actividad. Se analizó mediante inmunoblot el procesamiento de la α -espectrina en productos de 150-145 kDa producidos por la calpaína. Los productos de la calpaína incrementaron significativamente durante la AG y en las etapas tardías de la RG (6-24 h), coincidiendo con el inicio de la muerte neuronal y la acumulación de autofagosomas (Fig. 6A).

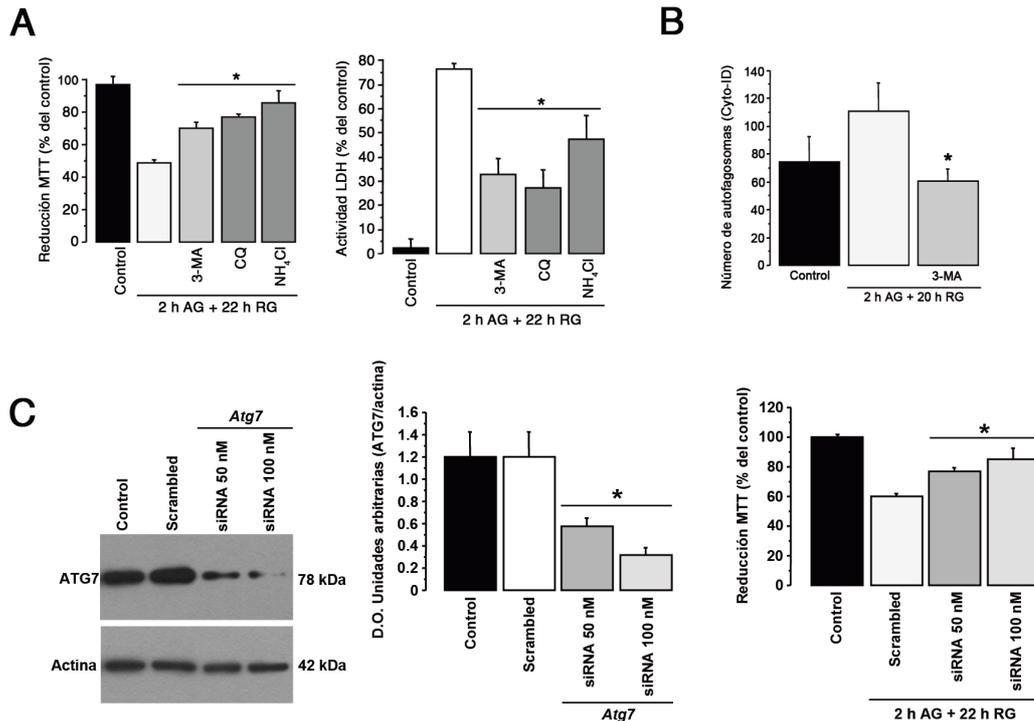


Figura 5. La inhibición de la autofagia reduce la muerte neuronal inducida por la AG/RG. Reducción de MTT y actividad de LDH en el medio de cultivos corticales expuestos a AG/RG. Los Inhibidores fueron incubados durante la RG (A). Cuantificación del número de autofagosomas en presencia de 3-MA durante la RG (B). Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de ATG7 en los cultivos control e incubados con siRNA scrambled ó *Atg7* siRNA 50 nM y 100 nM (C; gráfica izquierda); Reducción MTT (C; gráfica derecha) (C). Las barras representan la media \pm ES (n=4-10, A-B y n=3-7, C). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher *p<0.05 vs GD (A-B) ó vs scrambled siRNA (C). 3-MA (10 mM), CQ (20 μ M), NH₄Cl (20 μ M).

Posteriormente analizamos si la inhibición de la calpaína con MDL (inhibidor no específico) ó Calpastatina (inhibidor endógeno) prevenía la muerte neuronal. Como era de esperarse el tratamiento con ambos inhibidores redujo los productos de 150-45 kDa y la muerte neuronal cuando se incubaron durante la RG de acuerdo a los ensayos de reducción de MTT y de actividad de LDH (Fig. 6B). Estos datos sugieren que la activación de la calpaína durante la RG contribuye a la ejecución de la muerte neuronal.

Posteriormente, analizamos si la actividad de la calpaína podía inhibir la autofagia. La inhibición de la calpaína durante la RG con MDL ó Calpastatina incrementó significativamente los niveles de LC3-II y p62/SQSTM1, así como el número de autofagosomas cuando fueron analizados a las 20 h después de la RG (Fig. 6C-D). Estos datos sugieren que la activación de la calpaína induce la disfunción de la autofagia y que su inhibición incrementa el número de neuronas viables capaces de activar la autofagia.

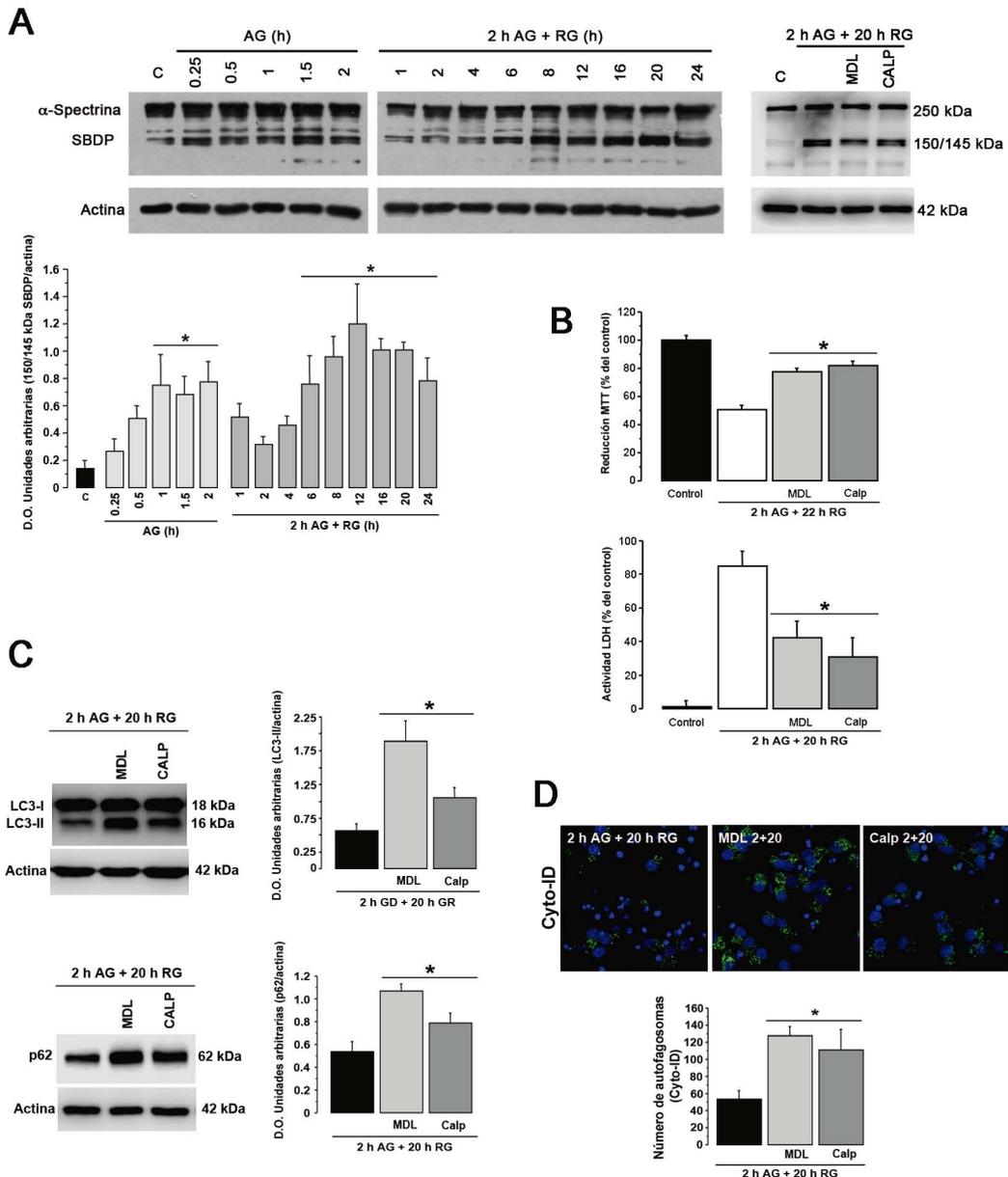


Figura 6. Activación de la calpaína en los cultivos corticales expuestos a la AG/RG. Inmunoblot representativo y cuantificación del fragmento de 150/145 kDa de la espectrina generado por la calpaína durante la AG/RG y el efecto de los inhibidores de calpaína (A). Efecto de los inhibidores de calpaína en los cultivos expuestos a AG/RG. MDL (20 μ M) ó Calpastatina (1 μ M) incubados durante la RG. Reducción MTT y actividad LDH (B). Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de LC3-II/LC3-I, LC3-II/Actina y p62/SQSTM1/Actina (C). Imágenes representativas y cuantificación del número de autofagosomas (D). Las barras representan la media \pm ES (n= 4 A; n= 4-10 B; n=6-7 C, n=3-4 D). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher * p <0.05 vs control ó AG.

La calpaína puede cortar proteínas de la membrana lisosomal induciendo la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) y por tanto la liberación de las catepsinas y la degradación celular. Para investigar esta posibilidad

monitoreamos la actividad e integridad lisosomal utilizando Lysotracker y naranja de acridina (NA). Las neuronas control presentan en el citosol vesículas positivas a Lysotracker (lisosomas y autolisosomas) indicativo de lisosomas activos, mientras que el número de lisosomas disminuyó tras la AG/RG. La inhibición de la calpaína incrementó el número de neuronas viables y el total de lisosomas después de la AG/RG (Fig 7A y D). Al igual que en los experimentos de Lysotracker, las neuronas control muestran un gran número de vacuolas positivas a naranja de acridina y sin fluorescencia en el núcleo indicativo de la presencia de lisosomas íntegros. En cambio, en las células expuestas a AG/RG la fluorescencia anaranjada de las vesículas se perdió y el núcleo presenta fluorescencia verde, indicando que la LMP permite la pérdida del naranja de acridina de los lisosomas y su subsecuente translocación hacia el núcleo. Por su parte, en las neuronas tratadas con inhibidores de calpaína el número de vacuolas acídicas se preservó y se redujo la fluorescencia en el núcleo (Fig. 7B y D). Estos resultados sugieren que la activación de la calpaína durante la RG induce la LMP alterando la integridad lisosomal.

Para corroborar la hipótesis de la LMP, se realizó una inmunocitoquímica contra la CTSB para demostrar si la actividad de la calpaína induce la translocación de la CTSB de los lisosomas hacia el citosol. La inmunoreactividad de la CTSB en los cultivos control presenta un patrón punteado a lo largo del citosol sugiriendo su localización en los lisosomas. Cuando se expuso a las células a AG/RG el patrón punteado de la CTSB se perdió mostrándose difuso (Fig. 7C y D). Asimismo, el fragmento activo de 25 kDa de la CTSB disminuyó en la fracción lisosomal tras la RG e incrementó en el citosol (Fig. 8A), indicando la salida de la CTSB de los lisosomas. Por el contrario, el tratamiento con Calpastatina recuperó el patrón punteado de la CTSB observado en condiciones control y previno la liberación del fragmento activo de la CTSB de los lisosomas al igual que el MDL (Fig. 7C, D y 8A). Sin embargo, el MDL disminuyó el número de partículas positivas a CTSB, sugiriendo un efecto inespecífico de la calpaína sobre la actividad de la CTSB.

Para investigar el mecanismo asociado a la LMP inducida por la AG/RG, analizamos por inmunoblot, el corte de la proteína lisosomal LAMP2 mediado por la calpaína. Las células expuestas a AG/RG mostraron el incremento

significativo del producto de 30 kDa de LAMP2, el cual se previno por inhibición de la calpaína (Fig. 8B). Estos resultados sugieren que la actividad de la calpaína induce la LMP y la subsecuente liberación de la catepsinas, que finalmente contribuye a la muerte neuronal. Es así, que la inhibición de la calpaína preserva la integridad lisosomal y promueve la sobrevivencia neuronal.

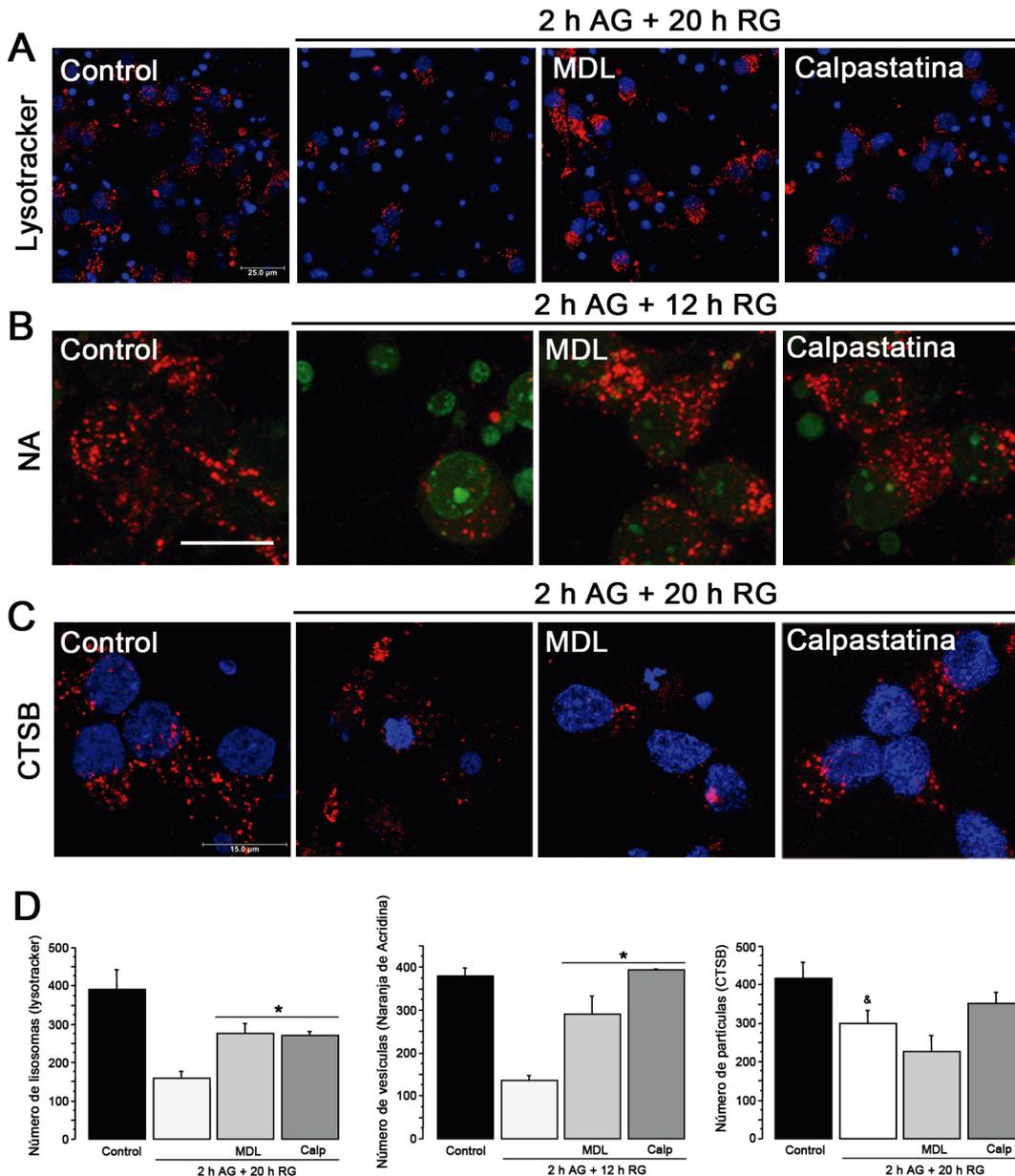


Figura 7. La inhibición de la calpaína incrementa el número de lisosomas, vesículas positivas a naranja de acridina (NA) y partículas inmunoreactivas a CTSB en la fase tardía de la RG. Imágenes representativas y cuantificación de Lysotracker (A y D), Naranja de acridina (B y D) y CTSB (C y D) mostrando el efecto de la inhibición de la calpaína en los cultivos expuestos a AG/RG. MDL y Calpastatina fueron incubados en la RG. Hoechst (azul). Escala= 25 μm (A), 15 μm (B-C). Las barras representan la media ± ES (n=3). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher *p<0.05 vs GD, & vs control.

En su conjunto estos resultados sugieren que la autofagia se desata durante la AG como una respuesta de sobrevivencia ante el estrés energético, pero que la inducción de la LMP por la activación de la calpaína interrumpe la autofagia y promueve la muerte neuronal. Las neuronas capaces de sobrevivir al daño inducido por la AG/RG son capaces de lidiar con la actividad de la calpaína y pueden reactivar la autofagia en etapas mas tardías de la RG, en las que la autofagia tiene una función adaptativa.

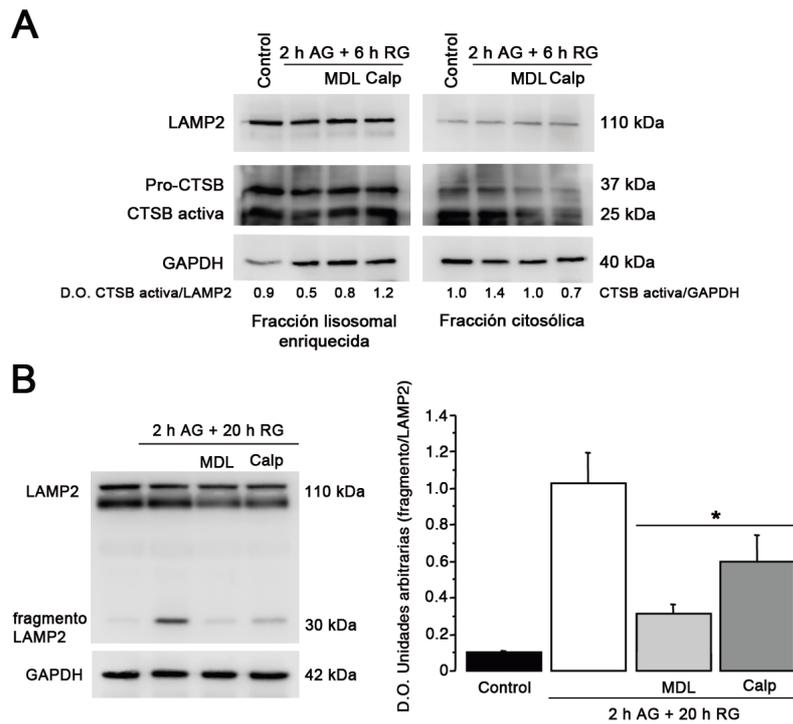


Figura 8. La permeabilidad de la membrana lisosomal inducida por la AG/RG es prevenida por la inhibición de la calpaína. Inmunoblot del fraccionamiento subcelular mostrando el procesamiento de la CTSB (A). Inmunoblot representativo del fragmento de 30 kDa de LAMP2, en presencia y ausencia de los inhibidores de la calpaína (B). Las barras representan la media \pm ES (n=5). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher *p<0.05 vs control.

Sección II

II. La UPR se activa rápidamente en respuesta a la AG.

En respuesta al estrés reticular y como medida para restablecer la homeostasis del RE, se activa la UPR. Esta es una señal adaptativa que favorece la sobrevivencia celular. Por tanto analizamos la dinámica de activación de las

vías de la UPR en respuesta a la AG/RG. Primero analizamos la vía PERK/eIF2 α /ATF4 implicada en la atenuación de la traducción de proteínas y finalmente en la transcripción de chaperonas (Hetz, 2012). La fosforilación de eIF2 α y los niveles de ATF4 incrementaron significativamente durante la AG. Sin embargo durante la RG se mantuvieron elevados durante las primeras horas y disminuyeron progresivamente hasta alcanzar niveles control en etapas tardías de la RG (Fig. 9A-B). La fosforilación de eIF2 α disminuyó desde las 8 h de la RG en adelante, mientras que los niveles de ATF4 se mantuvieron por arriba del control hasta las 16 h sugiriendo que esta proteína se mantiene hasta etapas más tardías. Estos datos sugieren que la AG induce rápidamente el bloqueo de la traducción de proteínas para disminuir la entrada de proteínas nacientes al RE y contrarrestar la acumulación de proteínas mal plegadas.

Por otra parte la fosforilación de IRE1 puede resultar en dos vías de señalización; 1) el splicing alternativo de XBP1 a través de su actividad RNAsa, 2) el reclutamiento de TRAF2 y la subsecuente activación de ASK y JNK. Sin embargo en este trabajo solo nos enfocamos en la vía IRE1/ASK/JNK implicada en la activación de la autofagia y la apoptosis (Tabas & Ron 2011). Durante la AG, la fosforilación de IRE1 incrementó rápidamente. Los niveles de pIRE1 disminuyeron progresivamente a lo largo de la RG (Fig 9C). Por su parte los niveles de p-JNK1/2 incrementaron parcialmente durante la AG, sin embargo únicamente los niveles de JNK2 incrementaron significativamente en etapas tardías de la RG (Fig. 9D). Estos resultados sugieren la rápida activación de la vía de IRE1 en respuesta a la AG y su activación sostenida podría participar en la inducción de la autofagia y la apoptosis durante la RG.

Para contrarrestar la acumulación de proteínas mal plegadas y restablecer la homeostasis del RE, la activación de la UPR induce el incremento en la expresión de chaperonas residentes del RE. La vía de ATF6 es la que principalmente contribuye a la regulación de los niveles de las chaperonas GRP78 y GRP94. Como medida indirecta de la activación de ATF6 analizamos los niveles de ambas chaperonas. Los niveles de GRP78 y GRP94 se mantuvieron sin cambios a lo largo de la AG/RG (Fig. 9E), sugiriendo que la vía de ATF6 posiblemente no participa en nuestro modelo.

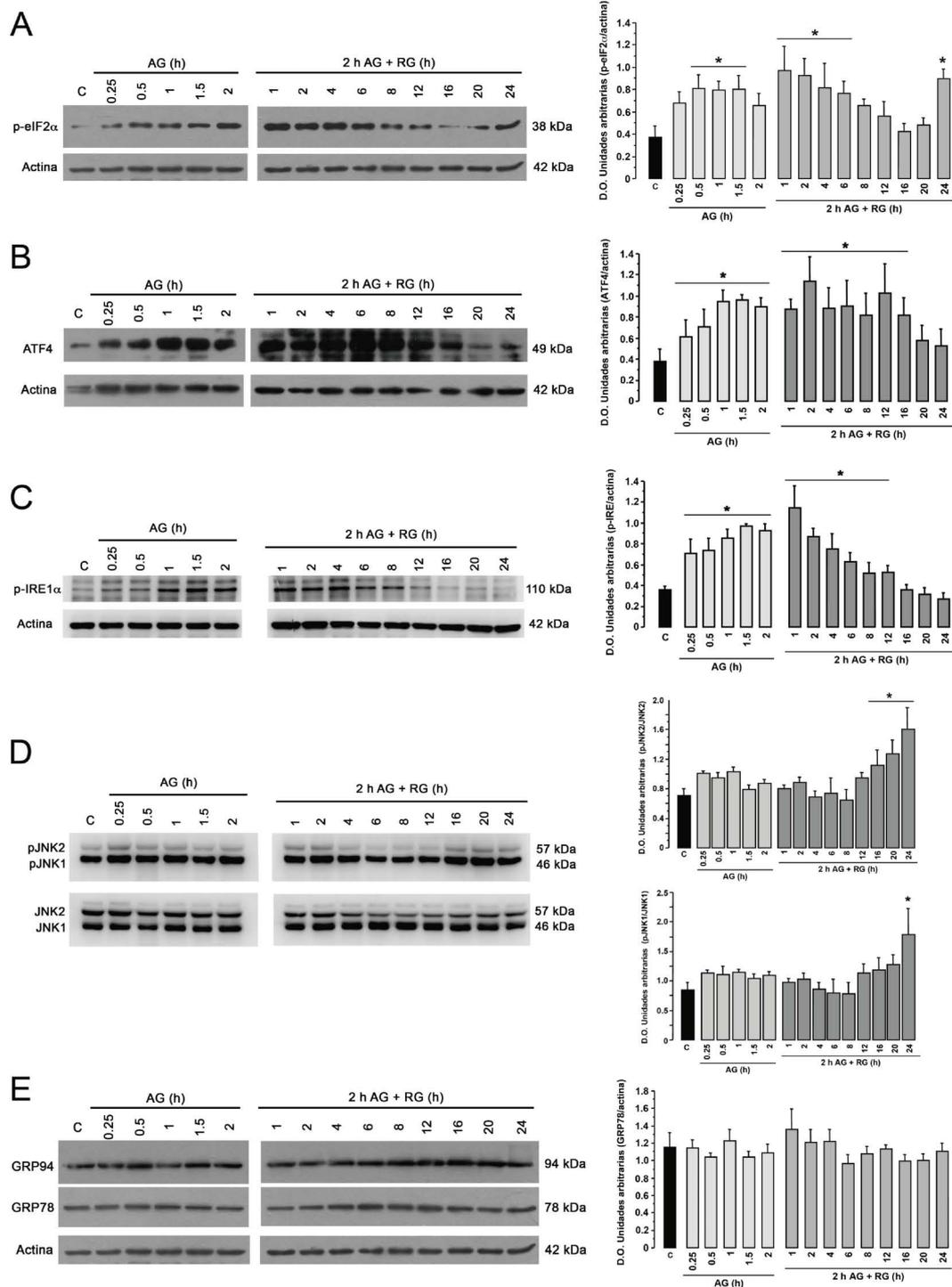


Figura 9. Dinámica de activación de la UPR en respuesta a la AG/RG. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de p-eIF2 α /actina (A), ATF4/actina (B), pIRE1/actina (C), pJNK/JNK (D), GRP78/actina y GRP94 (E) en los cultivos corticales sometidos a AG/RG. Las barras representan la media \pm ES (n=3-5). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher *p<0.05 vs control.

II.I Estrés reticular y la muerte neuronal apoptótica

El estrés reticular crónico y la activación sostenida de la UPR puede resultar en la muerte celular apoptótica (Tabas & Ron 2001). La caspasa-12 es una proteasa residente del RE y su participación en la muerte inducida por AG se ha reportado previamente. Por lo cual analizamos los niveles de la caspasa-12 activa a lo largo de la AG/RG. El fragmento activo de la caspasa-12 incrementó sus niveles rápidamente durante la AG. Cuando la glucosa se reintroduce sus niveles permanecen elevados durante las primeras horas de RG y se recuperan a nivel control en etapas tardías de la RG (Fig. 10A). Para determinar la contribución de la caspasa-12 en la muerte neuronal inducida por la AG/RG, utilizamos el inhibidor específico QATAD, el cual incubamos durante la AG ó la RG (Fig. 10B). Únicamente la inhibición de la caspasa-12 durante la RG incrementó significativamente la sobrevivencia neuronal, sugiriendo que la activación de la caspasa-12 durante la RG participa en la muerte apoptótica.

Posteriormente determinamos si la activación de las vías de PERK o IRE1 participa en la muerte neuronal inducida por la AG/RG. Para ello, inhibimos la vía de PERK con GSK2606414 (inhibidor de la actividad cinasa de PERK) durante la AG ó RG. El tratamiento con GSK durante la AG exacerbó la muerte neuronal (Fig. 10C panel izquierdo), sugiriendo que la atenuación de la traducción de proteínas es una respuesta adaptativa ante la AG. Por el contrario, la inhibición de PERK durante la RG redujo la muerte (Fig. 10C panel derecho), indicando que la inhibición sostenida de la traducción de proteínas es citotóxica. Para evaluar la participación de IRE, utilizamos dos distintos inhibidores, el STF083010 (inhibidor de la actividad de RNAsa) y el SP600125 (inhibidor de la actividad de la cinasa JNK, para evaluar indirectamente la actividad cinasa de IRE que tiene como blanco a JNK). El tratamiento con STF durante la AG, no tuvo efecto alguno en la sobrevivencia neuronal (Fig. 9C panel izquierdo). No obstante, el tratamiento con este compuesto durante la RG incrementó la sobrevivencia neuronal (Fig. 10C panel derecho). Estos datos sugieren que la actividad RNAsa de IRE1 durante la RG contribuye al daño neuronal. Por su parte la inhibición de JNK durante la AG exacerbó la muerte (Fig. 10 panel izquierdo). Sin embargo, la inhibición de JNK durante la

RG previno el daño (Fig. 10C panel derecho), sugiriendo la posible participación de la vía IRE1/ASK/JNK en el daño neuronal inducido por la AG/RG.

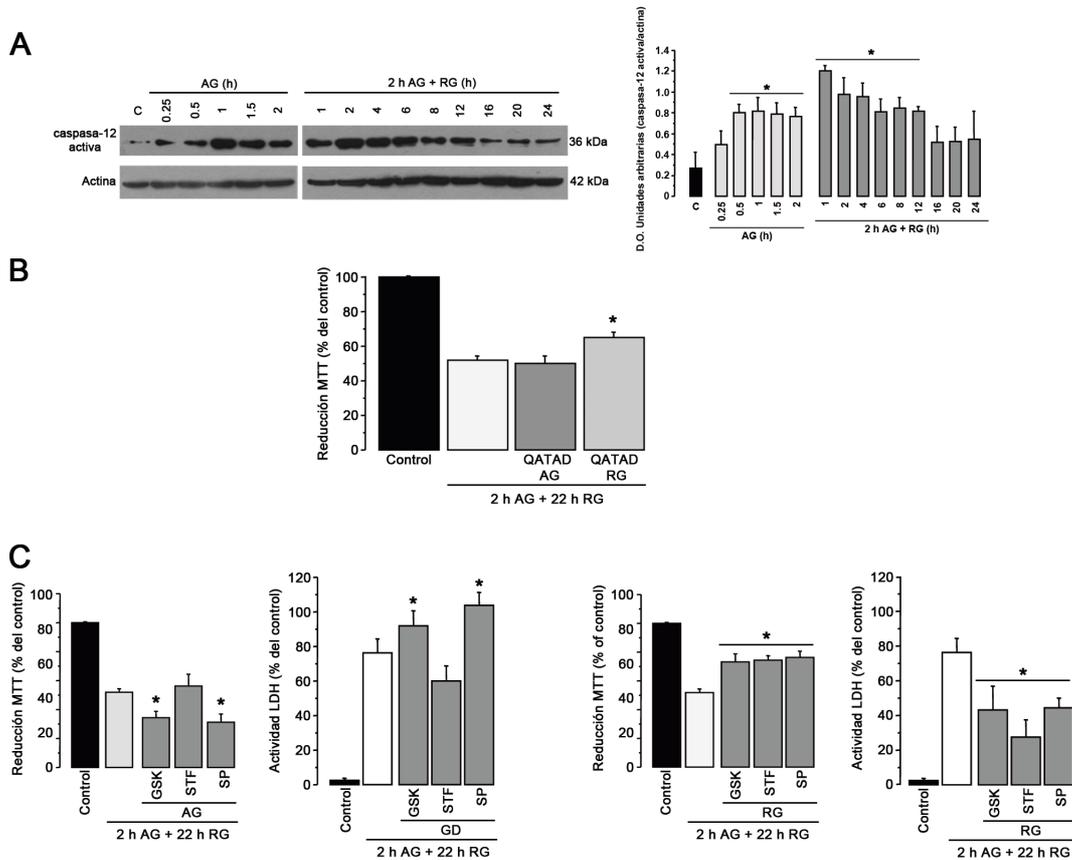


Figura 10. La activación sostenida de la UPR contribuye a la muerte neuronal inducida por la AG/RG. Inmunoblot representativo y cuantificación de los niveles de caspasa-12 activa/actina a lo largo de la AG/RG (A). Efecto de la inhibición de la caspasa-12 en la sobrevivencia neuronal determinado por reducción de MTT (B). El QATAD fue incubado durante la AG ó RG (20 μ M). Efecto de la inhibición de la UPR en la sobrevivencia neuronal determinado por la reducción de MTT y actividad de LDH (C). Los Inhibidores fueron incubados durante la AG (Gráficas izquierda) ó durante la RG (Gráficas derecha). GSK (inhibidor de PERK; 5 μ M), STF (inhibidor RNasa IRE1; 30 μ M) y SP (inhibidor de JNK 10 μ M). Las barras representan la media \pm ES (n=3-5). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher *p<0.05 vs control ó AG.

II.II La activación de la autofagia tardía es dependiente de la vía de IRE1

Bajo condiciones patológicas se ha observado la activación de la autofagia a través de la UPR. Para evaluar si la UPR está implicada en la activación de la autofagia durante la RG, se utilizaron distintos inhibidores farmacológicos y se evaluó a las 20 h de RG los niveles de proteínas y la presencia de vesículas de autofagia. La inhibición de PERK con GSK no tuvo efecto sobre los niveles de LC3-II, pero disminuyó significativamente los niveles de p62 (Fig. 11A-B). Además, el tratamiento con GSK durante la RG incrementó el número de

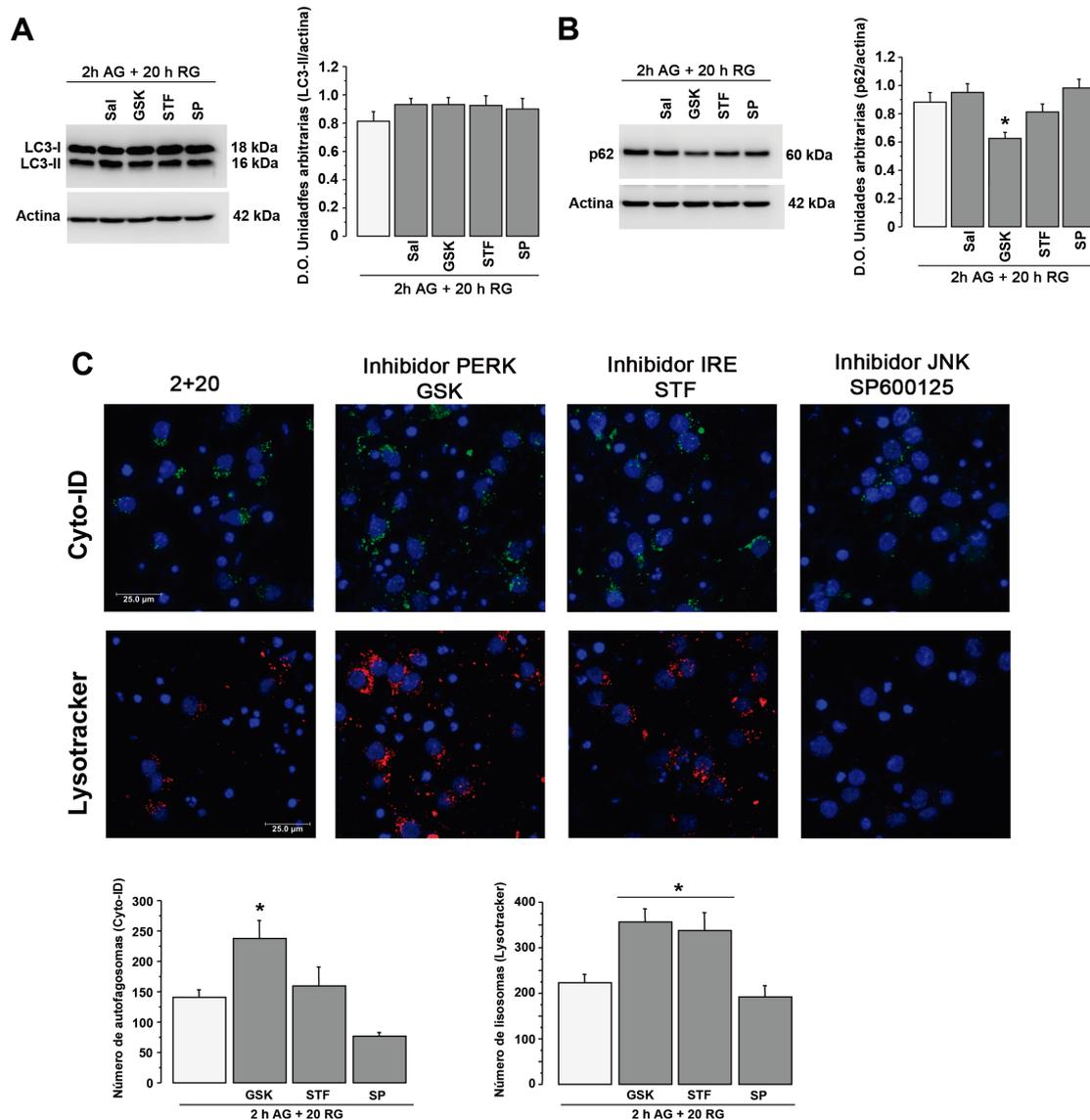


Figura 11. Inhibición de JNK disminuye la formación de autofagosomas y lisosomas. Efecto de la inhibición de la UPR sobre los marcadores ó vesículas de autofagia durante la etapa tardía de la RG. Inmunoblots representativos y cuantificación de los niveles de LC3-II/actina (A) ó p62/SQSTM1/actina (B). Imagenes representativas y cuantificación del número de autofagosomas, Cyto-ID (verde) ó lisosomas, LysoTracker (rojo) (C). Hoechst (azul). Las barras representan la media \pm ES (n=4-5). Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Fisher * $p < 0.05$ vs AG.

autofagosomas y el número total de lisosomas sugiriendo una mayor actividad autofágica en presencia de este inhibidor (Fig. 11C). Estos resultados sugieren que el bloqueo de la traducción de proteínas por la activación de la vía de PERK impide el flujo autofágico a etapas tardías de la RG y que la inhibición de esta vía restablece el flujo, posiblemente al restablecerse la síntesis de proteínas. Por otra parte, la inhibición de la actividad RNAsa de IRE con el STF083010 no tuvo efecto alguno sobre el nivel de las proteínas de autofagia o la presencia de las vesículas autofágicas (Fig. 11A-C). Sin embargo, la inhibición de JNK con el SP600125 durante la fase de RG, no tuvo efecto sobre los niveles de LC3 o p62 (Fig. 11A-B), pero disminuyó drásticamente el número

total de autofagosomas y lisosomas (Fig. 11C), sugiriendo que la activación de JNK durante la RG es importante para formación de autofagosomas y la subsecuente formación de lisosomas.

DISCUSIÓN

La autofagia adaptativa y la activación de la UPR en respuesta al estrés agudo, contribuyen a restaurar las condiciones fisiológicas y ejercer una función citoprotectora. Sin embargo, la autofagia es vulnerable a otras señales de estrés que pueden impedir su función. A su vez, la activación sostenida de la UPR puede ir en detrimento de la función celular y contribuir a la activación de mecanismos de muerte neuronal. Los mecanismos moleculares en respuesta al estrés energético provocados por la hipoglucemia no se conocen del todo, ni tampoco su dinámica a través de la AG y RG. Por tanto, hemos analizado la dinámica de activación de la autofagia y de la UPR a lo largo de la AG/RG, y hemos evidenciado el mecanismo por el cual la autofagia falla en prevenir la muerte neuronal inducida por el estrés energético. Asimismo, hemos mostrado que la activación sostenida de la UPR contribuye al daño neuronal y a la activación de la autofagia tardía.

Los resultados muestran la formación y acumulación de autofagosomas durante la AG, mientras que el flujo autofágico es reactivado ante la RG. Estudios previos realizados en neuronas hipocámpales y granulares han mostrado que el daño excitotóxico induce el bloqueo del flujo autofágico y la acumulación de autofagosomas, lo cual contribuye al daño neuronal (Sadasivan et al., 2010; Kulbe et al., 2014). Los resultados de este trabajo demuestran que la excesiva acumulación de autofagosomas durante la AG, resulta de un flujo autofágico deficiente posiblemente debido a la falla energética. A favor de esta hipótesis hemos demostrado que la administración de beta-hidroxibutirato (BHB), un cuerpo cetónico que puede actuar como sustrato energético alternativo a la glucosa, previene la caída de los niveles de ATP y la muerte neuronal estimulando el flujo autofágico (Camberos-Luna et al., 2015)

La muerte neuronal inducida por la AG/RG, ocurre progresivamente durante las etapas tardías de la RG. Durante el progreso de la muerte, encontramos que las células que contenían autofagosomas, no fueron positivas a Anexina V, sugiriendo que aquellas neuronas sobrevivientes activaron la autofagia como una señal de sobrevivencia. Sin embargo, este resultado contrasta con el hecho, de que la inhibición farmacológica o genética de la autofagia, confirió protección en contra de la muerte neuronal. Más aún, la inhibición de la degradación autofágica por cloroquina o cloruro de amonio también previno la muerte. Estos datos, sugieren que previniendo la sobrecarga de autofagosomas durante la AG y la subsecuente degradación excesiva durante la RG, se incrementa la viabilidad neuronal. Es más, el tratamiento con 3-MA, que reduce el número de autofagosomas, también reduce el número de lisosomas. De esta forma se disminuyen los posibles blancos moleculares de la calpaína y se previene la LMP. Estos resultados concuerdan con los publicados recientemente, donde la inhibición de la autofagia reduce la LMP debido al incremento de la expresión de la Hsp70 y por tanto se previene la apoptosis (Zhou et al., 2017). Sin embargo, no podemos descartar que el efecto protector del 3-MA, CQ y NH₄Cl se deba a la participación de muerte autofágica, debida a la excesiva degradación de componentes celulares.

Los resultados sugieren que la autofagia es activada en la mayoría de las células como señal de sobrevivencia en respuesta a la AG. Posteriormente durante las primeras horas de la RG, el flujo autofagico es restablecido y es seguido de la activación de la calpaína. La actividad de la calpaína genera la degradación de la proteína de membrana lisosomal, LAMP2, lo que resulta en la LMP y la muerte neuronal. Los resultados sugieren que las neuronas sobrevivientes al daño son aquellas capaces de lidiar con la disfunción autofágica mediada por la calpaína, ya que presentan un gran número de autofagosomas, autolisosomas/lisosomas y partículas inmunoreactivas a CTSB.

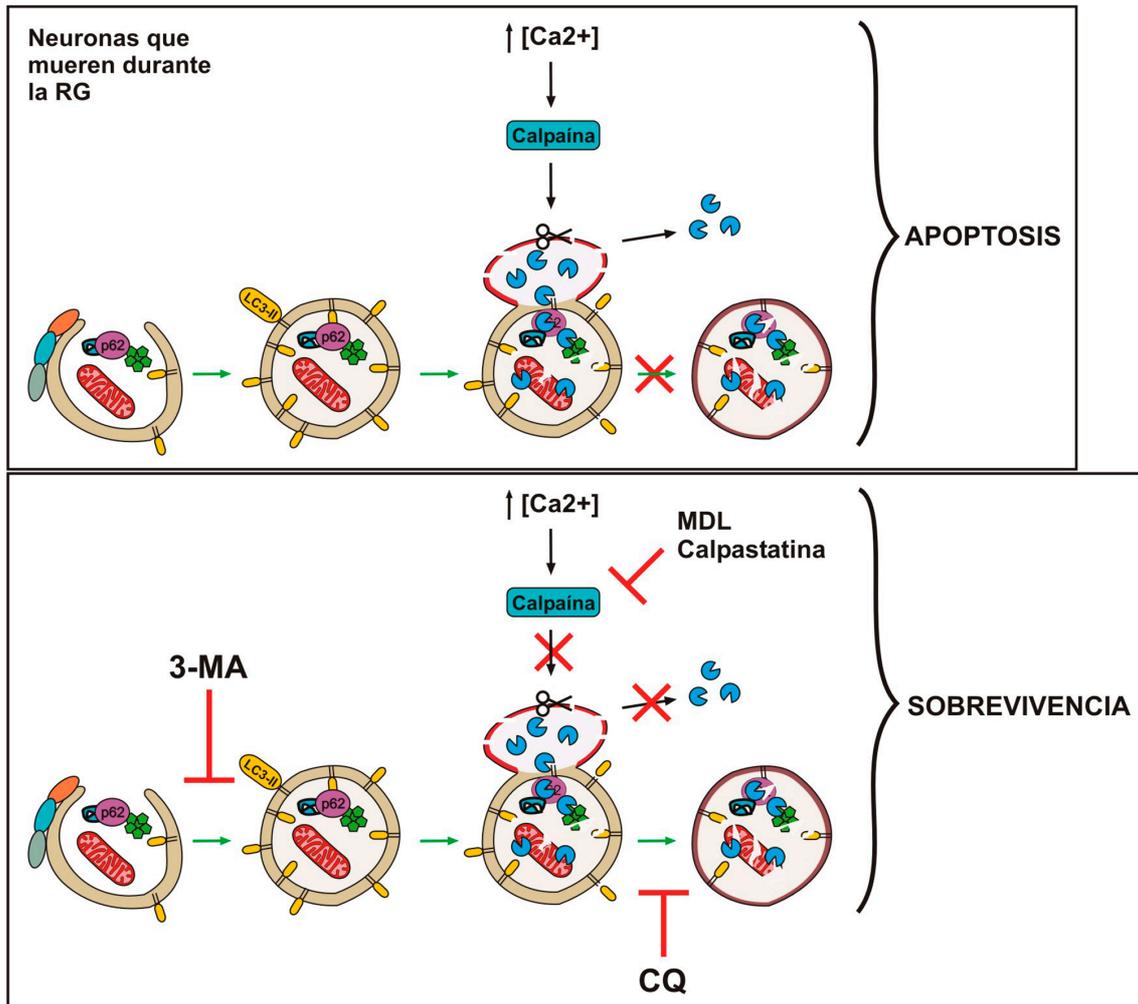
Los datos sugieren que la activación de la calpaína interfiere con la respuesta adaptativa de la autofagia convirtiéndola en una señal aberrante que finalmente contribuye a la muerte neuronal. Reportes previos demuestran que la calpaína

participa en la muerte neuronal tanto en modelos de isquemia como de AG (Bever et al., 2008; Páramo et al., 2013). La calpaína tiene como blancos moleculares distintas proteínas de la membrana lisosomal, resultando en la LMP y la liberación del contenido lisosomal hacia el citosol. Durante la RG la disminución del número de lisosomas, de vesículas positivas a naranja de acridina y de partículas inmunoreactivas a CTSB sugieren la LMP. Además, el fragmento de LAMP2 y la liberación del fragmento activo de la CTSB a la fracción citosólica durante la RG confirman la LMP. Importantemente, la inhibición de la calpaína previno la LMP e incrementó considerablemente la sobrevivencia neuronal, sugiriendo que la LMP contribuye a la muerte neuronal, siendo las catepsinas importantes efectoras de la muerte.

Las catepsinas son proteasas lisosomales involucradas en la degradación autofágica y son las principales efectoras de la LMP llevando a la apoptosis (Boya & Kroemer 2008). Por tanto se les considera como enlaces moleculares entre la autofagia y la apoptosis. La liberación de la CTSB de los lisosomas y su redistribución hacia el citosol a causa de la LMP inducida por la calpaína, ha sido propuesta como factor importante en la muerte neuronal isquémica (Yamashima et al., 1996; 1998; 2016). La recuperación de la inmunoreactividad de la CTSB correlaciona con el incremento en la sobrevivencia neuronal. Es así que estos resultados indican que la actividad de las catepsinas extra-lisosomales podrían contribuir al daño neuronal. Acorde con estos datos, se ha propuesto que después de la LMP, la CTSB induce el corte de la proteína Bid, la liberación del citocromo C y la activación de caspasas (Arandis et al., 2012). Asimismo, la CTSB puede traslocarse al núcleo e inducir daño nuclear y la condensación de la cromatina (Li et al., 2003). En el esquema 2 se describen gráficamente los mecanismos que llevan a la falla de la autofagia durante la GD/GR que se dilucidaron en esta tesis.

Para contrarrestar el estrés reticular y la acumulación de proteínas mal plegadas, la célula activa la UPR, la cual tiene como tarea primaria restablecer la homeostasis del RE y de la célula. Nuestros resultados muestran que la falla energética inducida por la AG, provoca la rápida activación de la UPR (PERK e IRE1), contrarrestando la acumulación de proteínas mal plegadas. Cuando la

glucosa es reintroducida, la UPR persiste y se resuelve en etapas tardías de la RG.



Esquema 2: La autofagia es activada como mecanismo adaptativo en respuesta al estrés energético. Sin embargo es vulnerable a la actividad de la calpaína, convirtiendo una respuesta adaptativa en aberrante a través de la disfunción lisosomal, llevando a la muerte celular. La inhibición de la autofagia previene la acumulación de vesículas autofágicas disminuyendo los blancos posibles de la calpaína, favoreciendo la supervivencia celular.

Estudios previos de nuestro laboratorio, han demostrado la participación de la vía de PERK/eIF2a en el daño neuronal inducido por la AG en neuronas hipocampales (García de la Cadena et al., 2014). Tras la activación de PERK el incremento en los niveles de CHOP puede resultar en la disminución de los niveles de BCL2 y por tanto en la activación de la vía apoptótica mitocondrial (Tabas & Ron 2011). Sin embargo, bajo nuestras condiciones no se pudieron detectar los niveles de CHOP por inmunoblot, sugiriendo que posiblemente CHOP no está involucrada en el daño neuronal inducido por AG/RG. La inhibición farmacológica de PERK durante la AG, incrementó el daño inducido por la AG/RG, sugiriendo que disminuir la traducción de proteínas es una

respuesta adaptativa que favorece la supervivencia neuronal ante el estrés energético. Por el contrario la inhibición de PERK durante la RG confirió protección contra la AG/RG. Estos datos concuerdan con estudios previos donde la inhibición de PERK reduce la neurodegeneración inducida por la acumulación de la proteína tau o la proteína priónica (Moreno et al., 2013; Radford et al., 2015). La activación crónica de PERK puede inducir la pérdida sináptica y la neurodegeneración por medio de la disminución de la síntesis de proteínas que está controlada por la fosforilación de eIF2 α . Es por ello que cualquier intervención farmacológica capaz de restablecer la síntesis de proteínas a pesar de no resolver el estrés reticular, favorece la supervivencia neuronal y previene la neurodegeneración (Halliday et al., 2017).

La apoptosis inducida por estrés reticular también puede ser mediada por la activación de la caspasa-12 a través de IRE1/TRAF2 (Yoneda et al., 2001). Nuestros resultados muestran la participación de la caspasa-12 durante la AG/RG, la cual correlaciona con la aparición de células positivas a EtH y Anexina V. Particularmente la activación de la caspasa-12 durante la RG participa en la muerte apoptótica. Acorde con estos datos, estudios previos en cultivos de neuronas hipocámpales mostraron que la activación de la caspasa-12 mediada por la calpaína y la caspasa-7 contribuye a la muerte neuronal durante la AG (García de la Cadena et al., 2014). Sin embargo, se requiere realizar más experimentos para conocer los blancos moleculares río debajo de la activación de la caspasa-12.

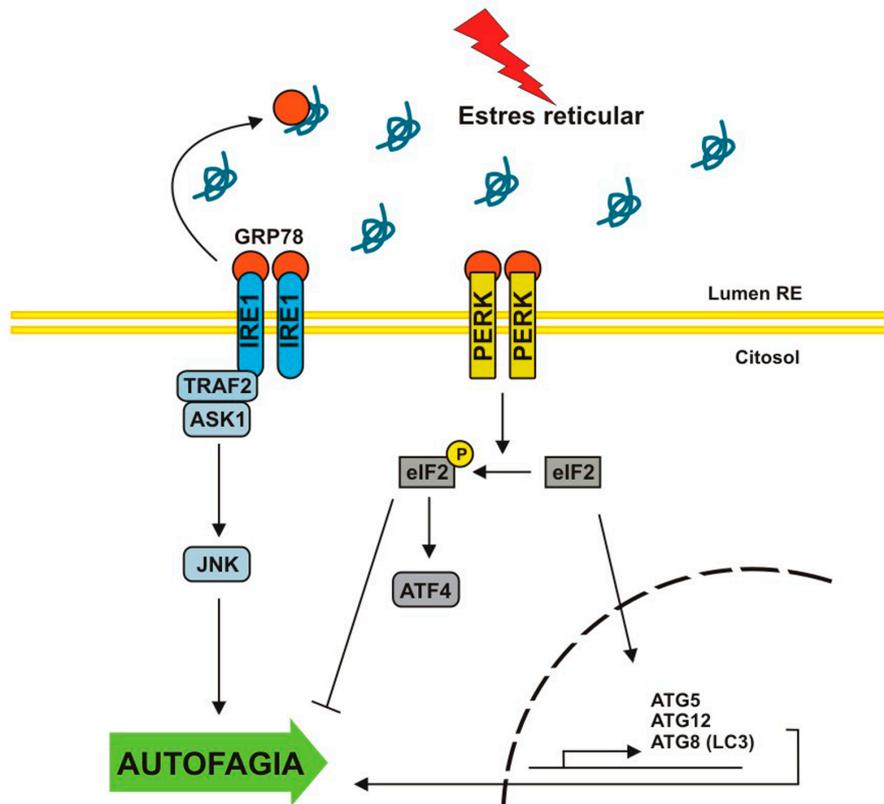
Bajo condiciones de estrés reticular, se considera que la activación de IRE1 determina el destino celular (Chen & Brandizzi 2013). La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 durante la RG protegió contra el daño inducido por la AG/RG. Estos datos sugieren que la excesiva actividad RNAsa de IRE1 contribuye al daño neuronal, sin embargo se requiere realizar más experimentos para conocer el mecanismo río abajo responsable del daño celular. Además, del splicing no convencional de XBP1, IRE1 promueve la apoptosis a través de la activación de RIDD (regulated IRE1-dependent decay), el cual induce la represión de miRNAs anti-apoptóticos (Chen & Brandizzi 2013). Por otra parte, la activación de JNK a través de IRE1 es determinante

para la supervivencia celular bajo condiciones de estrés reticular, ya que se encarga de regular la activación de proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas. Bajo nuestras condiciones, la inhibición de JNK durante la RG incrementó la supervivencia neuronal, sugiriendo que JNK promueve la apoptosis posiblemente a través de la fosforilación e inhibición de proteínas anti-apoptóticas (Bcl2, Bcl-XL) o por medio de la activación de Bid/Bim que favorecen la apoptosis (Merksamer & Papa 2010).

La autofagia puede ser activada a través de la UPR como mecanismo de degradación y así ayudar a disminuir la acumulación de proteínas mal plegadas. Bajo condiciones patológicas como las enfermedades neurodegenerativas, se ha observado la activación de la autofagia a través de la vía de PERK o IRE1 (Rashid et al., 2015). La inhibición de PERK aparentemente restableció el flujo autofágico ya que se incrementó el número de lisosomas y disminuyeron los niveles de p62/SQSTM1. Posiblemente la disminución de la traducción debida a la activación prolongada de PERK/eIF2a evita la expresión de proteínas esenciales para la autofagia (i.e. ATG5, ATG12). Por tanto, facilitar la traducción de proteínas al inhibir PERK permite la expresión de proteínas de la autofagia permitiendo restablecer el flujo y contrarrestar el estrés reticular.

La inhibición de JNK durante la RG disminuyó drásticamente la formación de autofagosomas y el número total de lisosomas. Sin embargo, no tuvo efecto sobre los marcadores de autofagia. Estos datos sugieren que la activación de la autofagia en etapas tardías de la RG, podría ocurrir a través de la activación de IRE1/JNK. Previamente se ha reportado la activación de la autofagia como señal de supervivencia a través de la vía IRE1/ASK/JNK, donde la inhibición de la actividad cinasa de IRE1 evita la formación de autofagosomas, aunque no la lipidación de LC3-II (Ogata et al., 2006). La activación de JNK disminuye la interacción Bcl2/BECN1 promoviendo la autofagia. De aquí que la inducción de la autofagia tardía durante la RG pueda ser consecuencia de la activación de la vía de IRE1/JNK. El efecto protector del inhibidor de JNK durante la RG, es compatible con los datos de 3-MA y del silenciamiento de ATG7, que indican que la inhibición de la autofagia previene la muerte, ya que en las presentes

condiciones ésta ocurre de manera aberrante. En el esquema 3 se muestran las vías por las que la UPR puede estimular la autofagia.



Esquema 3: Las vías de PERK e IRE1 se activan rápidamente en respuesta al estrés energético. Sin embargo la activación sostenida de la vía de PERK impide el flujo autofágico causando la acumulación de autofagosomas. Por el contrario la vía de IRE1 a través de la activación de JNK favorece la formación de autofagosomas.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que la autofagia y la UPR son rápidamente activadas como señales de sobrevivencia en respuesta al estrés energético. Durante la RG, la activación de la calpaína induce la LMP y la salida de la CTSB dando lugar a la autofagia deficiente. Más aún la activación persistente de la UPR a través de PERK evita el restablecimiento de la síntesis de proteínas contribuyendo al flujo autofágico deficiente y la apoptosis. Las neuronas sobrevivientes son capaces de inducir autofagia posiblemente a través de IRE1/JNK.

Finalmente, en el presente trabajo demostramos por primera vez que la respuesta adaptativa de la autofagia inducida por al AG/RG es vulnerable a la actividad de la calpaína y falla en prevenir el daño neuronal. No obstante, más

experimentos son necesarios para entender la interacción existente entre la UPR y la autofagia en las presentes condiciones.

REFERENCIAS

Adhami F, G Liao, YM Morozov, A Schloemer, VJ Schmithorst, JN Lorenz, RS Dunn, CV Vorhees, M Willis-karp, JL Degen, RJ Davis, N Mizushima, P Rakic, BJ Dardzinski, SK Holland, FR Sharp & CY Kuan. 2006. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Neurobiology*. 169: 566-583.

Auer RN, Kalimo H, Olsson Y & Sisjö BK. The temporal evolution of hypoglycemic brain damage. I. Light- and electron-microscopic findings in the rat cerebral cortex. *Acta neuropathologica* 1985; 67: 13-24.

Arnandis T, Ferrer-Vicens I, García-Trevijano ER, Miralles VJ, García C, Torres L et al. Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization. *Cell Death Differ* 2012; 19: 1536-48.

Bevers MB, Neumar RW. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 655-73.

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008; 27: 6434-51.

Camberos-Luna L, Gerónimo-Olvera C, Montiel T, Rincon-Heredia R, Massieu L. The ketone body b-hydroxybutyrate stimulates the autophagic flux and prevents neuronal death induced by glucose deprivation in cortical cultured neurons. *Neurochem Res* 2016; 41: 600-9.

Chen Y, Brandizzi F. IRE1: ER stress sensor and cell fate executor. *Trends Cell Biol* 2013; 23: 547-55.

Carlioni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis* 2008; 32:329-39.

Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21: 142-50.

Cryer PE. Hypoglycemia, functional brain failure and brain death. *The journal of clinical investigation* 2007;117: 868-870.

Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM & Samali A. Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2012; 1173-4.

Gade P, Manjegowda SB, Nallar SC, Maachani UB, Croos AS, Kalvakolanu DV. Regulation of the death-associated protein kinase 1 expression and autophagy

via ATF6 requires apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2014; 21: 4033-48.

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Björklund K, Kroemer G. Autophagy in acute brain injury. *Nat Rev Neurosci* 2016; 17: 467-84.

García de la Cadena S, K Hernández Fonseca, I Camacho-Arroyo & L Massieu. Glucose deprivation induces reticulum stress by PERK pathway and caspase-7 and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis*. 2014 19: 414-427

Gozuacik D, S Bialik, T Raveh, G Mitou, G Shohat, H Sabanay, N Mizushima, T Yoshimori & A Kimchi. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 1875-1886.

He C & DJ Klionsky. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67-93.

Hernández-Fonseca K & L Massieu. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 2005; 82:196-205

Hernández-Fonseca K, Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1768-80.

Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 89-102.

Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B et al. Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α . *Science* 2006; 312: 572-6.

Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006; 313: 104-7.

Koike M, M Shibata, M Tadakoshi, K Gotoh, M Komatsu, S Waguri, N Kawahara, K Kuida, S Nagata, E Kominami, K Tanaka & Y Uchiyama. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *The American Journal of Pathology* 2008; 172: 454-469.

Kouyama Y, E Fujita, I Tanida, T Ueno, A Isoai, H Kumagai, S Ogawa, RJ Kaufman, E Kaufman, E Kominami & T Momoi. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, and Essential step for autophagy formation. *Cell death and differentiation* 2007;14: 230-239.

Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12:1-222.

Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self eating. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 1125-36.

Li W, Yuan XM, Ivanova S, Tracey KJ, Eaton JW, Brunk UT. 3-aminopropanal, formed during cerebral ischaemia is a potent lysosomotropic neurotoxin. *Biochem J* 2003; 15: 429-36.

Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ* 2015; 22: 367-76.

Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpster RM, Wei Y, Ginet V, Zhang L et al. Autosis is a Na⁺, K⁺ ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 20364-71.

Sadasivan S, Zhang Z, Larner SF, Liu MC, Zheng W, Kobeissy FH, Hayes RL, Wang KW. Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is accompanied by autophagy induction and late onset autophagic cell death phenotype. *BMC Neurosci* 2010; 11:21.

Kulbe JR, Levy JM, Coultrap SJ, Thorburn A, Bayer KU. Excitotoxic glutamate insults block autophagic flux in hippocampal neurons. *Brain Res* 2014; 1542: 12-19.

Margariti A, Li H, Chen T, Vizcay-Barrena G, Alam S, Karamariti E, Xiao Q et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem* 2013; 288: 85-72.

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genev Dev* 2004; 18: 3066-77.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; 21:1249-59

Mckenna MC, Gruetter R, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Energy Metabolism of the Brain. Chapter 31. *Basic Neurochemistry*. 7th ed. 2006.

Merksamer PI, Papa FR. The UPR and cell fate at a glance. *Journal of Cell Science* 2010; 123: 1003-1006.

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; 147: 728-41.

Moreno JA, Halliday M, Molloy C, Radford H, Verity N, Axten JM, et al. Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Sci Transl Med* 2014; 5: 206ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.3006767.

Norman JM, Cohen GM, Bampton ET. The in vitro cleavage of the hAtg by cell death proteases. *Autophagy* 2010; 6: 1042-56.

Ogata T, Nakamura Y, Tsuji K, Shibata T, Kataoka K. A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochem Res* 1995; 20:737–743.

Páramo B, Hernández-Fonseca K, Estrada-Sánchez AM, N Jiménez, A Hernández-Cruz & L Massieu. 2010. Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 2010 167: 1057-1069.

Páramo B, T Montiel, DR Hernández-Espinosa, M Rivera-Martínez, J Morán & L Massieu. Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013; 45: 2596-2604.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122: 927-39.

Qin AP, Liu CF, Qin YY, Hong LZ, Xu M, Yang L, Liu J, Qin ZH, Zhang HL. Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy* 2010; 6:738-753.

Radford H, Moreno JA, Verity N, Halliday M, Mallucci GR. PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol* 2015; 130: 633-42.

Rami A & D Kögel. 2008. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra. *Autophagy* 2008; 4: 422-426.

Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy* 2015; 11: 1956-1977.

Ravikumar et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol rev* 2010; 90: 1383-1435.

Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanism of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 2012; 22: 29-34.
Sadasivan S, Zhang Z, Larner SF, Liu MC, Zheng W, Kobeissy FH, Hayes RL, Wang KW. Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is

accompanied by autophagy induction and late onset autophagic cell death phenotype. *BMC Neuroscience* 2010; 11:21.

Sahara S, Yamashita T. Calpain-mediated Hsp70.1 cleavage in hippocampal CA1 neuronal death. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393: 806-11.

Sandberg M, Butcher SP, Hagberg H. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulina-induced hypoglycemia: In vivo Dialysis of the rat hippocampus. *Journal of neurochemistry* 1986; 47: 178-183.

Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* 2015; 40: 141-8.

Sheng R, Zhang LS, Han R, Liu XQ, Gao B, Qin ZH. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy* 2010; 6: 482-94.

Suh S, K Aoyama, Y Che, P Garnier, Y Matsumori, E Gum, J Liu, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hipoglicemia. *The Journal of neuroscience* 2003; 23: 10681-90

Suh S, ET Gum, AM Hamby, PH Chan & RA Swanson. Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of NADPH oxidase. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117: 910-918.

Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 2014; 16: 495-501.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 184-90.

Tanida I. Autophagy basics. *Microbiol immunol*; 2011; 55: 1-11.

Tkacs NC, Pan Y, Raghupathi R, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Cortical fluoro-jade staining and blunted adrenomedullary response to hypoglycemia after noncoma hypoglycemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1645-55.

Vidal RL, Figueroa A, Court FA, Thielen P, Molina C, Wirth C et al. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Human Molecular Genetics* 2012; 21: 2245-2262.

Villalpando-Rodríguez GE, Torriglia A. Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833:2244-53.

Wen YD, R Sheng, LS Zhang, R Han, X Zhang, XD Zhang, F Han, K Fukunaga & ZH Qin. Neuronal injury in rat modelo of permanente focal cerebral ischemia

is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 2008; 4: 762-769

Wieloch T. Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* 1985; 8: 681-683.

Yamashima T, Saido TC, Takita M, Miyazawa A, Yamano J, Miyakawa A et al. Transient brain ischaemia provokes Ca²⁺, PIP₂ and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 1932-44.

Yamashima T, Kohda Y, Tsuchiya K, Ueno T, Yamashita J, Yoshioka T, Kominami E. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA074: a novel strategy for neuroprotection based on "calpain-cathepsin hypothesis". *Eur J Neurosci* 1998; 10: 1723-33.

Yamashima T. Can "calpain-cathepsin hypothesis" explain Alzheimer neuronal death?. *Ageing Res Rev* 2016; doi: 10.1016/j.arr.2016.05.008

Yousefi S, Perzzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Brunner T, Simon HU. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1124-32.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T et al. Activation of caspase-12, and endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress- *J Biol Chem* 2001; 276:13935-40.

Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *Plos One* 2011; 6:e17894.

Zhang XY, Zhang TT, Song DD, Zhou J, Han R, Qin ZH, Sheng R. Endoplasmic reticulum chaperone GRP78 is involved in autophagy activation induced by ischemic preconditioning in neural cells. *Mol Brain* 2015; 26: 20. doi: 10.1186/s13041-015-0112-3.

Zhou XY, Luo Y, Zhu YM, Liu ZH, Kent TA, Rong JG et al. Inhibition of autophagy blocks cathepsins-tBid-mitochondrial apoptotic signaling pathway via stabilization of lysosomal membrane in ischemic astrocytes. *Cell Death Dis* 2017; 8:e2618.