

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética 

Memoria del Trabajo de Fin de Máster

Estudio del papel de la Metformina sobre la autofagia en condrocitos humanos

Estudo do papel da Metformina sobre a autofaxia en condrocitos humanos

The role of Metformin on autophagy in human chondrocytes

Christian García Domínguez

Julio, 2019

*Director(es) Académico(s): Beatriz Caramés Pérez
María José López Armada*

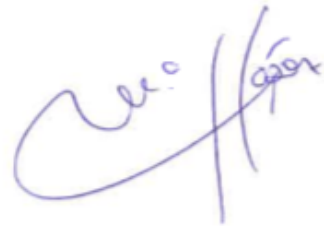
Firmas Trabajo de Fin de Máster

Director(es) Académico(s)

Beatriz Caramés Pérez

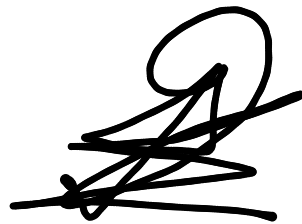


María José López Armada



Alumno

Christian García Domínguez



ÍNDICE

Resumen	1
Resumo	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1 Metformina: usos en la actualidad y mecanismos moleculares conocidos	3
1.2 Mecanismo de Homeostasis Celular: La autofagia	4
1.3 Importancia de la Autofagia en Condrocitos Humanos	7
2. Objetivos	10
3. Material y métodos	11
3.1 Línea celular	11
3.2 Descongelación, cultivo y mantenimiento celular	11
3.3 Extracción de ARN a partir de células T/C28a2	12
3.4 Realización de una RT-PCR (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>) para la obtención de ADNcomplementario (ADNc) a partir de ARNmensajero (ARNm)	14
3.5 Elaboración de una qPCR (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) o PCR a tiempo real a partir de ADNc mediante el uso de sondas TaqMan	15
3.6 Array de expresión de genes de autofagia a partir de ADNc mediante qPCR usando el fluoróforo SYBR Green	17
3.7 Análisis de los datos	18
4. Resultados y Discusión	20
4.1 Optimización de las condiciones a utilizar para la realización de un array de genes	20
4.2 Array de expresión genes de autofagia a partir de ADNc obtenido de células T/C28a2 incubadas con Metformina	24
4.3 Estudio de la expresión génica en células T/C28a2 como validación del efecto de la Metformina ante condiciones de estrés inflamatorio.	28
5. Conclusiones	32
6. Bibliografía	33
ANEXO	I
Tabla A1	I
Tabla A2	V

Resumen

La Metformina es un fármaco ampliamente utilizado para tratar la Diabetes Tipo 2, y recientemente se ha descrito como un fármaco protector frente al envejecimiento celular. Se conoce que su mecanismo de acción principal se centra en la activación de AMPK, uno de los reguladores metabólicos más importantes que parece desencadenar una activación del mecanismo de autofagia para mantener la homeostasis celular. De hecho, el mecanismo de autofagia es clave para la supervivencia de los condrocitos, único tipo celular del cartílago articular. En este estudio se llevó a cabo el análisis de los niveles de expresión de genes relacionados con la autofagia en condrocitos humanos inmortalizados estimulados con Metformina para investigar que dianas de acción regula el medicamento. Los resultados mostraron incrementos significativos en los genes PTEN y GABARAPL1, lo que parece indicar que el fármaco actúa protegiendo los condrocitos de los procesos inflamatorios y contribuye a la degradación de las mitocondrias dañadas. Sin embargo, los análisis de validación con estímulos de Interleucina 1 β en combinación con Metformina no mostraron resultados concluyentes en base al efecto protector frente a la inflamación, de modo que será necesario ampliar el número de experimentos para conseguir una estadística más robusta así como analizar los niveles de expresión en condrocitos artrósicos que presenten un daño mayor para corroborar la existencia de un efecto protector de la Metformina sobre el cartílago humano y, por lo tanto, ofrecer una nueva vía de tratamiento para una enfermedad con tanta incidencia como la artrosis.

Resumo

A Metformina é un fármaco amplamente utilizado para tratar a Diabetes de Tipo 2, e recentemente describiuse coma un fármaco protector fronte ao envellecemento. Coñécese que o seu mecanismo de acción principal céntrase na activación de AMPK, un dos reguladores metabólicos máis importantes que parece desencadear unha activación do mecanismo de autofaxia para manter a homeostase celular. De feito, o mecanismo de autofaxia é clave para a supervivencia dos condrocitos, único tipo celular do cartílago articular. Neste estudo levouse a cabo o análise dos niveis de expresión dos xenes relacionados coa autofaxia en condrocitos humanos inmortalizados estimulados con Metformina para investigar que dianas de acción regula o medicamento. Os resultados amosaron incrementos significativos nos xenes PTEN e GABARAPL1, o que parece indicar que o fármaco actúa protexendo os condrocitos dos procesos inflamatorios e contribúe á degradación das mitocondrias danadas. Sen embargo, os análises de validación con estímulos de

Interleucina 1 β en combinación coa Metformina non amosaron resultados concluíntes en base ao efecto protector fronte á inflamación, de modo que será necesario ampliar o número de experimentos para conseguir unha estatística máis robusta así como analizar os niveis de expresión en condrocitos artrósicos que presenten un maior dano para corroborar a existencia dun efecto protector da Metformina sobre o cartílago humano e, polo tanto, ofrecer unha nova vía de tratamento para unha enfermidade con tanta incidencia como a artrose.

Abstract

Metformin is a drug widely used to treat Type 2 Diabetes, and has recently been described as a protective drug against cell aging. It is known that its main mechanism of action focuses on the activation of AMPK, one of the most important metabolic regulators that seems to trigger an activation of the autophagy mechanism to maintain cellular homeostasis. In fact, the autophagic mechanism is key to the survival of chondrocytes, the only cellular type of articular cartilage. In this study the analysis of autophagy-related gene expression levels in immortalized human chondrocytes stimulated with Metformin was performed to investigate which action targets the drug regulates. The results showed significant increases in the PTEN and GABARAPL1 genes, which seems to indicate that the drug acts by protecting the chondrocytes from inflammatory processes and contributes to the degradation of damaged mitochondria. However, the validation analyses with stimuli of Interleukin 1 β in combination with Metformin did not show conclusive results based on the protective effect against inflammation, so it will be necessary to expand the number of experiments to achieve a more robust statistic as well as to analyze the levels of expression in arthritic chondrocytes that present a greater damage to corroborate the existence of a protective effect of Metformin on human cartilage and, therefore, offer a new treatment route for a disease with as much incidence as osteoarthritis.

1. Introducción

1.1 Metformina: usos en la actualidad y mecanismos moleculares conocidos

La Metformina es un fármaco que actúa como antihiper glucémico (reduce los niveles de producción de glucosa hepática) y actualmente está siendo utilizado como tratamiento recomendado para tratar la Diabetes de Tipo 2, que consiste en la incapacidad de metabolizar de manera eficaz la glucosa, resultando en niveles elevados de azúcar en sangre, siendo más común en gente adulta de hábitos sedentarios, que sufren obesidad o que no llevan una alimentación equilibrada (Knowler *et al.*, 2002).

Según se ha ido investigando en el mecanismo de acción de la Metformina, todo apunta a una actuación directa reduciendo levemente el funcionamiento del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Viollet *et al.*, 2012), alterando el balance energético de las mitocondrias y activando en consecuencia uno de los reguladores metabólicos más importantes, el AMPK (quinasa dependiente de AMP). Este mecanismo de activación parece establecer una relación con los efectos beneficiosos que produce la Metformina (Zhou *et al.*, 2001), ya sea frente a los síntomas de la Diabetes Tipo 2 u otros efectos como el aumento de la esperanza de vida detectado tanto en ratones (Martin-Montalvo *et al.*, 2013) como en *Caenorhabditis elegans* (Onken y Driskoll, 2010) lo que es sinónimo de un retraso en el envejecimiento celular.

La función del AMPK en la regulación del metabolismo energético radica en su capacidad para mantener un buen estado de actividad de las mitocondrias y establecer el paso de procesos de generación de energía (catabólicos) a procesos de consumo de energía (anabólicos) (Herzig y Shaw, 2018), según los requerimientos celulares dependiendo de las condiciones a las que están sometidas.

Las implicaciones (**Figura 1**) que posee el AMPK en el establecimiento de un balance energético parece indicar que su acción contribuye a un mantenimiento del equilibrio celular u homeostasis, asunción que se ha confirmado tras el estudio de Meley *et al.* (2006), donde se indica la necesidad de un correcto funcionamiento de la autofagia, que es un mecanismo del cual se hablará en detalle en apartados posteriores.

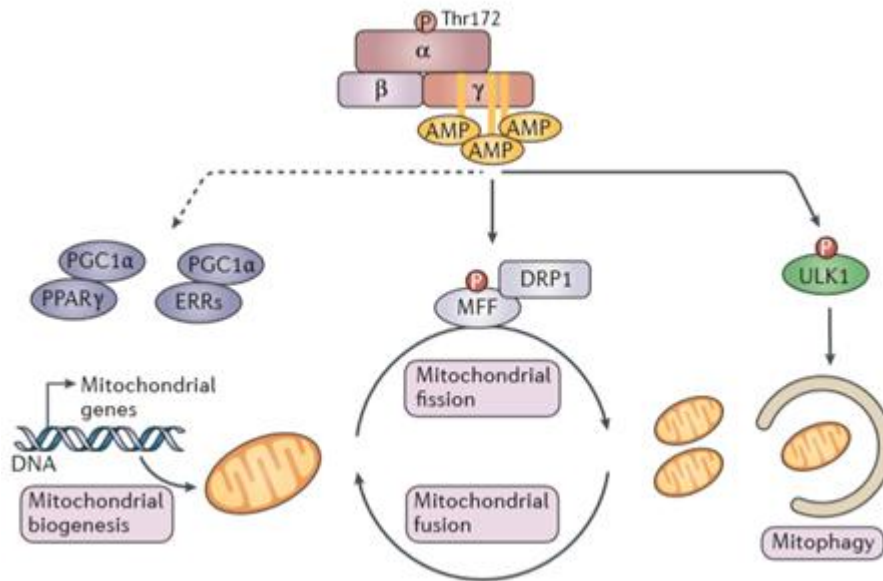


Figura 1: Posibles dianas de actuación del AMPK, destacando efectos directos sobre la degradación de mitocondrias dañadas (mitofagia) y la división de las mismas, así como efectos indirectos a nivel genético (Figura obtenida de Herzig y Shaw, 2018).

1.2 Mecanismo de Homeostasis Celular: La autofagia

La autofagia es un mecanismo clave para el mantenimiento de la homeostasis (equilibrio) celular, y será el proceso encargado de la degradación de macromoléculas alteradas, proteínas, orgánulos como las mitocondrias o los peroxisomas (mitofagia, pexofagia...), determinadas regiones citosólicas, etc. Se trata, a su vez, de un proceso altamente conservado en eucariotas y se distinguen tres tipos distintos que son la autofagia mediada por chaperonas (CMA), la microautofagia y la macroautofagia, siendo esta última la ruta más conocida y estudiada y de la cual se hablará más en detalle durante este trabajo.

La macroautofagia es una ruta autodegradativa, vía lisosomas, que elimina aquellos macroelementos dañados o envejecidos con el fin de reutilizar los residuos resultantes para mantener un funcionamiento celular correcto en respuesta a condiciones de estrés como ocurre por ejemplo, ante una falta de nutrientes. Este proceso se encuentra regulado por mTORC1 (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), que es un complejo Serina-Treonina quinasa altamente conservado en la evolución perteneciente a la superfamilia de las quinasas relacionadas a PI3K. Actúa como centro coordinador del metabolismo celular, detectando estímulos como la presencia de oxígeno, factores de crecimiento y abundancia de nutrientes en la célula (Rabanal-Ruiz *et al.*, 2017).

Si las condiciones son óptimas en cuanto a los factores mencionados anteriormente, así como la ausencia de estrés inflamatorio y oxidativo entre otros, mTORC1 está activado y forma un complejo con ULK1, reprimiendo el mecanismo de autofagia. En cambio, si dichas condiciones se vuelven desfavorables, entonces se inhibe mTORC1 debido a, por ejemplo, la fosforilación de serinas por parte de la molécula AMPK (Kim *et al.*, 2014) en condiciones de estrés (inanición) por lo que ULK1 se encontrará libre, siendo capaz de fosforilar a una proteína relacionada con autofagia (ATG13 en este caso) y FIP200, que provoca la inducción de la macroautofagia (Lotz y Caramés, 2011) sucediéndose así las distintas fases (**Figura 2**) que son:

- Etapa de formación de un fagóforo o membrana de aislamiento en el PAS (*Phagophore Assembly Site*).
- Etapa de nucleación y elongación del fagóforo mediante adición de membranas.
- Etapa de formación de un autofagosoma de doble membrana que rodea aquellos elementos a degradar mediante el sellado de la membrana elongada del fagóforo.
- Etapa de unión del autofagosoma a lisosomas para formar lo que se conoce como autolisosoma y degradación de todo el material para su posterior reutilización.

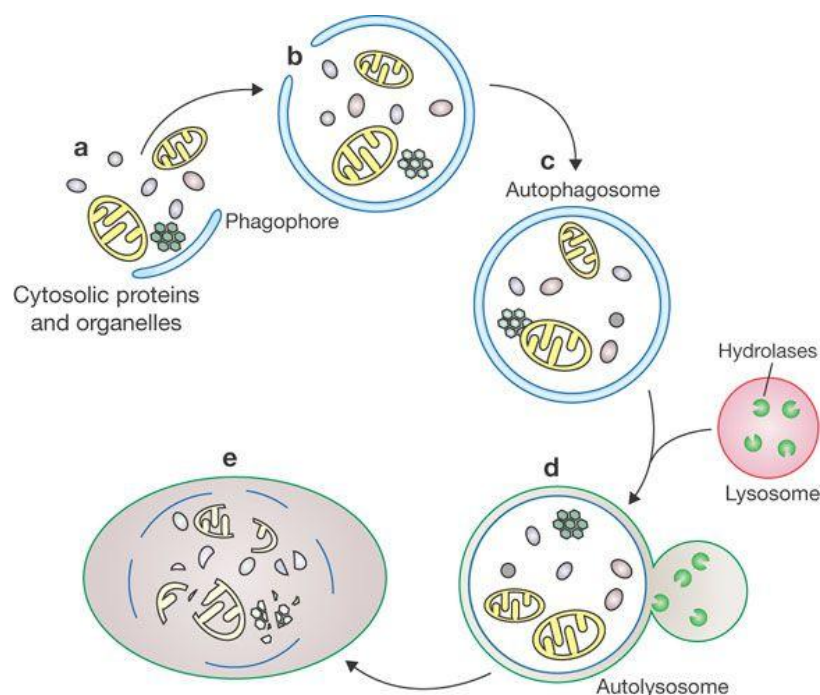


Figura 2: Etapas del proceso de macroautofagia. (Figura obtenida de Xie y Klionsky, 2007)

La formación del fagóforo, el cual se trata de un compartimento de membrana similar en aspecto a una cisterna del complejo de Golgi, no era un mecanismo muy estudiado y la procedencia de esa membrana era incierta. Sin embargo, un estudio reciente (Wang *et al.*, 2015) parece indicar que las

vesículas derivadas del Retículo endoplasmático que salen hacia el complejo de Golgi mediante las proteínas COPII, pueden desviarse de esa ruta en condiciones de estrés gracias a la actividad de una Rab GTPasa (Ypt1/Rab1) que recluta directamente a la kinasa Hrr25/CK1 hacia la vesícula y la dirige hacia el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) para servir como fuente de membrana para el mismo. A su vez, no es descartable la idea de recibir membranas de vesículas del Golgi-trans o de las mitocondrias. Una vez las vesículas ya están en el lugar de formación, la inducción de la macroautofagia por parte de la proteína quinasa ULK1 provoca la fosforilación de Bcl-2 que dejará libre a Beclin-1 que se unirá a PI3K para formar un complejo iniciador de la nucleación del fagóforo ya que se desplazará hacia el PAS y reclutará a las proteínas codificadas por los genes ATG (*Autophagy Related Genes*) necesarias para combinar todas esas vesículas de distintos orígenes y formar el fagóforo o membrana de aislamiento (Patingre y Levine, 2006).

Una vez formado el fagóforo, se precisa de la elongación y sellado de dicha membrana para poder englobar aquellos elementos que se vayan a degradar. Para ello, recientemente se ha descubierto que el receptor de autofagia optoneurina es clave para la maduración de los fagóforos y posterior formación de los autofagosomas ya que va a ayudar, en colaboración con otras proteínas ATG, a la activación de la proteína LC3-I en el citosol (*Microtubule-associated protein light chain 3*) y la transformación de la misma a LC3-II que es la proteína presente en la membrana de los autofagosomas y que ayudará en el proceso de sellado (Bansal *et al.*, 2018). La cantidad de LC3-II presente se correlaciona de manera directamente proporcional a la extensión del autofagosoma, siendo la primera proteína de mamíferos identificada que se relaciona específicamente con las membranas del autofagosoma (Kabeya *et al.*, 2000).

Una vez sellado y formado el autofagosoma en cuyo interior se encuentran los elementos a degradar, se desprende de las proteínas LC3-II de la membrana y de las diferentes ATG gracias a la autofagina, para posteriormente fusionarse con un lisosoma para formar el autofagolisosoma mediante la ayuda de las proteínas Rab 7, Lamp1 y Lamp2. Gracias a la actuación de las enzimas presentes en el mismo, se consigue degradar todo el contenido para su reutilización (Ramírez-Sagredo *et al.*, 2016) como se muestra en la **Figura 3**.

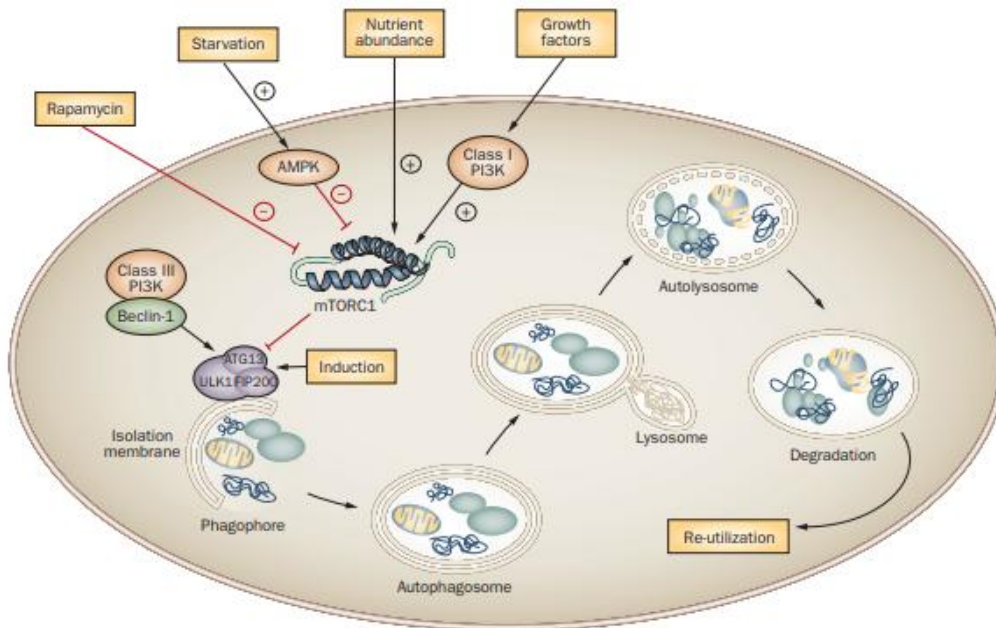


Figura 3: Esquemática de las etapas principales de la macroautofagia, así como de los activadores e inhibidores más importantes que actúan en la regulación del proceso. (Figura obtenida de Lotz y Caramés, 2011)

1.3 Importancia de la Autofagia en Condrocitos Humanos

Los condrocitos son el único tipo celular presente en el cartílago y actúan como reguladores del equilibrio entre los procesos de generación de matriz extracelular (MEC), dentro de la cual están englobados, y de destrucción de la misma. Esta matriz está compuesta en su gran mayoría por agua (70% aproximadamente), completándose su composición con moléculas como proteoglicanos, colágeno, de distintos tipos (el más común es el de tipo II) y otras proteínas no colágenas (Martel-Pelletier *et al.*, 2016). La funcionalidad del tejido de cartílago articular dependen de sus capacidades biomecánicas y su estructura, las cuales son mantenidas en buen funcionamiento gracias al control que ejercen los condrocitos sobre los procesos catabólicos y anabólicos (Aigner *et al.*, 2007), pero el inconveniente radica en que este tipo celular posee tasas de replicación muy bajas de modo que su número es limitado en el interior del cartílago. Esto ocasiona la existencia de una reciprocidad entre el estado de la MEC y la funcionalidad de los condrocitos, de manera que las macromoléculas estructurales como el colágeno o el ácido hialurónico, así como factores de crecimiento (IGF, TGF β , etc.) que se encuentran en la MEC y se liberan en determinadas condiciones, ocasionan cambios en el comportamiento de los condrocitos y viceversa (van der Kraan *et al.*, 2002).

Cuando el equilibrio del cartílago articular se ve alterado, la baja tasa de replicación de los condrocitos, mencionada anteriormente, ocasiona que dependan en gran medida de la autofagia para obtener aquellos compuestos que necesiten para restablecer el estado inicial del cartílago articular a base de degradar las moléculas y orgánulos dañados que se hallan en las células (Caramés *et al.*, 2010). A su vez, se ha comprobado que la inducción de la autofagia mejora el estado del cartílago articular de ratones artrósicos (Caramés *et al.*, 2012). Estos estudios mencionados son de gran importancia debido a que la artrosis se trata de una enfermedad degenerativa que daña las articulaciones de manera que la MEC del cartílago se pierde en gran parte (Buckwalter *et al.*, 2005), dejando desprotegidos a los condrocitos, que inicialmente se encontraban embebidos en ella. De esta forma, se aumentan las condiciones de estrés a las que están sometidos, generando estímulos que propician tanto la muerte celular programada o apoptosis, como la aparición de un fenotipo de senescencia celular, que destaca por la secreción de citoquinas proinflamatorias (**Figura 4**) como la Interleucina 1 β , y metaloproteinasas como la MMP-13, que ocasionan la aceleración del proceso degradativo de la MEC (Loeser *et al.*, 2016).

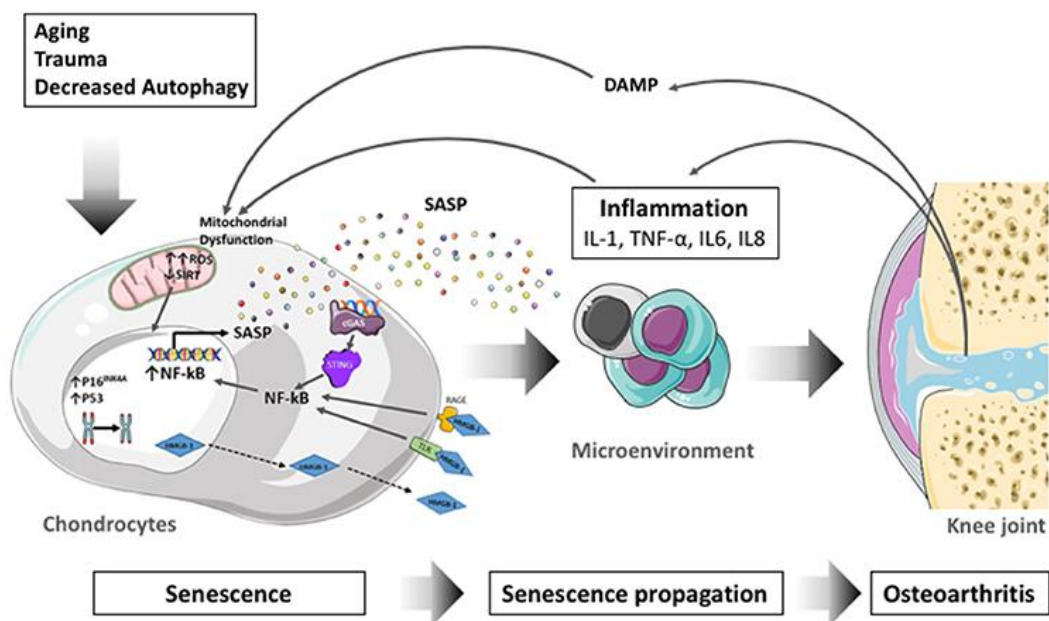


Figura 4: Representación esquemática del efecto del envejecimiento y la artrosis sobre la autofagia y el estado de los condrocitos tras la aparición del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP). (Figura obtenida de Vinatier *et al.*, 2018).

Dicha enfermedad está estrechamente asociada a la edad, siendo numerosos los factores que influyen en el envejecimiento (**Figura 5**) la patología articular con mayor incidencia en adultos mayores de 65 años y, además, se encuentra relacionada con la Diabetes de Tipo 2, ya que una de

las posibles causas de esta última, la obesidad, es otro de los factores de riesgo para la aparición de la artrosis.

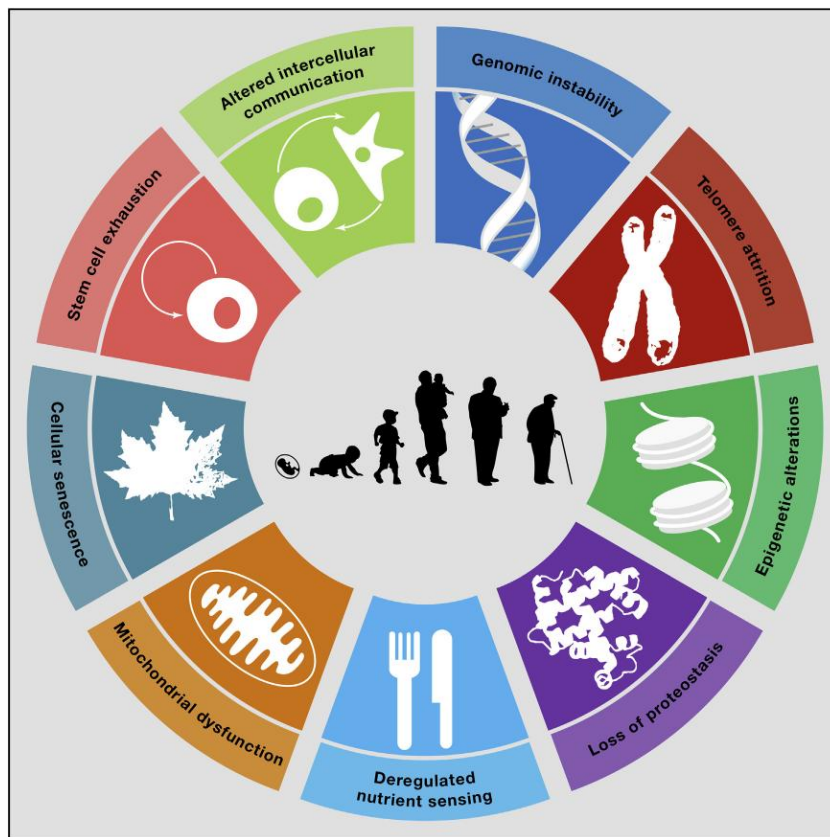


Figura 5: Principales factores que contribuyen al envejecimiento y en consecuencia, a la evolución de la artrosis. (Figura obtenida de López-Otin *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta las relaciones establecidas entre la artrosis, la autofagia, la Diabetes de Tipo 2, la Metformina, el AMPK y el cartílago articular, la información obtenida da pie a un posible efecto de la Metformina sobre la funcionalidad de los condrocitos humanos, de modo que el estudio del efecto que puede ejercer el medicamento sobre la expresión de genes relacionados con la autofagia en dicho tipo celular podría proporcionar información clave acerca del mecanismo concreto de actuación de la Metformina, así como ofrecer una nueva posibilidad de tratamiento de una enfermedad tan compleja como lo es la artrosis.

2. Objetivos

El estudio realizado a lo largo de este trabajo de Fin de Máster es una continuación del proyecto iniciado durante el trabajo de Fin de Grado, en el cual se concluía que la Metformina, medicamento no tóxico en los condrocitos, ejercía un efecto protector sobre la apoptosis celular, la despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las mitocondrias.

El objetivo principal de este trabajo es la búsqueda de los mecanismos que se ven alterados de manera temprana tras la incubación de una línea celular de condrocitos humanos inmortalizados con la Metformina y establecer posibles relaciones con el efecto protector que esta ejerce.

Para ello se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar las dosis de Metformina y el tiempo de incubación a los cuales es posible detectar un efecto temprano sobre la expresión de genes en condrocitos humanos.
2. Desarrollar un array de expresión de genes implicados en los mecanismos de autofagia en condrocitos humanos tratados con Metformina.
3. Validar los efectos de la Metformina en condrocitos humanos inmortalizados sometidos a condiciones de estrés inflamatorio.

3. Material y métodos

3.1 Línea celular

Las células utilizadas para la extracción de ARN a lo largo del estudio reciben el nombre de T/C28a2, que se trata de una línea celular de condrocitos humanos immortalizadas, es decir, células propias de cartílago que han sido modificadas para presentar un crecimiento continuo e indefinido a lo largo del tiempo, mostrando las características propias de las células normales. Esta línea celular fue proporcionada por el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

3.2 Descongelación, cultivo y mantenimiento celular

Las células, cuando no están siendo utilizadas en el laboratorio, se guardan en alícuotas en el congelador a -80°C en medio con suero fetal bovino (FBS) y dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, que es un agente crioprotector que evita la formación de cristales que puedan dañar la estructura celular. Para iniciar el proceso de descongelación, se pondrá la alícuota en hielo, para que se vaya descongelando, mientras que al mismo tiempo, se prepara un tubo Falcon que contenga 5 mL de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) con 10% de FBS y 1% de Penicilina-Estreptomicina (P/S) para un uso posterior. Una vez se han descongelado las células del vial, se añade 500 μL de medio DMEM, mezclando lentamente por pipeteo y acto seguido, pasar todo el líquido que contiene la alícuota al tubo Falcon preparado anteriormente para su centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante, que contiene los restos de DMSO se descartan y el precipitado se resuspende en 5 mL de DMEM al 10%, sembrando las células tanto en una placa Petri (P100) como en un Flask de cultivo, dependiendo de la cantidad de células que se quiera obtener y la cantidad de medio a utilizar. Las células cultivadas se mantienen en estufa a una temperatura de 37°C y una concentración de CO_2 del 5%, comprobando periódicamente su estado por si se necesita cambiar el medio de cultivo para que sigan creciendo con normalidad.

Una vez dichas células alcanzan el estado de confluencia se procede a realizar un pase celular que consiste en el levantamiento celular mediante el uso de Tripsina 10x y realizar una nueva siembra de un número determinado de células en un recipiente de cultivo y medio nuevos. Las células descongeladas, generalmente son líneas celulares cuyo pase se sitúa en torno a 10 o 15.

Para llevar a cabo un pase celular se extrae el medio de cultivo del Flask con ayuda de una pipeta de 25 ml y, una vez hecho, se lava el Flask con una solución salina para eliminar los restos de medio que puedan quedar. Las células están adheridas a la pared del Flask y para levantarlas se añaden 2 ml de tripsina 10X sobre la pared donde se encuentran las células y se incuban durante 1-2 minutos en la estufa. Luego se sacan de la estufa y se detiene la reacción enzimática añadiendo medio de cultivo DMEM debido a que el suero bovino inactiva la tripsina. Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 1400 rpm, descartando el sobrenadante.

Una vez se han centrifugado las células se puede realizar un conteo en cámara de Neubauer para saber el número de condrocitos que hay. Para ello, se preparó una dilución previa 1:5 que consistía en añadir a un tubo eppendorf 100 μ l de células resuspendidas, 300 μ l de medio (para contar no se precisa que esté estéril por lo que se puede trabajar fuera de la campana) y 100 μ l del compuesto Trypan Blue que es un colorante que nos permite distinguir las células muertas de las vivas, viéndose las primeras de un color azul. A continuación se carga la cámara de Neubauer con unos 20 μ l y se procede a contar las células de los cuadrantes externos de la cámara, para posteriormente hacer una media de los cuatro datos obtenidos.

Para calcular el número de células totales en suspensión, se hace una multiplicación de la media de las células de cada cuadrante por la dilución de las células resuspendidas tras la centrifugación, por la dilución del eppendorf con Trypan Blue que es 5 y por la dimensión de la cámara que es de 10000. Al tener ya el número de células totales, lo siguiente será sembrar la cantidad requerida de nuevo en medio DMEM, ya sea en un nuevo Flask o en una placa específicamente requerida para un experimento y rotular dicha placa con el nombre del cultivo celular, la fecha a la que se inicia el experimento y el n° de pases realizados. Para la obtención de unos resultados más homogéneos y fiables es preferible el uso de células cuyo número de pase sea inferior a 35, debido a que la manipulación continua de las células podría alterar el estado de las mismas.

Una vez se conoce la estima, recoger el número de células precisadas para los experimentos o sembrar 8×10^5 células en un nuevo Flask para mantenimiento.

3.3 Extracción de ARN a partir de células T/C28a2

El proceso de extracción de ARN se inicia retirando el medio de cultivo DMEM de los pocillos sembrados, y lavando los mismos con 1 mL de solución salina para eliminar los restos de medio de cultivo. Las células se encuentran pegadas a la superficie del pocillo de modo que el siguiente paso

es añadir 500 μL de TRIZOL (solución química utilizada para el aislamiento de ácidos nucleicos y proteínas), el cual levanta las células y, con ayuda de una pipeta Pasteur, se transfiere a un tubo eppendorf de 1,5 mL y se prepara una centrifuga a 4°C.

El siguiente paso es añadirle a cada tubo con Trizol, 300 μL de Cloroformo y mezclar por inversión, dejando incubar 3 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 12500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Obtenidos los tubos centrifugados, se aprecian dos fases, una orgánica y otra acuosa situadas en la parte inferior y superior respectivamente, siendo esta última donde se encuentra el ARN de interés. Para recuperar esta fase en otro tubo eppendorf de 1,5 mL, se utiliza una pipeta con la que se extrae evitando mezclar de nuevo con la fase orgánica.

A cada tubo se le añade acto seguido 500 μL de Isopropanol, mezclando por inversión como en el paso previo pero esta vez incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente para luego centrifugar a 12000 rpm durante otros 10 minutos a 4°C. Este paso permite la precipitación de los ácidos nucleicos y, por lo tanto del ARN de interés, de modo que en esta ocasión se descarta el sobrenadante y se lava el precipitado en 700 μL de Etanol al 70% (se le dan unos golpes al eppendorf para que se levante del fondo pero no se resuspende). Por último, centrifugar de nuevo a 13000 rpm en 4°C, eliminando de nuevo el sobrenadante y evitando que haya restos de Etanol, por lo que se deja secar el precipitado entre 30 y 60 minutos a temperatura ambiente.

Hecho esto, se resuspende dicho precipitado en 15 μL de Agua libre de ARNasas y se ponen en hielo, mientras se va preparando el NanoDrop ND-1000 aparato el cual realiza la función de un espectrofotómetro, valiéndose de cantidades muy pequeñas de volumen para obtener la cuantificación del ARN extraído y su calidad. Para llevar a cabo esta tarea, se tomó un volumen de 1,5 μL de agua libre de ARNasas para hacer un blanco. Una vez hecho, se seca con un papel el líquido del NanoDrop y se introduce la muestra (1,5 μL de la solución con el ARN disuelto), de modo que el programa donde se analiza devolverá en la pantalla una serie de datos acerca de la muestra problema (**Figura 6**).

Los valores a tener en consideración son 3:

- El ratio $A_{260/280}$: proporciona información sobre la contaminación con proteínas (valores de 1,5 – 2 son sinónimo de una pureza elevada de la muestra de ARN).

- El ratio $A_{260/230}$: proporciona información sobre la contaminación con sales y/o alcoholes (valores de 1,5 – 2, al igual que en el anterior caso, representan muestras de pureza elevada).
- La concentración: representa la cantidad de ARN en la muestra por unidad de volumen, y es el dato clave para poder establecer las condiciones de trabajo en experimentos posteriores. (proporciona la cantidad de ARN en $\text{ng}/\mu\text{L}$).

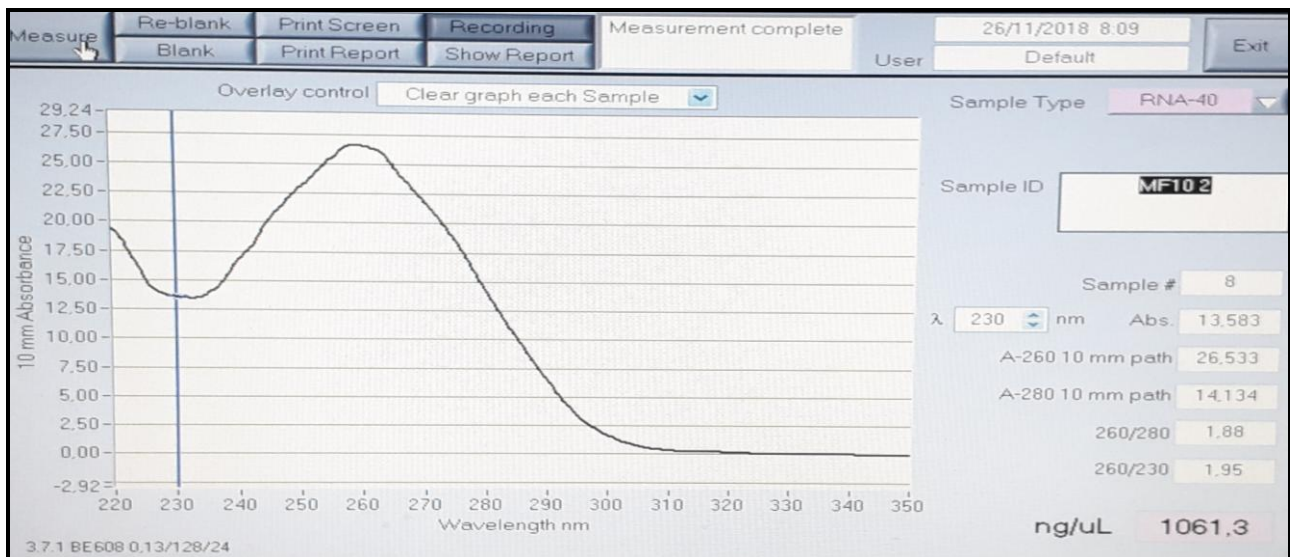


Figura 6: Imagen tomada del programa del NanoDrop ND-1000, donde se observan los valores de interés (ratios y concentración) de una muestra de ARN extraído de condrocitos humanos. (Figura de elaboración propia).

3.4 Realización de una RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) para la obtención de ADNcomplementario (ADNc) a partir de ARNmensajero (ARNm)

Después de obtener el ARN, se precisa retrotranscribirlo a ADNc, ya que el ARN es mucho más sensible e inestable que el ADN de modo que para experimentos genéticos, trabajar con ADNc permite conocer la información que se transcribe de una manera más permisiva y controlada. Para hacer dicha retrotranscripción, se pone el ARNm a descongelar en hielo (evitando cambios bruscos de temperatura que puedan dañarlo) mientras se rotulan los tubos donde se hará la mezcla para llevarla a cabo. Se usa un kit comercial (*NZY First-Strand cDNA synthesis kit*) que contiene una mezcla *Master Mix*, (que contiene los cebadores necesarios el MgCl_2 , y los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), la enzima transcriptasa inversa NZY (NZY RT), y la enzima RNasa H.

El volumen final de la mezcla es de 20 μL , donde se repartirán de la siguiente forma:

- Volumen de ARN necesario para introducir 500 ng (depende de la concentración calculada).
- 10 μ L de *Master Mix*.
- 2 μ L de enzima NZY RT.
- Volumen de Agua libre de nucleasas necesario para rellenar hasta el volumen final.

El orden de mezcla de los reactivos según el protocolo utilizado sería Agua-ARNm-*Master Mix*-NZY RT y se trabaja siempre en condiciones de frío, manteniendo los tubos en un *cooler* (enfriador). Hecha la mezcla, se introducen los tubos en el termociclador, en este caso se ha usado el *Veriti 96Well Thermal Cycler* seleccionando los parámetros y ciclos de temperatura para la realización de la RT PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) necesarios del método NZY, los cuales se ven reflejados en la **Figura 7**.

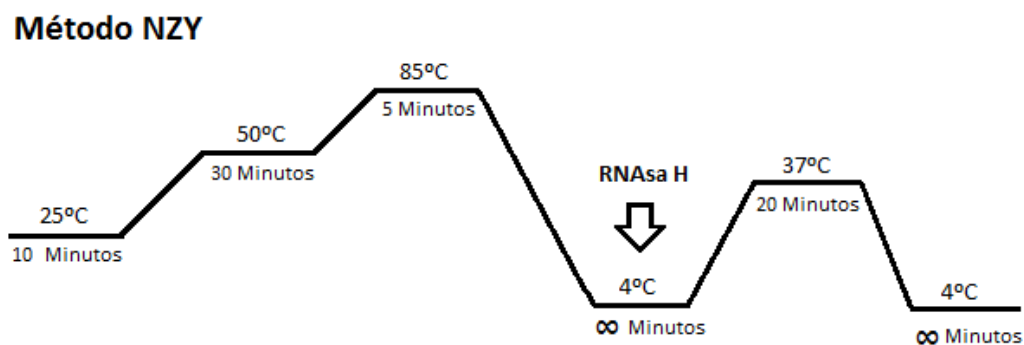


Figura 7: Esquema representativo de los ciclos de temperatura del método NZY para llevar a cabo la RT PCR. (Figura de elaboración propia)

En la mitad del proceso, se precisa de una adición de 1 μ L de la enzima RNasa H (indicado por una flecha en la **Figura 6**) para eliminar los restos de ARNm que hayan quedado en el tubo y, para ello, se debe pausar el proceso y, cuando se haya añadido, retomarlo pulsando *Skip* en el termociclador.

Una vez se termina el proceso, se diluye el ADNc en proporción 1:10 en Agua libre de nucleasas y se guardan las muestras a 4°C hasta su posterior uso. También es posible cuantificar el ADNc en el NanoDrop si se precisa, de la misma forma que se hace con el ARN pero seleccionando la pestaña adecuada dentro del programa.

3.5 Elaboración de una qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) o PCR a tiempo real a partir de ADNc mediante el uso de sondas TaqMan

Para llevar a cabo un análisis de expresión génica mediante qPCR, lo primero es cargar una placa de 96 pocillos con la mezcla necesaria para realizar la reacción. Dicha mezcla va a contener agua libre de nucleasas, una *Master Mix*, sondas TaqMan para el gen de referencia 36B4, cebadores para la amplificación de dicho gen y la sonda TaqMan para el gen diana del cual se quiere obtener la información sobre sus niveles de expresión. Se trabaja para un volumen final de reacción de 10 μL siguiendo la distribución de la **Tabla 1**.

Tabla 1: Volúmenes de los reactivos necesarios para reacción qPCR.

TaqMan Gen Diana	0,5 μL	Multiplicado por el número de muestras/ pocillos que se quiera analizar.
Taqman Gen de Referencia 36B4	0,02 μL	
Cebadores Gen de Referencia 36B4	0,2 μL	
<i>Master Mix</i>	5 μL	
Agua libre de Nucleasas	3,28 μL	
Volumen Final	9 μL	

Una vez se realiza dicha mezcla en los pocillos, se añade a cada uno 1 μL de ADNc de la condición a analizar, dando el Volumen Total de 10 μL . La placa se carga en condiciones de esterilidad en campana, para evitar posibles contaminaciones de la muestra, manteniendo siempre la placa en frío con ayuda de un enfriador. Evitar la exposición de las sondas TaqMan a la luz en la mayor medida de lo posible debido a su sensibilidad.

Una vez se carga la placa, se sellan los pocillos con ayuda de una lámina transparente y se centrifuga durante 2 minutos a 2000 rpm para que los reactivos se sitúen en el fondo del pocillo. Hecho esto lo siguiente es introducir la placa en el termociclador a tiempo real (*LightCycler*[®] 480 *System*, Roche), seleccionar la plantilla específica en el software del termociclador que se adecúe a la cuantificación de fluorescencia emitida por sondas TaqMan, en este caso será una serie de etapas que consisten en:

- **Etapa de pre-incubación:** 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos.
- **Etapa de amplificación:** 45 ciclos que consisten en 10 segundos a 95°C seguidos de 30 segundos a 60°C a lo largo de los cuales se lleva a cabo la cuantificación de la fluorescencia emitida a tiempo real.
- **Etapa de enfriamiento:** 1 ciclo a 40°C durante 30 segundos.

Se selecciona la opción *Dual Color Hydrolysis PROBE* para permitir la cuantificación simultánea de la fluorescencia para el gen de referencia 36B4 y para el gen diana. Una vez se han seleccionado todos los parámetros, se introduce la placa en el termociclador y se ejecuta el programa. Mientras dura el proceso, se puede ir codificando el nombre de cada pocillo de la placa para establecer las distintas condiciones y réplicas para así facilitar el posterior trabajo de análisis.

3.6 Array de expresión de genes de autofagia a partir de ADNc mediante qPCR usando el fluoróforo SYBR Green

Para realizar un análisis de expresión de los genes relacionados con la regulación del mecanismo de autofagia, se ha utilizado un array comercial denominado *Autophagy (SAB Target List) H96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)*. Este consiste en una placa de 96 pocillos en los cuales se encuentran los cebadores específicos para cada gen, liofilizados en el fondo del pocillo, de manera que cargando los reactivos necesarios para la reacción de qPCR se puede automatizar la cuantificación de la expresión de numerosos genes distintos en una misma placa (**Figura 8**). Dentro de estos genes analizados se engloban aquellos que regulan directamente el proceso de autofagia, así como también genes que actúan en vías de señalización diferentes pero entre las cuales puede existir una relación tales como la vía inflamatoria, apoptosis, el ciclo celular, etc.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	ACTB	ATG3	B2M	BNIP3	CTSS	FADD	HDAC6	IRGM	NPC1	RPLP0	TNFSF10	HPRT1	A
B	AKT1	ATG4A	BAD	CASP3	CXCR4	FAS	HGS	LAMP1	PIK3C3	RPS6KB1	TP53	gDNA	B
C	AMBRA1	ATG4B	BAK1	CASP8	DAPK1	GAA	HSP90AA1	MAP1LC3A	PIK3CG	SNCA	ULK1	PCR	C
D	APP	ATG4C	BAX	CDKN1B	DRAM1	GABARA_P	HSPA8	MAP1LC3B	PIK3R4	SQSTM1	ULK2	RQ1	D
E	ATG10	ATG4D	BCL2	CDKN2A	DRAM2	GABARA_PL1	HTT	MAPK14	PTEN	TGFB1	UVRAG	RQ2	E
F	ATG12	ATG5	BCL2L1	CLN3	EIF2AK3	GABARA_PL2	IFNG	MAPK8	RAB24	TGM2	WIP1	RT	F
G	ATG16L1	ATG7	BECN1	CTSB	EIF4G1	GUSB	IGF1	MTOR	RB1	TMEM74	TBP		G
H	ATG16L2	ATG9A	BID	CTSD	ESR1	HDAC1	INS	NFKB1	RGS19	TNF	GAPDH		H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figura 8: Distribución de los genes en la placa Autophagy H96. Imagen tomada del recurso web: <http://www.bio-rad.com/es-es/prime-pcr-assays/predesigned-plate/sybr-green-autophagy-sab-target-list-h96> a 09/07/2019.

En dicha placa de la **Figura 8**, se analizan los niveles de cuantificación de 86 genes distintos, a los cuales se suman 3 genes de referencia que son los genes TBP (*TATA Binding Protein*), GAPDH (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) y HPRT1 (hipoxantina fosforibosiltransferasa 1 los cuales muestran unos niveles de expresión estables que permiten la normalización de los datos. Además, existen 5 pocillos dentro de la placa comercial, destinados a condiciones control, siendo utilizados durante este trabajo, los correspondientes a las posiciones 12-B y 12-C, que se corresponden con controles sobre la calidad del ADN analizado y la efectividad de la reacción de PCR respectivamente.

La mezcla para la reacción de la qPCR pertenece al kit *SsoAdvanced™ universal SYBR® Green supermix* (Bio-Rad), y se realiza para un volumen total de 10 µL, de los cuales 5 µL se corresponden con la mezcla propiamente dicha, los µL de ADNc necesarios para amplificar 25 ng (dependiendo de la concentración medida en el NanoDrop) y el volumen restante se corresponde con agua libre de nucleasas.

Una vez cargada la placa, se introduce en el termociclador a tiempo real *LightCycler® 480 System* y se selecciona en el software la plantilla con los ciclos de temperatura específicos para la cuantificación con SYBR Green, los cuales difieren ligeramente de los utilizados para la cuantificación con sondas TaqMan. Estos ciclos serían:

- **Etapa de pre-incubación:** 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos.
- **Etapa de amplificación:** 40 ciclos que consisten en 5 segundos a 95°C seguidos de 30 segundos a 60°C a lo largo de los cuales se lleva a cabo la cuantificación de la fluorescencia emitida a tiempo real.
- **Etapa de curva de *melting* o fusión:** 1 ciclo donde la temperatura se incrementa desde los 65°C a los 95°C en pasos continuos cada 5 segundos en intervalos de 0,5°C.
- **Etapa de enfriamiento:** 1 ciclo a 40°C durante 30 segundos

En este caso, no es necesaria la codificación de los nombres de cada pocillo, pues se analizará con un programa distinto que contiene la distribución por defecto, tal y como se explica en el siguiente apartado.

3.7 Análisis de los datos

Los datos de cuantificación de los niveles de expresión se han obtenido con una qPCR, realizada en un termociclador *LightCycler® 480 System* con ayuda del software específico, lo cual implica

que se parte de valores de Ct (*Threshold Cycle* o ciclo umbral), que es el ciclo de amplificación a partir del cual se detecta el inicio de la curva de amplificación en base a la fluorescencia emitida, lo que proporciona una medición relativa sobre la concentración y que es necesaria normalizar en base a los valores de los genes de referencia, para lo cual se usaron distintos programas.

Para los resultados de cuantificación con sondas TaqMan, se introdujeron los datos de los Ct en el programa **qbase+** (de la empresa Biogazelle), que se trata de un software de análisis de qPCR que permite transformar los datos y observar los niveles de expresión de los genes en las distintas condiciones en comparación con los niveles de expresión de los genes de referencia, ofreciendo datos sobre el error de la medida, permitiendo descartar aquellos datos anómalos que posiblemente no se hayan amplificado de manera correcta. Con este programa se establece qué Ct se toman como referencia y cuales como diana, pudiendo exportar los resultados a un fichero de Excel donde se representan como la media aritmética más el error estándar de la medida. La elaboración de las gráficas para los datos de expresión se ha realizado con el programa de apoyo gráfico **GraphPad Prism 6**, el cual a su vez permite la realización de análisis estadístico de los niveles de expresión mediante las pruebas t-Student (si se están comparando dos conjuntos de datos) o pruebas de análisis de varianza ANOVA (si se requiere la comparación entre más de dos conjuntos de datos diferentes) junto con las pruebas de comparación múltiple post hoc pertinentes. Dichas pruebas se realizan porque un ANOVA proporciona información sobre si las medias de los grupos difieren significativamente pero no entre qué grupos se establece la diferencia, para lo cual se utilizará el test de Dunnett (comparación de grupos frente a un control) y el test de Tukey (comparación de grupos dos a dos).

Los resultados de cuantificación con SYBR Green, dado que se trataba de un panel de genes comercial de BioRad, se analizaron con ayuda de un software específico que la empresa proporciona, denominado **PrimePCR Analysis**, el cual permitía la introducción de los datos crudos de los Ct y directamente los transformaba originando un fichero en el cual se puede observar los niveles de expresión de cada gen del array, la expresión relativa, el tipo de regulación que la condición analizada ejercía sobre la expresión del gen frente a la condición control y el p-valor que ofrece la prueba estadística t-Student para la detección de diferencias significativas entre los niveles de expresión (se tomaron como valores significativos aquellos que presentan un p-valor menor a 0,05). A su vez, este programa permite la elaboración de gráficos de barras, mapas de calor, diagramas de dispersión entre otros, para obtener una representación visual de los niveles de expresión de los distintos genes analizados en el array.

4. Resultados y Discusión

En este apartado se detallarán los resultados obtenidos acerca de los análisis de los niveles de expresión de diferentes genes en células T/C28a2 conseguidos mediante qPCR con el uso de sondas TaqMan y qPCR de un array de autofagia comercial (procedimiento detallado en el apartado de Material y Métodos), explicando a su vez el significado de los mismos para la extracción de una serie de conclusiones.

4.1 Optimización de las condiciones a utilizar para la realización de un array de genes

El primer paso a la hora de comenzar este estudio, es conocer las condiciones a las cuales se pueden obtener los resultados más diferenciales sobre los niveles de expresión de los genes. Para ello se han elaborado 3 análisis por qPCR independientes para cada uno de los tratamientos (6, 24 y 48h) de dos genes (ATG4B y LC3) mediante el uso de sondas TaqMan específicas para la amplificación de los mismos. En cada uno de ellos se utilizan 4 condiciones, que son:

- Un control para medir los niveles de expresión basal de dichos genes.
- Tres condiciones en las cuales las células se trataron con concentraciones crecientes de Metformina (1, 10 y 50 μ M).

La **Figura 9** muestra los valores de expresión relativa del gen ATG4B normalizados frente al valor de nivel de expresión del gen de referencia considerado, en este caso el gen 36B4, que se trata de un gen ribosomal que mantiene un grado de expresión estable independientemente de las condiciones analizadas.

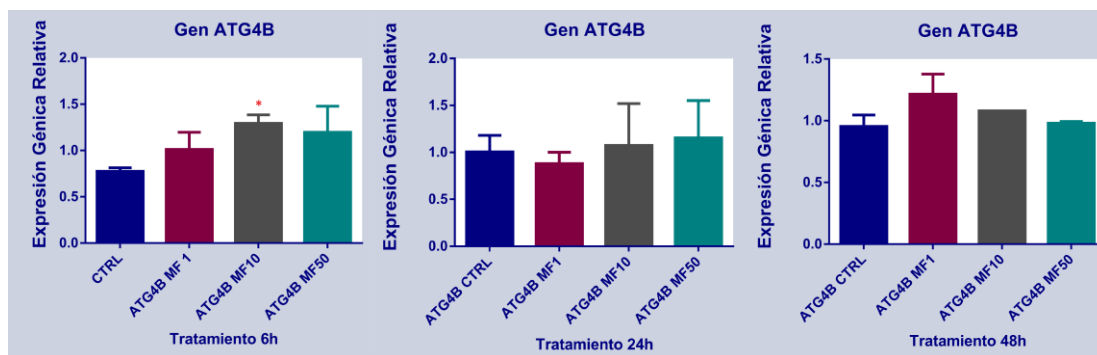


Figura 9: Representación gráfica obtenida con el programa GraphPad Prism, en la cual se representan los niveles de expresión de ATG4B en las 4 condiciones (CTRL, MF1, MF10 y MF50) de los 3 tratamientos

distintos (6, 24 y 48h), normalizados frente a los valores de 36B4. Se representan las medias junto con su desviación típica. * Indica diferencias estadísticamente significativas frente a la condición CTRL para el test de Dunnett.

Se observa un incremento significativo en la expresión de ATG4B para la condición de MF10 μM con respecto al control en el tratamiento de 6h pero para las otras dosis de Metformina no se alcanzan niveles significativos pero sí se aprecia un aumento de la expresión. Mientras tanto, en los tratamientos de 24 y 48h los niveles de expresión toman valores en torno a 1 para todas las condiciones analizadas. Cada una de las gráficas tiene asociado un ANOVA para establecer si existen diferencias significativas entre las medias en los niveles de expresión de ATG4B. Los 3 tratamientos muestran un ANOVA no significativo (p-valor superior a 0,05), sin embargo, para el tratamiento de 6h (**Tabla 2**), se alcanza un p-valor cercano a la significación estadística (0,0826) y tras la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, se observa que entre la media de la condición control y la media de la condición con MF10 μM , existen diferencias significativas.

Tabla 2: Salida del análisis estadístico realizado para el tratamiento de 6h para los niveles de expresión del gen ATG4B que incluye un resumen del Análisis de la Varianza (ANOVA) y el test de Dunnett.

ANOVA summary				
F				3.221
P value				0.0826
P value summary				ns
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)				No
R square				0.5470
Number of families	1			
Number of comparisons per family	3			
Alpha	0.05			
Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
CTRL vs. MF1	-0.2367	-0.7528 to 0.2795	No	ns
CTRL vs. MF10	-0.5167	-1.033 to -0.0005412	Yes	*
CTRL vs. MF50	-0.4200	-0.9361 to 0.09613	No	ns

Se siguió el mismo procedimiento para el análisis del gen LC3, tal y como se representa en la **Figura 10** donde se puede observar una pequeña reducción de la expresión del gen con respecto al control por parte de las condiciones de MF1 y 10 μM en el tratamiento de 6h, que se ve acentuada en el tratamiento de 24h. Sin embargo, la condición de MF 50 μM en este mismo tratamiento muestra un aumento de los niveles de expresión de LC3 por lo que parece que la dosis de 50 μM ejerce un efecto contrario a las demás dosis. No se observan cambios aparentes a 48h por lo que

dicho tiempo de tratamiento parece no tener la capacidad de esclarecer el mecanismo de acción génico temprano de la Metformina.

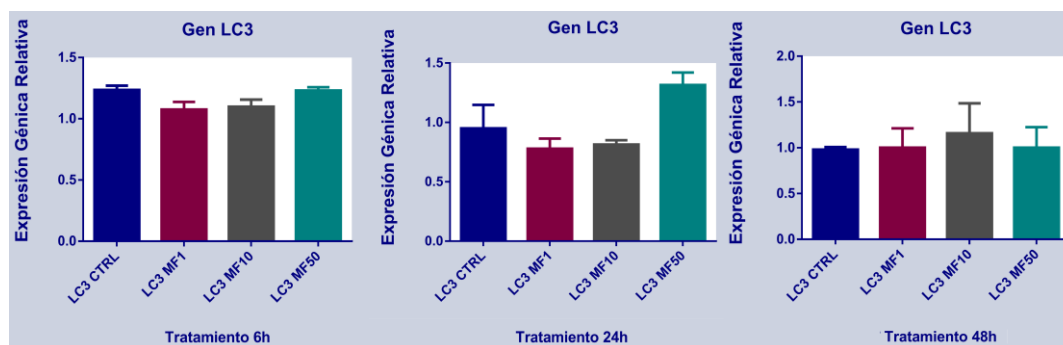


Figura 10: Representación gráfica obtenida con el programa GraphPad Prism, en la cual se representan los niveles de expresión de LC3 en las 4 condiciones (CTRL, MF1, MF10 y MF50) de los 3 tratamientos distintos (6, 24 y 48h), normalizados frente a los valores de 36B4. Se representan las medias junto con su desviación típica.

En cuanto al análisis estadístico (**Tabla 3**), se obtiene un p-valor de 0,0355 y, por lo tanto, significativo para la prueba ANOVA del tratamiento de 24h. No se detectan diferencias por parte de las condiciones con Metformina frente a la condición control, de modo que se realizó una prueba de comparaciones múltiples Ad hoc diferente, el test de Tukey, gracias al cual se permite el cálculo de posibles diferencias estadísticas entre los demás tratamientos, resultando en valores significativos entre las condiciones MF1 y MF10 frente a la condición de MF50.

Tabla 3: Salida del análisis estadístico realizado para el tratamiento de 24h para los niveles de expresión del gen LC3 que incluye un resumen del ANOVA y el test de Tukey. Significación estadística alcanzada para p-valores menores a 0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

ANOVA summary				
F		8.125		
P value		0.0355		
P value summary		*		
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)		Yes		
R square		0.8590		
Number of families	1			
Number of comparisons per family	6			
Alpha	0.05			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
	CTRL vs. LC3 MF 1	0.1700	-0.3240 to 0.6640	No ns
	CTRL vs. LC3 MF10	0.1350	-0.3590 to 0.6290	No ns
	CTRL vs. LC3 MF50	-0.3650	-0.8590 to 0.1290	No ns
	LC3 MF 1 vs. LC3 MF10	-0.0350	-0.5290 to 0.4590	No ns
	LC3 MF 1 vs. LC3 MF50	-0.5350	-1.029 to -0.04102	Yes *
	LC3 MF10 vs. LC3 MF50	-0.5000	-0.9940 to -0.006016	Yes *

El proceso de búsqueda de las mejores condiciones para llevar a cabo el array de genes se terminó con un último experimento, también con qPCR y sondas específicas TaqMan para amplificar un gen más, FoxO1, que a pesar de no estar entre los analizados en el array resulta interesante comprobar el efecto de la Metformina sobre el mismo ya que recientemente, un estudio ha establecido relación entre dicho gen la modulación de la autofagia en homeostasis del cartílago y artrosis (Matsuzaki *et al.*, 2018), cuya expresión se ve reducida en células artrósicas o envejecidas.

En la **Figura 11** se muestran los niveles de expresión de FoxO1 en tratamientos a 6 y 24h con las mismas condiciones que para los genes ATG4B y LC3, eliminando ya la medida de 48h.

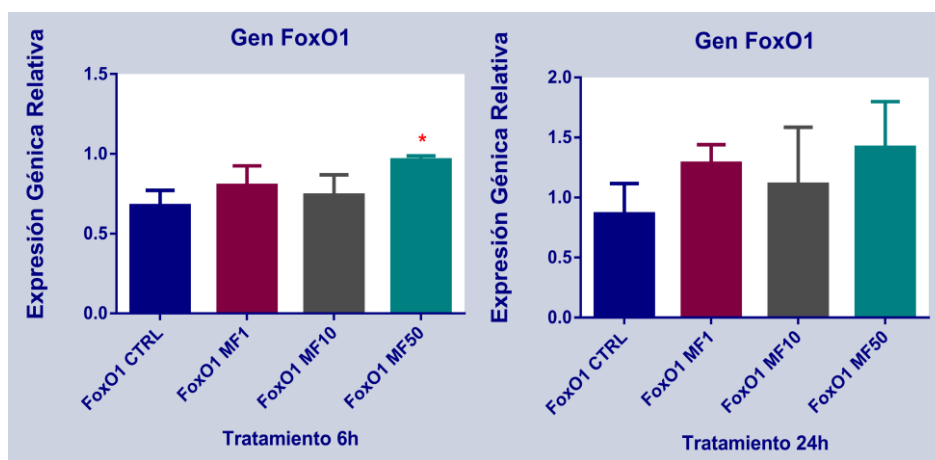


Figura 11: Representación gráfica obtenida con el programa GraphPad Prism, en la cual se representan los niveles de expresión de FoxO1 en las 4 condiciones (CTRL, MF1, MF10 y MF50) de los 2 tratamientos distintos (6 y 24h), normalizados frente a los valores de 36B4. Se representan las medias junto con su desviación típica indicando mediante un * diferencias significativas de los datos frente a la condición CTRL mediante el test de Dunnett.

Se observa que el tratamiento a 24h ofrece valores poco estables para cada condición o cual resulta en un ANOVA no significativo y, por lo tanto, no existen diferencias entre las condiciones. Sin embargo, tal y como se indica en la **Tabla 4**, el tratamiento de 6h proporciona resultados significativos para la prueba de ANOVA, con un p-valor de 0,0409, detectándose mediante el test de Dunnett, un incremento significativo de los niveles de expresión de la condición incubada con MF 50 μ M frente a la condición control.

Tabla 4: Salida del análisis estadístico realizado para el tratamiento de 6h para los niveles de expresión del gen FoxO1 que incluye un resumen del ANOVA y el test de Dunnett. Significación estadística alcanzada para p-valores menores a 0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

F	4.436			
P value	0.0409			
P value summary	*			
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes			
R square	0.6246			
Number of families	1			
Number of comparisons per family	3			
Alpha	0.05			
Dunnett's multiple comparisons test				
	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
CTRL vs. MF1	-0.1267	-0.3637 to 0.1103	No	ns
CTRL vs. MF10	-0.06667	-0.3037 to 0.1703	No	ns
CTRL vs. MF50	-0.2867	-0.5237 to -0.04968	Yes	*

Estos resultados permitieron establecer como tratamiento más apropiado la incubación de 6h con Metformina, quedando únicamente las dudas sobre la dosis a utilizar ya que tanto la de 10 μ M como la de 50 μ M muestran diferencias significativas en alguna de las expresiones génicas analizadas, donde finalmente se prefirió utilizar la dosis de 10 μ M, ya que fue aquella que empleamos en estudios previos, donde observamos un efecto protector sobre la apoptosis celular, la despolarización de la membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las mitocondrias.

4.2 Array de expresión genes de autofagia a partir de ADNc obtenido de células T/C28a2 incubadas con Metformina

El estudio del análisis de los niveles de expresión génica de genes relacionados con la autofagia se llevó a cabo mediante el uso de un array comercial denominado *Autophagy (SAB Target List) H96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)* tal y como se menciona en el apartado Material y Métodos. Para poder llevar a cabo un análisis estadístico de los datos de expresión se realizaron 3 Arrays con ADNc de 3 condiciones control independientes junto con otros 3 arrays con ADNc de 3 condiciones de MF 10 μ M también independientes, procedente de células T/C28a2 tras un tratamiento de 6h de duración. Los datos se analizaron con ayuda del programa PrimePCR Analysis de Bio-Rad que proporciona una serie de facilidades a la hora de la representación gráfica de los datos de expresión de los genes del array.

Como se puede observar en la **Figura 12**, la Metformina a aumenta la expresión de una gran cantidad de los genes analizados en el array.

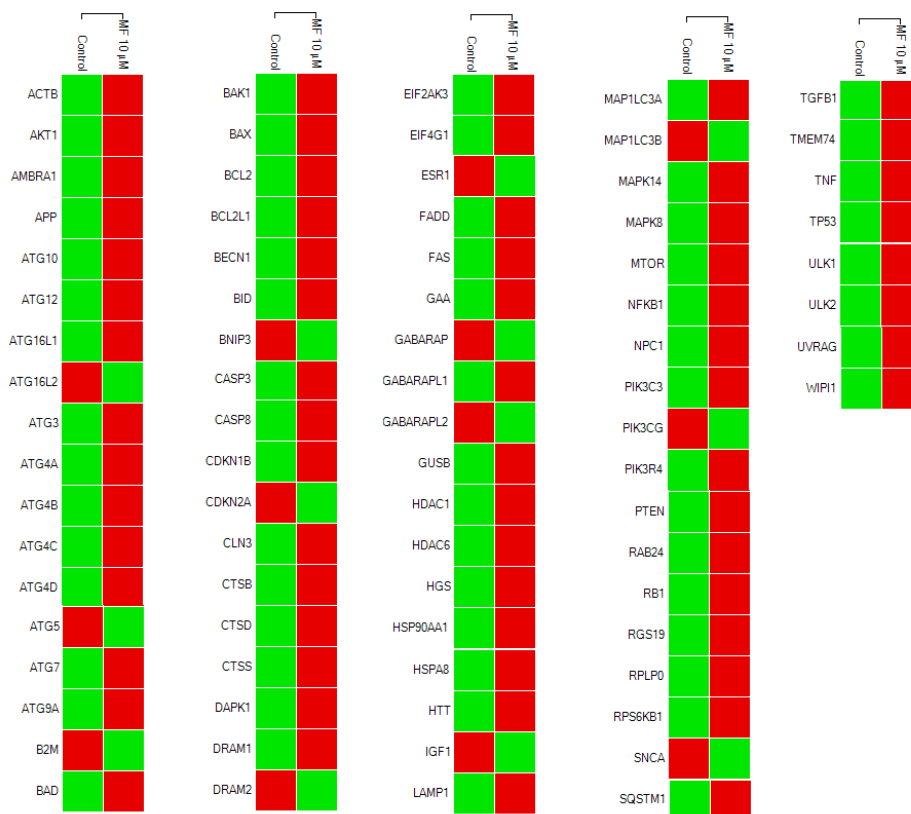


Figura 12: Mapa de calor o *Heatmap* obtenido tras el análisis de los Ct con el programa PrimePCR, donde se muestran mediante un código de colores (verde = expresión disminuida, rojo = expresión aumentada), la diferencias entre los niveles de expresión de los genes entre las dos condiciones analizadas.

Este aumento podría significar que un efecto protector sobre los condrocitos dado que existen reportes indicando la disminución de la expresión de genes relacionados con la autofagia en cartílago envejecido o afectado por la artrosis (Cheng *et al.*, 2017). Sin embargo, los diagramas de dispersión de las **Figuras 13 y 14** ofrecen una información más detallada acerca de dichas diferencias de expresión génica. En ellos se observan remarcadas, aquellas diferencias superiores al 50% en la regulación, tanto positiva como negativa, que sufren los genes analizados debido a la incubación con Metformina 10 µM. Aquellos genes que ven reducida su expresión en más de un 50% (círculos verdes) son genes cuyos niveles basales son muy bajos, por lo tanto puede ser que dichas reducciones no sean tan relevantes ya que proporcionalmente reflejan una variación menor. Los genes que aumentan su expresión en un 50% o más en condiciones con Metformina, poseen niveles de expresión basal medios, por lo que dichos cambios podrían tener un efecto sustancial sobre la autofagia de los condrocitos humanos.

A pesar de detectar dichos aumentos, estas diferencias deben alcanzar la significación estadística, por lo que, como se observa en la **Figura 14**, de todos los genes del array de autofagia analizados, únicamente dos de ellos alcanzan la significación estadística (PTEN y GABARAPL1), cuyos p-valores, obtenidos tras la realización de la prueba t-Student para detectar diferencias entre las medias de dos condiciones, son 0,0105 y 0,0469 respectivamente, aumentando la expresión en un 68% PTEN y un 82% GABARAPL1 (datos detallados en la **Tabla A1** del Anexo).

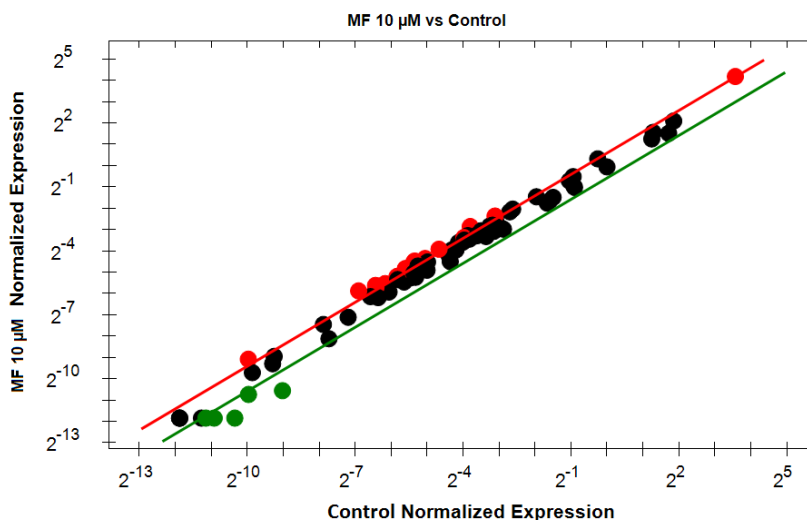


Figura 13: Diagrama de dispersión obtenido en el programa PrimePCR que muestra las diferencias de los niveles de expresión génica entre las condiciones Control y MF 10 µM, destacando aquellas que se encuentran superando el umbral de dispersión tanto para aumento de expresión (umbral de 1,5 señalado por la línea roja, que equivale a un aumento del 50% en la expresión génica) como para la disminución de la expresión (umbral de 1,5 también, indicado por la línea verde).

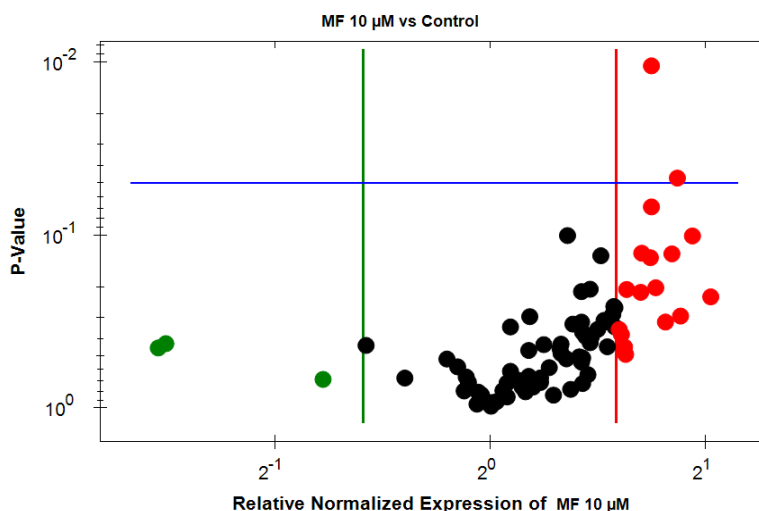


Figura 5: Diagrama Volcano Plot obtenido con el programa PrimePCR que permite la visualización de la dispersión de los datos de expresión de la condición con MF 10 con respecto a la condición Control, frente al P-

valor. El umbral para una disminución de la expresión del 50% lo marca la línea verde mientras que el umbral para un aumento de la expresión del 50% lo marca la línea roja. El p-valor de significación (0,05), se representa como una línea azul.

En la **Figura 15** se representan algunos de los genes de los cuales se habló en el apartado de Introducción acerca de su participación en el mecanismo de autofagia tales como LC3, MTOR, ULK1, BCL2, etc. así como también PTEN y GABARAPL1 que son aquellos en los que se centra la atención de estos resultados.

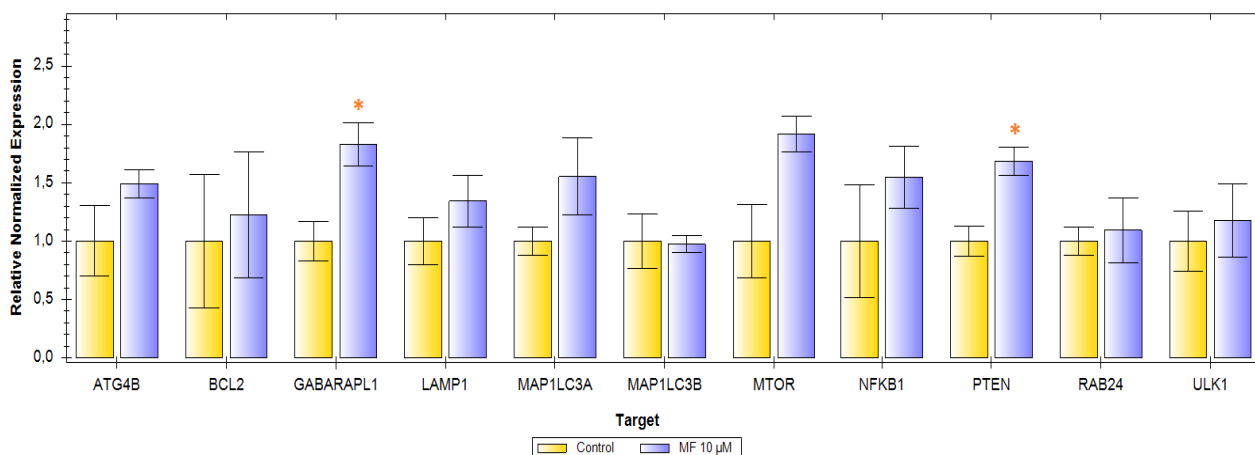


Figura 15: Representación mediante gráfica de barras de los niveles de expresión relativa normalizados frente al valor de la condición Control (amarillo) donde se representa la media y la desviación típica de los datos. En azul, los niveles de expresión de la condición con MF 10 µM. * Indica diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05) con respecto a la condición Control.

Para cada uno de los genes analizados, se indica una breve descripción en la **Tabla A2** del Anexo, sin embargo, se analizará en detalle la implicación que podría tener sobre la autofagia de los condrocitos humanos, el aumento en los niveles de GABARAPL1 y PTEN.

El gen GABARAPL1 codifica para una proteína la cual está relacionada con el transporte de vesículas autofágicas, aumentando su presencia en las membranas del autofagosoma en las etapas tardías del proceso de la autofagia, indicando su posible función sobre la maduración de dichos autofagosomas, estando estrechamente relacionada con otras proteínas como ATG4 (A-D) y LC3 entre otras (Chakrama *et al.*, 2010). Además, la disminución de la expresión de este gen parece ocasionar situaciones de estrés energético en la célula, la aparición de una mayor cantidad de mitocondrias dañadas así como la inducción de procesos apoptóticos (Boyer-Guittaut *et al.*, 2014; Betin y Lane, 2009). De este modo, parece que la Metformina podría actuar sobre el flujo autofágico y ejercer un control de calidad sobre las mitocondrias ya que al aumentar los niveles de

expresión de GABARAPL1, se debería promover la mitofagia (degradación de mitocondrias dañadas para reutilización) y, por lo tanto, mantener un funcionamiento estable en los condrocitos.

Esta no sería la única vía de actuación de la Metformina dados los resultados ya que también se han observado diferencias significativas en la expresión de PTEN. Se trata de un gen supresor de tumores que actúa como regulador negativo inhibiendo la vía PI3K-Akt, de manera que se termina desencadenando una inhibición del factor transcripcional NF- κ B (**Figura 16**) y, por lo tanto una inhibición de las citoquinas proinflamatorias como IL1 β por ejemplo, de manera que se reduce el estrés inflamatorio al que se ve sometido la célula.

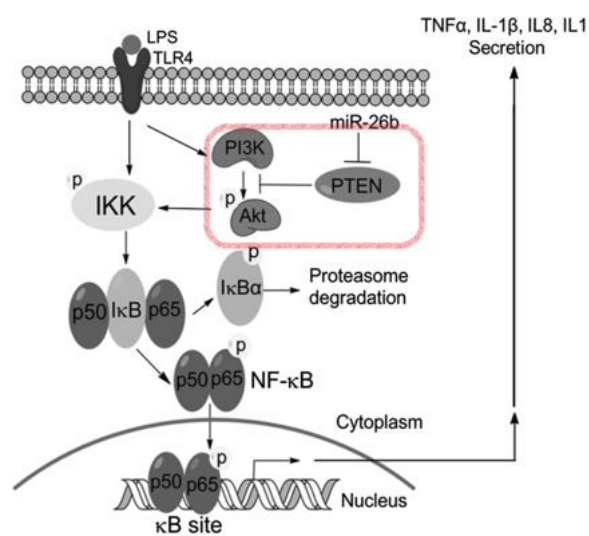


Figura 16: Representación esquemática de la vía inflamatoria de NF- κ B, remarcando el efecto inhibitorio de PTEN sobre la vía PI3K-Akt. (Figura modificada de Zhang *et al.*, 2015)

Además, cabe destacar que diversos estudios han corroborado la eficacia de la Metformina sobre la inhibición de esta vía de señalización en células musculares de la pared vascular (Isoda *et al.*, 2006), señalando como factores principales, la actuación de PTEN en colaboración con la activación del regulador metabólico más importante, el AMPK (Kim y Choi, 2012). Los resultados obtenidos parecen estar en concordancia con estos estudios, pero el bajo número de experimentos tomados para realizar la estadística no permite sacar conclusiones completamente fiables, por lo que para este trabajo se preparó un último experimento del cual se hablará en el siguiente apartado.

4.3 Estudio de la expresión génica en células T/C28a2 como validación del efecto de la Metformina ante condiciones de estrés inflamatorio.

Para finalizar, se estableció un experimento para tratar de validar los resultados obtenidos con el array, el cual consiste en la realización de una RT-qPCR con sondas TaqMan específicas para los genes PTEN, GABARAPL1, ATG4B y LC3 a partir de ARN de células T/C28a2 tratadas durante 24h con las siguientes 4 condiciones (Control, MF 10 μ M, Interleucina 1 β y MF10+IL1 β) para tratar de conseguir observar un efecto protector a nivel génico por parte de la Metformina ante condiciones de estrés inflamatorio.

En la **Figura 17**, se observa un incremento general en cada condición con respecto al control para el primero de los genes (PTEN), siendo más acentuado el incremento en la condición de IL1 β pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas.

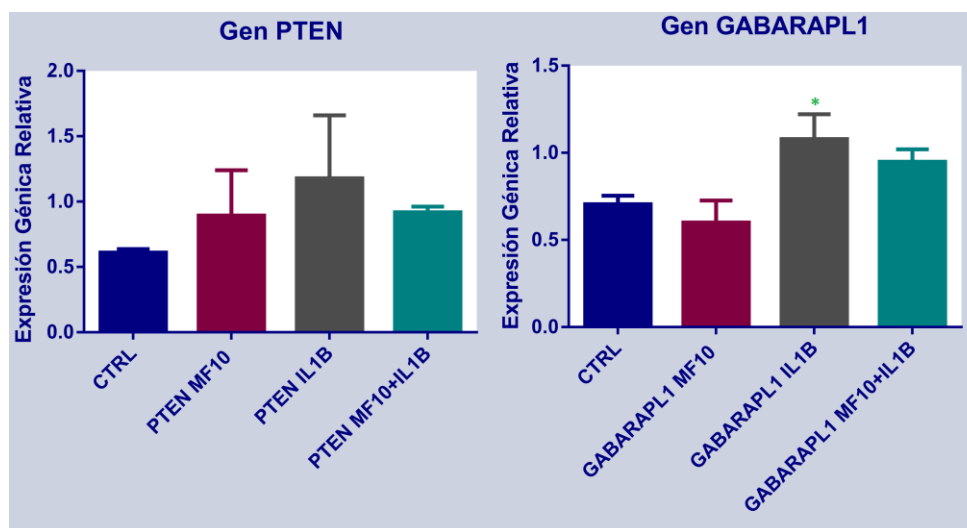


Figura 17: Representación gráfica obtenida con el programa GraphPad Prism, en la cual se representan los niveles de expresión de los genes PTEN y GABARAPL1 en 4 condiciones (CTRL, MF10, IL1 β y MF10+IL1 β) para un tratamiento de 6h, normalizados frente a los valores de 36B4. Se representan las medias junto con su desviación típica indicando mediante un * Indica diferencias significativas frente a la condición MF10.

Para el gen GABARAPL1 se observa una tendencia similar con la salvedad de que en este caso no se observa un incremento en la condición de MF10 frente al control, lo cual resulta extraño dado que dicho incremento sí que se observaba en el análisis del array. En la **Tabla 5** se destacan los análisis ANOVA y el test Tukey de comparación múltiple, que permite detectar diferencias significativas entre las medias de los niveles de expresión en las distintas condiciones (p-valor del ANOVA es 0,0305), resultando estadísticamente significativa la diferencia entre los datos con MF10 e IL1 β . La condición de MF10+IL1 β reduce los niveles de expresión alcanzados en la condición con sólo IL1 β por lo que puede significar que la dosis de Metformina está revirtiendo los cambios génicos provocados por la Interleucina.

Tabla 5: Salida del análisis estadístico realizado para el tratamiento de 6h para los niveles de expresión del gen GABARAPL1 que incluye un resumen del ANOVA y el test de Tukey de comparación múltiple. Significación estadística alcanzada para p-valores menores a 0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

ANOVA summary				
F		8.881		
P value		0.0305		
P value summary		*		
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)		Yes		
R square		0.8695		

ANOVA summary					
Number of families	1				
Number of comparisons per family	6				
Alpha	0.05				
Tukey's multiple comparisons test		Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
CTRL vs. GABARAPL1 MF10		0.1050	-0.3203 to 0.5303	No	ns
CTRL vs. GABARAPL1 IL1B		-0.3750	-0.8003 to 0.05025	No	ns
CTRL vs. GABARAPL1 MF10+IL1B		-0.2450	-0.6703 to 0.1803	No	ns
GABARAPL1 MF10 vs. GABARAPL1 IL1B		-0.4800	-0.9053 to -0.05475	Yes	*
GABARAPL1 MF10 vs. GABARAPL1 MF10+IL1B		-0.3500	-0.7753 to 0.07525	No	ns
GABARAPL1 IL1B vs. GABARAPL1 MF10+IL1B		0.1300	-0.2953 to 0.5553	No	ns

El análisis realizado para el gen LC3 (**Figura 18**) no aporta diferencias significativas entre las condiciones, las cuales mantienen un nivel de expresión estable semejante a la condición control, observándose únicamente un incremento en la condición con IL1 β pero la gran desviación estándar que se muestra parece indicar que posiblemente se produjo algún error en la amplificación del ADNc durante la qPCR. También en la **Figura 18**, se observa un descenso de la expresión génica en las condiciones de MF10 y MF10+IL1 β con respecto al control pero de nuevo sin alcanzar diferencias significativas. La IL1 β genera un incremento en la expresión génica mayor al de las demás condiciones analizadas.

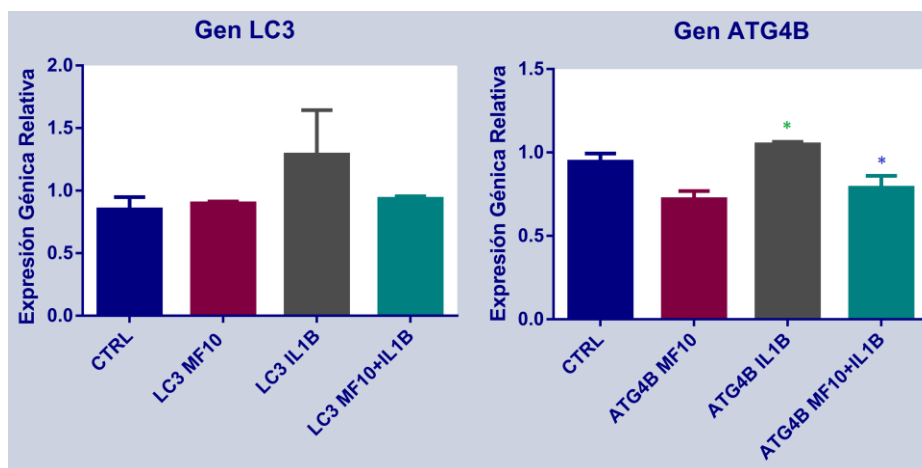


Figura 18: Representación gráfica obtenida con el programa GraphPad Prism, en la cual se representan los niveles de expresión de los genes LC3 y ATG4B en 4 condiciones (CTRL, MF10, IL1 β y MF10+IL1 β) para un

tratamiento de 6h, normalizados frente a los valores de 36B4. Se representan las medias junto con su desviación típica indicando mediante un * Indica diferencias significativas frente a la condición MF10 mientras que * representa diferencias significativas frente a la condición con IL1 β .

El análisis estadístico de la **Tabla 6** muestra un p-Valor para el ANOVA de 0,0136, por lo tanto, significativo para la existencia de diferencias entre las medias mientras que con el test de Tukey se determinan que las diferencias en los niveles de expresión génica estadísticamente significativas se dan entre las condiciones de MF10 frente a IL1 β y M10+IL1 β frente a IL1 β .

Tabla 6: Salida del análisis estadístico realizado para el tratamiento de 6h para los niveles de expresión del gen ATG4B que incluye un resumen del ANOVA y el test de Tukey de comparación múltiple. Significación estadística alcanzada para p-valores menores a 0,05 con un intervalo de confianza del 95%.

ANOVA summary				
F	14.08			
P value	0.0136			
P value summary	*			
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes			
R square	0.9135			
Number of families	1			
Number of comparisons per family	6			
Alpha	0.05			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
CTRL vs. ATG4B MF10	0.2250	-0.003929 to 0.4539	No	ns
CTRL vs. ATG4B IL1B	-0.1050	-0.3339 to 0.1239	No	ns
CTRL vs. ATG4B MF10+IL1B	0.1550	-0.07393 to 0.3839	No	ns
ATG4B MF10 vs. ATG4B IL1B	-0.3300	-0.5589 to -0.1011	Yes	*
ATG4B MF10 vs. ATG4B MF10+IL1B	-0.07000	-0.2989 to 0.1589	No	ns
ATG4B IL1B vs. ATG4B MF10+IL1B	0.2600	0.03107 to 0.4889	Yes	*

Los resultados obtenidos muestran que las condiciones de IL1 β elevan el nivel de expresión de los genes analizados, mientras que las condiciones con MF10 no parecen mostrar los cambios en la expresión detectados en el array de genes, al menos para PTEN y GABARAPL1, por lo que los resultados obtenidos no confirman aquellos obtenidos en el array de autofagia. Las sondas TaqMan son más específicas que los ensayos donde se empleó el fluoróforo SYBR Green, Para confirmar los resultados obtenidos, deberíamos aumentar el número de experimentos realizados para hacer la estadística más robusta.

A su vez, sería interesante realizar los experimentos con células de cultivo primario procedentes de pacientes con edades avanzadas o procedentes de pacientes artrósicos.

5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a lo largo de este estudio, podemos concluir que:

1. La dosis de Metformina de 10 μM y el tiempo de incubación de 6h proporciona las medidas más estables de los niveles de expresión génica en células T/C28a2.
2. El array de genes de autofagia muestra un aumento general de la expresión génica tras la incubación a 6h, obteniendo diferencias significativas en genes como PTEN y GABARAPL1, que sufren un aumento de expresión del 50%.
3. Los datos indican una relación entre el efecto de la Metformina sobre la autofagia a través del mantenimiento del balance energético celular, la promoción de la mitofagia y la inhibición de la vía proinflamatoria pero la validación mediante incubación con Interleucina 1 β , que produce una situación de estrés inflamatorio, no ha proporcionado resultados concluyentes.

Para mejorar el estudio, se hace evidente la necesidad de obtener un mayor número de resultados para fortalecer el análisis estadístico, la optimización del flujo de trabajo, así como dar un paso más allá y establecer nuevos experimentos con células de cartílago de pacientes artrósicos, para averiguar si el efecto de la Metformina se vuelve más notorio sobre células dañadas.

6. Bibliografía

- Aigner, T., Soeder, S., Gebhard, P.M., McAlinden, A. y Haag, J. (2007). Mechanisms of Disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis - structure, chaos and senescence. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, Vol. 3 (7), p. (391-399).
- Bansal, M., Moharir, S. C. y Swarup, G. (2018). Autophagy receptor optineurin promotes autophagosome formation by potentiating LC3-II production and phagophore maturation. *Communicative & Integrative Biology*, Vol. 11 (2), p. (1-4).
- Betin, V. M. S. y Lane, J. D. (2009). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *Journal of Cell Science*, Vol. 122, p. (2554-2566).
- Boyer-Guittaut, M., Poillet, L., Liang, Q., Bôle-Richard, E., Ouyang, X., Benavides, G. A., Chakrama, F., Fraichard, A., Darley-Usmar, V. M., Despouy, G., Jouvenot, M., Delage-Mourroux, R. y Zhang, J. (2014). The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy*, Vol. 10 (6), p. (986-1003).
- Buckwalter, J.A., Mankin, H.J. y Grodzinsky, A.J. (2005). Articular Cartilage and Osteoarthritis. *Instructional Course Lectures*, Vol. 54, p. (465-480).
- Caramés, B., Taniguchi, N., Otsuki, S., Blanco, F.J. y Lotz, M. (2010). Autophagy is a protective mechanism in normal cartilage, and its aging-related is linked with cell death and Osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, Vol. 62 (3), p. (791-801).
- Caramés, B., Hasegawa, A., Taniguchi, N., Miyaki, S., Blanco, F.J. y Lotz, M. (2012). Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, Vol. 71 (4), p. (575-581).

- Chakrama, F., Seguin-Py, S., Le Grand, J. N., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Despouy, G., Perez, V., Jouvenot, M. y Boyer-Guittaut, M. (2010). GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy*, Vol. 6 (4), p. (495-505).
- Cheng, N., Meng, H., Ma, L., Zhang, L., Yu, H., Wang, Z. y Guo, A. (2017). Role of autophagy in the progression of osteoarthritis: The autophagy inhibitor, 3-methyladenine, aggravates the severity of experimental osteoarthritis. *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. 39 (5), p. (1224-1232).
- Herzig, S. y Shaw, R. J. (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. Vol. 19 (2), p. (121-135).
- Isoda, K., Young, J. L., Zirlik, A., MacFarlane, L. A., Tsuboi, N., Gerdes, N., Schnöbeck, U. y Libby, P. (2006). Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor NF- κ B in human vascular wall cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, Vol. 26, p. (611-617).
- Kabaya, Y., Mizushima, N., Uero, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y. y Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO Journal*, Vol. 19 (21), p. (5720-5728).
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. y Guan, KL. (2014). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, Vol. 13 (2), p. (132-141).
- Kim, S. A. y Choi, C. (2012). Metformin inhibits inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 425, p. (866-872).
- Knowler, W. C., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, E. A. y Nathan, D. M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *New England Journal of Medicine*, Vol. 346 (6), p. (392-403).

- Loeser, R.F., Collins, J.A. y Diekman, B.O. (2016). Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, Vol. 12 (7), p. (412-420).
- López-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., y Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, Vol. 153, p. (1194-1217).
- Lotz, M. K. y Caramés, B. (2011). Autophagy and cartilage homeostasis mechanisms in joint health, aging and OA. *Nature Reviews Rheumatology*, Vol. 7 (10), p. (579-587).
- Martel-Pelletier, J., Barr, A.J., Cicuttini, F.M., Conaghan, P.G., Cooper, C., Goldring, S.R., Jones, G., Teichtahl, A.J., y Pelletier, JP. (2016). Osteoarthritis. *Nature Reviews Disease Primers*, Vol. 2, p. (1-18).
- Martin-Montalvo, A., Mercken, E.M., Mitchell, S.J., Palacios, H.H., Mote, P.L., Scheibye-Knudsen, M., Gomes, A.P., Ward, T.M., Minor, R.K., Blouin, MJ., Schwab, M., Pollak, M., Zhang, Y., Yu, Y., Becker, K.G., Bohr, V.A., Ingram, D.K., Sinclair, D.A., Wolf, N.S., Spindler, S.R., Bernier, M. y de Cabo, R. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nature Communications*, Vol. 4, 2192. DOI: 10.1038/ncomms3192.
- Matsuzaki, T., Alvarez-Garcia, O., Mokuda S., Nagira, K., Olmer, M., Gamini, R., Miyata, K., Akasaki, Y., Su, A.I., Asahara, H. y Lotz, M.K. (2018). FoxO transcription factors modulate autophagy and proteoglycan 4 in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Science Translational Medicine*, Vol. 10, p. (1-12).
- Meley, D., Bauvy, C., Houben-Weerts, J. H. P. M., Dubbelhuis, P. F., Helmond, M. T. J., Codogno, P. y Meijer, A. J. (2006). AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281 (46), p. (34870-34879).
- Onken, B. y Driscoll, M. (2010) Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLOS ONE*, Vol. 5 (1).
- Pattingre, S. y Levine, B. (2006). Bcl-2 Inhibition of autophagy: a new route to cáncer? *Cancer Research*, Vol. 66 (6), p. (2885-2888).

- Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E.G. y Korolchuck, V. I. (2017). mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in Biochemistry*, Vol. 61 (6), p. (565-584).
- Ramírez-Sagredo, A., Aleman, L., Villa, M., Chávez, M. N., García, L. y Lavandero, S. (2016). Autofagia en el sistema cardiovascular: pasado, presente y futuro. *Revista chilena de Cardiología*, Vol. 35 (3), p. (228-241).
- van der Kraan, P.M., Buma, P., van Kuppevelt, T. y van den Berg, W.B. (2002). Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 10 (8), p. (631-637).
- Vinatier, C., Dominguez, E., Guicheux, J. y Caramés, B. (2018). Role of the inflammation-autophagy-senescence integrative network in osteoarthritis. *Frontiers in Physiology*, 9:706. DOI: 10.3389/fphys.2018.00706
- Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M. y Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, Vol. 122 (5-6), p. (253-270).
- Wang, J., Davis, S., Menon, S., Zhang, J., Ding, J., Cervantes, S., Miller, E., Jiang, Y. y Ferro-Novick, S. (2015). Ypt1/Rab1 regulates Hrr25/CK1 δ kinase activity in ER-Golgi traffic and macroautophagy. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 210 (2), p. (273-285).
- Xie, Z. y Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, Vol. 9 (10), p. (1102-1109).
- Zhang, L., Huang, C., Guo, Y., Gou, X., Hinsdale, M., Lloyd, P. Y Liu, L. (2015). MicroRNA-26b modulates the NF- κ B pathway in alveolar macrophages by regulating PTEN. *The Journal of Immunology*, Vol. 195 (11), p. (5404-5414).
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. y Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 108, p. (1167-1174).

ANEXO

Tabla A1

Resultados sobre los niveles de expresión, normalizados y relativizados frente al control, de los genes analizados en el array de autofagia. En verde se remarcan los genes de referencia que se han tomado en cuenta para el análisis. (Umbral de regulación = +/- 1,5; p-valor significativo ≤ 0,05).

Target	Sample	Mean Cq	Mean Efficiency Corrected Cq	Normalized Expression	Relative Normalized Expression	Regulation	Compared to Regulation Threshold	P-Value	Exceeds P-Value Threshold
ACTB	Control	19,55	19,55	11,87619	1	1	No change	N/A	No
ACTB	MF10	18,97	18,97	18,12614	1,52626	1,52626	Up regulated	0,375967	Yes
AKT1	Control	26,3	26,3	0,11034	1	1	No change	N/A	No
AKT1	MF10	25,95	25,95	0,14409	1,30586	1,30586	No change	0,327699	Yes
AMBRA1	Control	30,03	30,03	0,00834	1	1	No change	N/A	No
AMBRA1	MF10	29,03	29,03	0,01698	2,03496	2,03496	Up regulated	0,228065	Yes
APP	Control	26,23	26,23	0,11582	1	1	No change	N/A	No
APP	MF10	25,52	25,52	0,19412	1,67597	1,67597	Up regulated	0,135381	Yes
ATG10	Control	28,44	28,44	0,02503	1	1	No change	N/A	No
ATG10	MF10	28,39	28,39	0,02646	1,05702	1,05702	No change	0,716732	Yes
ATG12	Control	26,38	26,38	0,10439	1	1	No change	N/A	No
ATG12	MF10	26,23	26,23	0,11826	1,13288	1,13288	No change	0,656989	Yes
ATG16L1	Control	29,56	29,56	0,01156	1	1	No change	N/A	No
ATG16L1	MF10	28,77	28,77	0,02033	1,7593	1,7593	Up regulated	0,318752	Yes
ATG16L2	Control	30,85	30,85	0,00471	1	1	No change	N/A	No
ATG16L2	MF10	31,28	31,28	0,00358	0,76049	-1,31494	No change	0,671899	Yes
ATG3	Control	24,62	24,62	0,35478	1	1	No change	N/A	No
ATG3	MF10	24,64	24,64	0,35601	1,00347	1,00347	No change	0,976957	Yes
ATG4A	Control	28,94	28,94	0,0177	1	1	No change	N/A	No
ATG4A	MF10	28,5	28,5	0,02452	1,38511	1,38511	No change	0,388806	Yes
ATG4B	Control	27,02	27,02	0,06722	1	1	No change	N/A	No
ATG4B	MF10	26,47	26,47	0,10013	1,48968	1,48968	No change	0,259159	Yes
ATG4C	Control	28,12	28,12	0,03125	1	1	No change	N/A	No
ATG4C	MF10	28,06	28,06	0,03338	1,06807	1,06807	No change	0,614018	Yes
ATG4D	Control	28,11	28,11	0,03147	1	1	No change	N/A	No
ATG4D	MF10	27,68	27,68	0,04343	1,38032	1,38032	No change	0,206007	Yes
ATG5	Control	26	26	0,13631	1	1	No change	N/A	No
ATG5	MF10	26,14	26,14	0,12631	0,92659	-1,07923	No change	0,662863	Yes
ATG7	Control	26,97	26,97	0,06959	1	1	No change	N/A	No
ATG7	MF10	26,57	26,57	0,09375	1,34723	1,34723	No change	0,51415	Yes
ATG9A	Control	26,63	26,63	0,08778	1	1	No change	N/A	No
ATG9A	MF10	26,22	26,22	0,11949	1,36131	1,36131	No change	0,386384	Yes
B2M	Control	21,41	21,41	3,28297	1	1	No change	N/A	No

B2M	MF10	21,64	21,64	2,85799	0,87055	-1,1487	No change	0,521619	Yes
BAD	Control	26,5	26,5	0,09639	1	1	No change	N/A	No
BAD	MF10	26,28	26,28	0,11463	1,18921	1,18921	No change	0,430572	Yes
BAK1	Control	28,49	28,49	0,02426	1	1	No change	N/A	No
BAK1	MF10	27,67	27,67	0,04359	1,79626	1,79626	Up regulated	0,128572	Yes
BAX	Control	26,99	26,99	0,06863	1	1	No change	N/A	No
BAX	MF10	26,44	26,44	0,10259	1,49485	1,49485	No change	0,263135	Yes
BCL2	Control	32,37	32,37	0,00164	1	1	No change	N/A	No
BCL2	MF10	32,11	32,11	0,00202	1,22688	1,22688	No change	0,842393	Yes
BCL2L1	Control	26,94	26,94	0,07081	1	1	No change	N/A	No
BCL2L1	MF10	26,6	26,6	0,09182	1,29684	1,29684	No change	0,780416	Yes
BECN1	Control	26,62	26,62	0,0887	1	1	No change	N/A	No
BECN1	MF10	26,22	26,22	0,11949	1,34723	1,34723	No change	0,364491	Yes
BID	Control	27,13	27,13	0,06207	1	1	No change	N/A	No
BID	MF10	26,71	26,71	0,08508	1,37078	1,37078	No change	0,6421	Yes
BNIP3	Control	24,78	24,78	0,31644	1	1	No change	N/A	No
BNIP3	MF10	24,91	24,91	0,29525	0,93303	-1,07177	No change	0,710866	Yes
CASP3	Control	26,72	26,72	0,08247	1	1	No change	N/A	No
CASP3	MF10	26,39	26,39	0,10584	1,28343	1,28343	No change	0,100782	Yes
CASP8	Control	28,45	28,45	0,02495	1	1	No change	N/A	No
CASP8	MF10	27,85	27,85	0,03847	1,54221	1,54221	Up regulated	0,444398	Yes
CDKN1B	Control	26,1	26,1	0,12674	1	1	No change	N/A	No
CDKN1B	MF10	26,04	26,04	0,13537	1,06807	1,06807	No change	0,340352	Yes
CDKN2A	Control	24,71	24,71	0,33217	1	1	No change	N/A	No
CDKN2A	MF10	24,8	24,8	0,31975	0,96259	-1,03886	No change	0,809203	Yes
CLN3	Control	27,13	27,13	0,06228	1	1	No change	N/A	No
CLN3	MF10	26,74	26,74	0,08304	1,3333	1,3333	No change	0,50609	Yes
CTSB	Control	26,38	26,38	0,10439	1	1	No change	N/A	No
CTSB	MF10	25,99	25,99	0,14015	1,34257	1,34257	No change	0,542997	Yes
CTSD	Control	25,74	25,74	0,16267	1	1	No change	N/A	No
CTSD	MF10	25,19	25,19	0,24316	1,49485	1,49485	No change	0,340303	Yes
CTSS	Control	30,32	30,32	0,00682	1	1	No change	N/A	No
CTSS	MF10	30,27	30,27	0,00721	1,05702	1,05702	No change	0,863525	Yes
CXCR4	Control	34,04	34,04	0,00052	1	1	No change	N/A	No
CXCR4	MF10	35	35	0,00027	0,52486	-1,90528	Down regulated	N/A	No
DAPK1	Control	29,48	29,48	0,01217	1	1	No change	N/A	No
DAPK1	MF10	29,35	29,35	0,01365	1,12117	1,12117	No change	0,806609	Yes
DRAM1	Control	26,48	26,48	0,0974	1	1	No change	N/A	No
DRAM1	MF10	26,48	26,48	0,09944	1,02101	1,02101	No change	0,919593	Yes
DRAM2	Control	27,48	27,48	0,04887	1	1	No change	N/A	No
DRAM2	MF10	27,66	27,66	0,04404	0,90125	-1,10957	No change	0,578758	Yes
EIF2AK3	Control	29,54	29,54	0,01168	1	1	No change	N/A	No
EIF2AK3	MF10	28,87	28,87	0,01904	1,63014	1,63014	Up regulated	0,12745	Yes
EIF4G1	Control	23,38	23,38	0,83799	1	1	No change	N/A	No
EIF4G1	MF10	22,84	22,84	1,24401	1,48452	1,48452	No change	0,287856	Yes
ESR1	Control	34,4	34,4	0,0004	1	1	No change	N/A	No
ESR1	MF10	35	35	0,00027	0,67129	-1,48968	No change	0,435164	Yes

FADD	Control	28,38	28,38	0,02619	1	1	No change	N/A	No
FADD	MF10	27,86	27,86	0,03821	1,45902	1,45902	No change	0,442487	Yes
FAS	Control	31,01	31,01	0,00423	1	1	No change	N/A	No
FAS	MF10	30,61	30,61	0,0057	1,34723	1,34723	No change	0,722513	Yes
GAA	Control	28,73	28,73	0,02055	1	1	No change	N/A	No
GAA	MF10	27,99	27,99	0,03504	1,70527	1,70527	Up regulated	0,202037	Yes
GABARAP	Control	23,12	23,12	1	1	1	No change	N/A	No
GABARAP	MF10	23,21	23,21	0,95926	0,95926	-1,04247	No change	0,950235	Yes
GABARAPL1	Control	28,47	28,47	0,0246	1	1	No change	N/A	No
GABARAPL1	MF10	27,63	27,63	0,04497	1,82766	1,82766	Up regulated	0,046904	No
GABARAPL2	Control	24,02	24,02	0,53589	1	1	No change	N/A	No
GABARAPL2	MF10	24,17	24,17	0,49312	0,92019	-1,08673	No change	0,796771	Yes
GAPDH	Control	18,27	18,27	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
GAPDH	MF10	18,25	18,25	N/A	N/A	N/A	No change	0,968715	Yes
GUSB	Control	27,51	27,51	0,04786	1	1	No change	N/A	No
GUSB	MF10	27,39	27,39	0,05311	1,10957	1,10957	No change	0,758457	Yes
HDAC1	Control	26,22	26,22	0,11703	1	1	No change	N/A	No
HDAC1	MF10	25,72	25,72	0,16899	1,44393	1,44393	No change	0,312027	Yes
HDAC6	Control	28,49	28,49	0,02418	1	1	No change	N/A	No
HDAC6	MF10	28,19	28,19	0,0304	1,25701	1,25701	No change	0,483551	Yes
HGS	Control	27,1	27,1	0,06359	1	1	No change	N/A	No
HGS	MF10	26,53	26,53	0,09639	1,51572	1,51572	Up regulated	0,351744	Yes
HPRT1	Control	24,16	24,16	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
HPRT1	MF10	24,34	24,34	N/A	N/A	N/A	No change	0,637901	Yes
HSP90AA1	Control	21,88	21,88	2,37019	1	1	No change	N/A	No
HSP90AA1	MF10	21,9	21,9	2,37841	1,00347	1,00347	No change	0,930869	Yes
HSPA8	Control	21,84	21,84	2,43682	1	1	No change	N/A	No
HSPA8	MF10	21,59	21,59	2,94854	1,20999	1,20999	No change	0,58408	Yes
HTT	Control	27,25	27,25	0,05731	1	1	No change	N/A	No
HTT	MF10	26,76	26,76	0,0819	1,42899	1,42899	No change	0,131949	Yes
IGF1	Control	32,14	32,14	0,00193	1	1	No change	N/A	No
IGF1	MF10	33,71	33,71	0,00066	0,34389	-2,90795	Down regulated	0,449846	Yes
IRGM	Control	35	35	0,00027	1	1	No change	N/A	No
IRGM	MF10	35	35	0,00027	1,02101	1,02101	No change	N/A	No
LAMP1	Control	24,06	24,06	0,52123	1	1	No change	N/A	No
LAMP1	MF10	23,67	23,67	0,69979	1,34257	1,34257	No change	0,318967	Yes
MAP1LC3A	Control	28,96	28,96	0,01752	1	1	No change	N/A	No
MAP1LC3A	MF10	28,35	28,35	0,0272	1,55294	1,55294	Up regulated	0,206527	Yes
MAP1LC3B	Control	24,04	24,04	0,52851	1	1	No change	N/A	No
MAP1LC3B	MF10	24,11	24,11	0,51406	0,97265	-1,02811	No change	0,838065	Yes
MAPK14	Control	28,18	28,18	0,03008	1	1	No change	N/A	No
MAPK14	MF10	27,51	27,51	0,04887	1,6245	1,6245	Up regulated	0,214461	Yes
MAPK8	Control	27,44	27,44	0,05007	1	1	No change	N/A	No
MAPK8	MF10	27,12	27,12	0,06403	1,27899	1,27899	No change	0,519798	Yes
MTOR	Control	26,92	26,92	0,07179	1	1	No change	N/A	No
MTOR	MF10	26,01	26,01	0,13774	1,91853	1,91853	Up regulated	0,101314	Yes
NFKB1	Control	29,29	29,29	0,01394	1	1	No change	N/A	No

NFKB1	MF10	28,69	28,69	0,02157	1,54756	1,54756	Up regulated	0,48979	Yes
NPC1	Control	27,09	27,09	0,06403	1	1	No change	N/A	No
NPC1	MF10	26,65	26,65	0,08839	1,38032	1,38032	No change	0,419581	Yes
PIK3C3	Control	26,19	26,19	0,11949	1	1	No change	N/A	No
PIK3C3	MF10	26,03	26,03	0,13584	1,13682	1,13682	No change	0,296554	Yes
PIK3CG	Control	33,09	33,09	0,001	1	1	No change	N/A	No
PIK3CG	MF10	33,89	33,89	0,00058	0,58439	-1,71119	Down regulated	0,683213	Yes
PIK3R4	Control	26,74	26,74	0,08133	1	1	No change	N/A	No
PIK3R4	MF10	26,45	26,45	0,10188	1,25266	1,25266	No change	0,452901	Yes
PTEN	Control	28,72	28,72	0,02062	1	1	No change	N/A	No
PTEN	MF10	28	28	0,03467	1,68179	1,68179	Up regulated	0,01055	No
RAB24	Control	29,18	29,18	0,01499	1	1	No change	N/A	No
RAB24	MF10	29,08	29,08	0,0164	1,09429	1,09429	No change	0,690345	Yes
RB1	Control	26,26	26,26	0,11344	1	1	No change	N/A	No
RB1	MF10	26,23	26,23	0,11826	1,04247	1,04247	No change	0,793749	Yes
RGS19	Control	35	35	0,00027	1	1	No change	N/A	No
RGS19	MF10	35	35	0,00027	1,02101	1,02101	No change	N/A	No
RPLP0	Control	21,27	21,27	3,61752	1	1	No change	N/A	No
RPLP0	MF10	21,06	21,06	4,25748	1,17691	1,17691	No change	0,711059	Yes
RPS6KB1	Control	27,79	27,79	0,03928	1	1	No change	N/A	No
RPS6KB1	MF10	27,07	27,07	0,06606	1,68179	1,68179	Up regulated	0,068887	Yes
SNCA	Control	33,47	33,47	0,00077	1	1	No change	N/A	No
SNCA	MF10	35	35	0,00027	0,35233	-2,83825	Down regulated	0,424842	Yes
SQSTM1	Control	24,17	24,17	0,48464	1	1	No change	N/A	No
SQSTM1	MF10	23,87	23,87	0,60921	1,25701	1,25701	No change	0,427233	Yes
TBP	Control	26,94	26,94	N/A	N/A	N/A	No change	N/A	No
TBP	MF10	26,86	26,86	N/A	N/A	N/A	No change	0,804406	Yes
TGFB1	Control	25,82	25,82	0,15389	1	1	No change	N/A	No
TGFB1	MF10	25,32	25,32	0,22298	1,44894	1,44894	No change	0,317754	Yes
TGM2	Control	34,27	34,27	0,00044	1	1	No change	N/A	No
TGM2	MF10	35	35	0,00027	0,61557	-1,6245	Down regulated	N/A	No
TMEM74	Control	33,09	33,09	0,001	1	1	No change	N/A	No
TMEM74	MF10	32,24	32,24	0,00184	1,84676	1,84676	Up regulated	0,294102	Yes
TNF	Control	35	35	0,00027	1	1	No change	N/A	No
TNF	MF10	35	35	0,00027	1,02101	1,02101	No change	N/A	No
TNFSF10	Control	32,42	32,42	0,00159	1	1	No change	N/A	No
TNFSF10	MF10	32,45	32,45	0,00159	1	1	No change	0,958653	Yes
TP53	Control	25,08	25,08	0,25703	1	1	No change	N/A	No
TP53	MF10	24,61	24,61	0,36349	1,41421	1,41421	No change	0,351408	Yes
ULK1	Control	27,32	27,32	0,05441	1	1	No change	N/A	No
ULK1	MF10	27,12	27,12	0,06403	1,17691	1,17691	No change	0,670292	Yes
ULK2	Control	29,7	29,7	0,01049	1	1	No change	N/A	No
ULK2	MF10	29,3	29,3	0,01408	1,34257	1,34257	No change	0,212669	Yes
UVRAG	Control	28,59	28,59	0,02264	1	1	No change	N/A	No
UVRAG	MF10	28,42	28,42	0,02601	1,1487	1,1487	No change	0,75719	Yes
WIPI1	Control	28,76	28,76	0,02005	1	1	No change	N/A	No
WIPI1	MF10	28,61	28,61	0,02272	1,13288	1,13288	No change	0,464635	Yes

Tabla A2

Descripción breve de la función de cada uno de los genes incluidos en el array comercial de autofagia de Bio-Rad. Información extraída de la web de Bio-Rad: <http://www.bio-rad.com/>.

GENES	DESCRIPCIÓN
ACTB	El gen ACTB codifica la proteína Beta (β)-actina. Este gen codifica una de las seis diferentes proteínas actina. Las actinas son proteínas altamente conservadas. Están organizadas en una red de fibras llamada citoesqueleto de actina, que forma el marco estructural dentro de las células.
AKT1	AKT1 es una de las 3 serina / treonina quinasas relacionadas (AKT1, AKT2 y AKT3) llamada AKT quinasa, y que regulan muchos procesos, incluyendo el metabolismo, la proliferación, la supervivencia celular, el crecimiento y la angiogénesis. La serina-treonina proteína quinasa codificada por el gen AKT1 es catalíticamente inactiva en fibroblastos primarios e inmortalizados privados de suero. AKT1 y el AKT2 se activan por el factor de crecimiento derivado de plaquetas. La activación es rápida y específica, y se anula por mutaciones en el dominio de homología pleckstrin de AKT1. Se demostró que la activación se produce a través de fosfatidilinositol 3-quinasa. En el sistema nervioso en desarrollo, AKT es un mediador crítico de la supervivencia neuronal inducida por factores de crecimiento. Los factores de supervivencia pueden suprimir la apoptosis de una manera independiente de la transcripción activando la serina / treonina quinasa AKT1 que luego fosforila e inactiva los componentes de la maquinaria apoptótica. Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de Proteus. Se han encontrado múltiples variantes de transcritos alternativamente empalmados para este gen
AMBRA1	Ulk1 fosforila directamente AMBRA1, una <i>scaffold protein</i> en el complejo de beclin-1. Activación de autofagia. <i>Scaffold protein</i> que promueve la ubiquitinación de ULK1 por el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6).
APP	Proteína precursora beta amiloide (<i>Amiloid beta precursor protein</i>). Este gen codifica un receptor de superficie celular y una proteína precursora transmembrana que es escindida por secretasas para formar un número de péptidos. La autofagia, que está desregulada en la enfermedad de Alzheimer, participa en el metabolismo del péptido A β . Su secreción está mediada por la autofagia. Aumento de la neurodegeneración inducida por la deficiencia de autofagia, ya que induce la acumulación

	intracelular de A β que finalmente causa la muerte celular.
B2M	Este gen codifica la Microglobulina beta (β)-2 (<i>Beta-2-microglobulin</i>). Es una proteína sérica encontrada en asociación con la cadena pesada del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I en la superficie de casi todas las células nucleadas. La proteína tiene una estructura donde predomina la lámina beta-plisada que puede formar fibrillas amiloides en algunas condiciones patológicas. B2M está elevada envejecimiento en la sangre de humanos y ratones, es un factor sistémico de envejecimiento que afecta la función cognitiva y la neurogénesis. B2M también se ha encontrado en niveles aumentados en pacientes con enfermedad de Alzheimer y otros trastornos cognitivo
ATG10	La autofagia es un proceso para la degradación de los elementos citosólicos mediante compartimentos citosólicos mediante enzimas lisosomales tras fusionarse con un lisosoma. ATG10 es una enzima similar a E2 implicada en 2 modificaciones similares a ubiquitina esenciales para la formación de autophagosome: la conjugación de ATG12 y ATG5 y modificación de una forma soluble de MAP-LC3 (MAP1LC3A) un homólogo de levadura Apg8 a una forma unida a la membrana
ATG12	Proteína de tipo ubiquitina implicada en la formación de vesículas de autofagia. La conjugación con ATG5 a través de un sistema de conjugación de tipo ubiquitina que incluye también ATG7 como una enzima activadora de tipo E1 y ATG10 como una enzima de conjugación de tipo E2, es esencial para su función. El conjugado ATG12-ATG5 actúa como una enzima de tipo E3 que se requiere para la lipidación de las proteínas de la familia ATG8 y su asociación a las membranas de las vesículas. El conjugado ATG12-ATG5 también regula negativamente la respuesta inmune antiviral innata mediante el bloqueo de la vía de producción de IFN de tipo I a través de la asociación directa con RARRES3 y MAVS. Juega también un papel en la traducción o entrega del ARN viral entrante al aparato de traducción.
ATG16L1	Juega un papel esencial en la autofagia: interactúa con ATG12-ATG5 para mediar la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3 (MAP1LC3A, MAP1LC3B o MAP1LC3C), para producir una forma activada de membrana de LC3 llamada LC3-II. Por lo tanto, controla el alargamiento de la membrana autophagosomal naciente. Regula la producción de interferón mitocondrial de señalización antiviral (MAVS) tipo I (IFN-I). Regula negativamente la respuesta de citoquinas inflamatorias impulsada por NOD1 y NOD2. Juega un papel en la regulación de la morfología y la función de la célula de Paneth.
ATG16L2	
ATG3	Encima de conjugación E2 requerida en el citoplasma para el transporte de vacuolas (Cvt), autofagia y homeostasis

	<p>mitocondrial. Responsable de la unión covalente de tipo E2 de fosfatidiletanolamina al C-terminal Gly de proteínas similares a ATG8 (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2 o MAP1LC3A). El conjugado ATG12-ATG5 desempeña un papel de E3 y promueve la transferencia de proteínas de tipo ATG8 de ATG3 a fosfatidiletanolamina (PE). Este paso es necesario para la asociación de la membrana de proteínas de tipo ATG8. La formación de los conjugados ATG8-fosfatidiletanolamina es esencial para la autofagia y para el citoplasma para el transporte de vacuolas (Cvt). El sustrato preferido es MAP1LC3A. También actúa como una enzima autocatalítica similar a E2, que cataliza la conjugación de ATG12 a sí misma, la conjugación de ATG12 a ATG3 desempeña un papel en la homeostasis mitocondrial pero no en la autofagia. ATG7 (enzima tipo E1) facilita esta reacción formando un complejo E1-E2 con ATG3. Promueve la ciliogénesis primaria mediante la eliminación de OFD1 de los satélites centriolares a través de la vía autofágica.</p>
ATG4A	<p>Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas autofágicas. La proteína codificada también se designa como un miembro de la familia C-54 de cisteína proteasas. Se han identificado variantes de transcripción que codifican distintas isoformas. Es una cysteine protease requerida en el citoplasma para el transporte de vacuolas (Cvt) y autofagia. Se escinde el aminoácido C-terminal de las proteínas de la familia ATG8 para revelar una glicina C-terminal. La exposición de la glicina en el extremo C es esencial para la conjugación de las proteínas ATG8 con la fosfatidiletanolamina (PE) y la inserción en las membranas, lo que es necesario para la autofagia. El sustrato preferido es GABARAPL2 seguido de MAP1LC3A y GABARAP. También tiene una actividad de enzima deslipidante para las formas conjugadas con PE.</p>
ATG4B	<p>Es una Cysteine protease requerida para el citoplasma al transporte de vacuolas (Cvt) y autofagia. Se escinde el aminoácido C-terminal de las proteínas de la familia ATG8 MAP1LC3, GABARAPL1, GABARAPL2 y GABARAP, para revelar una glicina C-terminal. La exposición de la glicina en el extremo C es esencial para la conjugación de las proteínas ATG8 con la fosfatidiletanolamina (PE) y la inserción en las membranas, lo que es necesario para la autofagia. También tiene una actividad de enzima deslipidante para las formas conjugadas con PE.</p>
ATG4C	<p>Autophagy is the process by which endogenous proteins and damaged organelles are destroyed intracellularly. Autophagy is postulated to be essential for cell homeostasis and cell remodeling during differentiation metamorphosis non-apoptotic cell death and aging. Reduced levels of autophagy have been described in some malignant tumors and a role for autophagy in controlling the unregulated cell growth linked to cancer has been proposed. This gene encodes a member of the autophagin protein family. The encoded protein is also</p>

	designated as a member of the C-54 family of cysteine proteases. Alternate transcriptional splice variants encoding the same protein have been characterized.
ATG4D	<p>Cysteine protease ATG4D: Proteasa de cisteína requerida para el citoplasma al transporte de vacuolas (Cvt) y autofagia. Se escinde el aminoácido C-terminal de las proteínas de la familia ATG8 MAP1LC3 y GABARAPL2, para revelar una glicina C-terminal. La exposición de la glicina en el extremo C es esencial para la conjugación de las proteínas ATG8 con la fosfatidiletanolamina (PE) y la inserción en las membranas, lo que es necesario para la autofagia. También tiene una actividad de enzima deslipidante para las formas conjugadas con PE.</p> <p>Cysteine protease ATG4D, mitocondrial: desempeña un papel como regulador de la autofagia que vincula la disfunción mitocondrial con la apoptosis. La importación mitocondrial de ATG4D durante el estrés celular y la diferenciación puede desempeñar un papel importante en la regulación de la fisiología mitocondrial, ROS, mitofagia y viabilidad celular.</p>
ATG5	The protein encoded by this gene, in combination with autophagy protein 12, functions as an E1-like activating enzyme in a ubiquitin-like conjugating system. The encoded protein is involved in several cellular processes, including autophagic vesicle formation, mitochondrial quality control after oxidative damage, negative regulation of the innate antiviral immune response, lymphocyte development and proliferation, MHC II antigen presentation, adipocyte differentiation, and apoptosis. Several transcript variants encoding different protein isoforms have been found for this gene.
ATG7	This gene was identified based on homology to <i>Pichia pastoris</i> GSA7 and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> APG7. In the yeast the protein appears to be required for fusion of peroxisomal and vacuolar membranes. The protein shows homology to the ATP-binding and catalytic sites of the E1 ubiquitin activating enzymes
ATG9A	
BAD	(<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>). La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia BCL-2. Se sabe que los miembros de la familia BCL-2 son reguladores de la muerte celular programada. Esta proteína regula positivamente la apoptosis celular formando heterodímeros con BCL-xL y BCL-2, e invirtiendo su actividad represora mortal. La actividad proapoptótica de esta proteína se regula a través de su fosforilación. Se descubrió que las proteínas quinasas AKT y MAP quinasa, así como la proteína fosfatasa calcineurina, estaban implicadas en la regulación de esta proteína
BAK1	(<i>BCL2 agonist/killer 1</i>). La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas BCL2. Los miembros de esta familia forman oligómeros o heterodímeros y actúan como reguladores anti o proapoptóticos que están implicados en una

	<p>amplia variedad de actividades celulares. Esta proteína se localiza en las mitocondrias, y funciona para inducir la apoptosis. Interacciona y acelera la apertura del canal aniónico mitocondrial dependiente del voltaje, lo que conduce a una pérdida de potencial de la membrana ya la liberación del citocromo c. Esta proteína también interactúa con el supresor de tumores P53 después de la exposición al estrés célula.</p>
BAX	<p>(<i>BCL2 associate X, apoptosis regulator</i>). La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas BCL2. Los miembros de la familia BCL2 forman hetero- o homodímeros y actúan como reguladores anti o pro-apoptóticos que están implicados en una amplia variedad de actividades celulares. Esta proteína forma un heterodímero con BCL2, y funciona como un activador apoptótico. Se informa que esta proteína interactúa con el canal aniónico dependiente del voltaje mitocondrial (VDAC), e incrementa su apertura, lo que conduce a la pérdida de potencial de la membrana ya la liberación del citocromo c. La expresión de este gen está regulada por el supresor tumoral P53 y se ha demostrado que está implicada en la apoptosis mediada por P53.</p>
BCL2	<p>(<i>B-cell lymphoma 2</i>). Este gen codifica una proteína de membrana mitocondrial externa integral que bloquea la muerte apoptótica de algunas células, tales como linfocitos. Hasta la fecha, se han identificado un total de 25 genes en la familia Bcl-2: Algunas de las proteínas anti-apoptóticas incluyen Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG. Algunas de las proteínas pro-apoptóticas incluyen Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik y Blk.</p>
BCL2L1	<p>La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de proteínas BCL-2. Los miembros de la familia BCL-2 forman hetero- o homodímeros y actúan como reguladores anti o pro-apoptóticos que están implicados en una amplia variedad de actividades celulares. Y por lo tanto controla la producción de especies reactivas de oxígeno y la liberación de citocromo C por las mitocondrias, los cuales son los potentes inductores de la apoptosis celular.</p>
BECN1	<p>Codifica la proteína beclin1. Este gen codifica una proteína que regula la iniciación de la autofagia. La proteína codificada es un componente del complejo fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que media los procesos de tráfico de vesículas (proteína regulada de autofagia 1 (AMBRA1)). Se cree que esta proteína juega un papel en múltiples procesos celulares, incluyendo tumorigénesis, neurodegeneración y apoptosis.</p>
BID	<p>(<i>BH3 interacting domain death agonist</i>). Este gen codifica un agonista de muerte que se heterodimeriza con el agonista BAX o con el antagonista BCL2. La proteína codificada es un miembro de la familia BCL-2 de los reguladores de muerte celular. Es un mediador del daño mitocondrial inducido por la caspasa-8 (CASP8); CASP8 escinde esta proteína codificada,</p>

	y la parte terminal de COOH se transloca a las mitocondrias donde desencadena la liberación del citocromo c.
BNIP3	(Bcl2 interacting protein 3) Este gen codifica una proteína mitocondrial que contiene un dominio BH3 y actúa como un factor pro-apoptótico. La proteína codificada interactúa con proteínas anti-apoptóticas, incluyendo la proteína E1B de 19 kDa y Bcl2
CASP3	Codifica la Caspasa 3. Este gen codifica un miembro de la familia de cisteína-ácido aspártico proteasas (caspasas). Esta proteína escinde y activa las caspasas 6, 7 y 9, y la propia proteína es procesada por las caspasas 8, 9 y 10. Es la caspasa predominante implicada en la escisión de la proteína precursora beta-amiloide 4A, que está asociada con la muerte neuronal en Enfermedad de Alzheimer
CASP8	Codifica la Caspasa 8. Este gen codifica un miembro de la familia de cisteína-ácido aspártico proteasas (caspasas). Esta proteína está implicada en la muerte celular programada inducida por Fas y diversos estímulos apoptóticos. El N-terminal FADD-como el dominio efector de muerte de esta proteína sugiere que puede interactuar con Fas-interactuar con la proteína FADD. Esta proteína se detectó en la fracción insoluble de la región cerebral afectada de los pacientes con enfermedad de Huntington, pero no en los de los controles normales, lo que implicó el papel en las enfermedades neurodegenerativas.
CDKN1B	(<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i>). Este gen codifica un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, que comparte una similitud limitada con el inhibidor CDKN1A / p21 de CDK. La proteína codificada se une y evita la activación de los complejos ciclina E-CDK2 o ciclina D-CDK4 y, por tanto, controla la progresión del ciclo celular en G1 con el fin de inducir la proliferación celular. La degradación de esta proteína, que se activa por su fosforilación dependiente de CDK y subsiguiente ubiquitinación por complejos de SCF, es necesaria para la transición celular de la quiescencia al estado proliferativo.
CDKN2A	(<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>). Actúa como regulador negativo de la proliferación de células normales al interactuar fuertemente con CDK4 y CDK6. Esto inhibe su capacidad de interactuar con ciclinas D y fosforilar la proteína de retinoblastoma.
CLN3	Este gen codifica la proteína <i>battenin</i> . Esta proteína está implicada en la función lisosómica. Las mutaciones en este, así como otros genes ceroid-lipofuscinosis neuronales (CLN), causan enfermedades neurodegenerativas comúnmente conocidas como enfermedad de Batten o colectivamente conocidas como lipofuscinosis ceroidales neuronales (NCLs).
CTSB	Este gen codifica la Catepsina B (<i>Cathepsin B</i>), un miembro de la familia C1 de peptidasas. Este gen codifica una preproteína que se procesa proteolíticamente para generar

	múltiples productos proteicos. Estos productos incluyen las cadenas ligera y pesada de catepsina B (CTSB), que pueden dimerizarse para formar la forma de doble cadena de la enzima. Esta enzima es una cisteína proteasa lisosómica con actividad tanto de endopeptidasa como de exopeptidasa que puede desempeñar un papel en la renovación de proteínas.
CTSD	Este gen codifica la Catepsina D (<i>Cathepsin D</i>), un miembro de la familia A1 de peptidasas. La preproteína codificada se procesa proteolíticamente para generar múltiples productos proteicos. Estos productos incluyen las cadenas ligeras y pesadas de catepsina D, que se heterodimerizan para formar la enzima madura. Esta enzima exhibe actividad similar a la pepsina y juega un papel en el recambio proteico y en la activación proteolítica de hormonas y factores de crecimiento.
CTSS	Este gen codifica la Catepsina S (<i>Cathepsin S</i>), un miembro de la familia de peptidasa C1, es una cisteína proteinasa lisosomal que puede participar en la degradación de proteínas antigénicas a péptidos para su presentación en moléculas de MHC de clase II.
CXCR4	(<i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i>). Este gen codifica un receptor de quimioquinas CXC específico para el factor 1 derivado de células estromales. La proteína tiene 7 regiones transmembrana y se encuentra en la superficie celular. Actúa con la proteína CD4 para apoyar la entrada del VIH en las células y también se expresa altamente en las células de cáncer de mama. Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de WHIM (verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones y mielocatexia)
DAPK1	(<i>Death associated protein kinase 1</i>). Esta proteína está asociada a apoptosis. Es un mediador positivo de la muerte celular programada inducida por interferón gamma. DAPK1 codifica una serina-treonina quinasa dependiente de calmodulina.
DRAM1	(<i>DNA damage regulated autophagy modulator 1</i>). Este gen se regula como parte de la vía supresora de tumores p53. Codifica una proteína de membrana lisosómica que se requiere para la inducción de la autofagia. La disminución de la expresión transcripcional de este gen se asocia con varios tumores.
DRAM2	(<i>DNA damage-regulated autophagy modulator 2</i>) Es un homólogo de <i>DRAM1</i> que regula la muerte celular mediada por p53. La expresión de <i>DRAM1</i> induce la autofagia de una manera dependiente de p53. Sin embargo, el papel de <i>DRAM2</i> en la autofagia no está claro. La sobreexpresión de <i>DRAM2</i> induce citoplasma puntuaciones GFP-LC3, y aumenta el nivel de endógeno LC3-II.
EIF2AK3	(<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3</i>). La proteína codificada por este gen fosforila la subunidad alfa del factor de iniciación de la traducción eucariótica 2, llevando a su inactivación, y por lo tanto a una reducción rápida de la iniciación traslacional y la represión de la síntesis de proteínas

	<p>globales. Se piensa que esta proteína modula la función mitocondrial. Se trata de una proteína de membrana de tipo I situada en el retículo endoplásmico (ER), donde es inducida por el estrés causado por proteínas mal plegadas. Las mutaciones en este gen están asociadas con el síndrome de Wolcott-Rallison.</p>
EIF4G1	<p>(<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1</i>). La proteína codificada por este gen es un componente del complejo proteico multi-subunidad EIF4F. Este complejo facilita el reclutamiento de ARNm al ribosoma, que es un paso limitador de la velocidad durante la fase de iniciación de la síntesis de proteínas. El reconocimiento de la Cap del ARNm y el desarrollamiento dependiente de ATP de la estructura secundaria 5' terminal se cataliza por factores en este complejo. La subunidad codificada por este gen es una gran <i>scaffold protein</i> que contiene sitios de unión para otros miembros del complejo EIF4F.</p>
ESR1	<p>Este gen codifica un receptor de estrógeno (<i>Estrogen receptor 1</i>), un factor de transcripción activado por ligando compuesto de varios dominios importantes para la unión a la hormona, unión al ADN y activación de la transcripción. La proteína se localiza en el núcleo donde puede formar un homodímero o un heterodímero con receptor de estrógeno 2. El estrógeno y sus receptores son esenciales para el desarrollo sexual y la función reproductiva, pero también juegan un papel en otros tejidos como el hueso. Los receptores de estrógeno también están involucrados en procesos patológicos incluyendo cáncer de mama, cáncer de endometrio y osteoporosis.</p>
FADD	<p>(<i>Fas associated via death domain</i>). La proteína codificada por este gen es una molécula adaptadora que interactúa con diversos receptores de la superficie celular y media las señales apoptóticas de las células. A través de su dominio de muerte C-terminal, esta proteína puede ser reclutada por receptor TNFRSF6 / Fas, receptor de factor de necrosis tumoral, TNFRSF25 y receptor TNFSF10 / TRAIL, y por lo tanto participa en la señalización de muerte iniciada por estos receptores. La interacción de esta proteína con los receptores desenmascara el dominio efector N-terminal de esta proteína, lo que le permite reclutar caspasa-8, y de este modo activar la cascada de cisteína proteasa.</p>
FAS	<p>(<i>Fas cell surface death receptor</i>). La proteína codificada por este gen es un miembro de la superfamilia del receptor TNF. Este receptor contiene un dominio de muerte. Se ha demostrado que desempeña un papel central en la regulación fisiológica de la muerte celular programada, y ha estado implicado en la patogénesis de diversas neoplasias malignas y enfermedades del sistema inmune.</p> <p>La interacción de este receptor con su ligando permite la formación de un complejo de señalización que induce la muerte que incluye la proteína del dominio de muerte asociada a Fas</p>

	(FADD), caspasa 8 y caspasa 10. El procesamiento autoproteolítico de las caspasas en el complejo desencadena una cascada de caspasas, y conduce a la apoptosis. También se ha demostrado que este receptor activa NF-kappaB, MAPK3 / ERK1 y MAPK8 / JNK y se encuentra que está implicado en la transducción de las señales de proliferación en fibroblastos y células T diploides normales.
GAA	(<i>Glucosidase alpha acid</i>). Este gen codifica la alfa-glucosidasa lisosómica, que es esencial para la degradación del glucógeno a la glucosa en los lisosomas. Los defectos en este gen son la causa de la enfermedad de almacenamiento de glucógeno II, también conocida como enfermedad de Pompe, que es un trastorno autosómico recesivo con un amplio espectro clínico.
GABARA P	(<i>GABA type A receptor-associated protein</i>). Los receptores del ácido gamma-aminobutírico tipo A [receptores GABA (A)] son canales de cloruro ligados por el ligando que median la neurotransmisión inhibitoria. Esta proteína agrupa receptores de neurotransmisores mediando la interacción con el citoesqueleto.
GABARA PL1	(<i>GABA type A receptor associated protein like 1</i>). Modificador de tipo ubiquitina que aumenta la expresión de la superficie celular del receptor opiáceo de tipo kappa a través de la facilitación del tráfico intracelular anterógrado del receptor. Participa en la formación de vacuolas autofagosómicas. Mientras que LC3s están involucrados en el alargamiento de la membrana del fagóforo, la subfamilia GABARAP / GATE-16 es esencial para una etapa posterior en la maduración de los autofagosomas.
GABARA PL2	(<i>GABA type A receptor associated protein like 2</i>). Modificador de tipo ubiquitina implicado en el tráfico intra-Golgi. Modula el transporte intra-Golgi a través del acoplamiento entre la actividad de NSF y la activación de SNARE. Juega un papel en mitofagia que contribuye a regular la cantidad y calidad mitocondrial eliminando la mitocondria a un nivel basal para satisfacer las necesidades de energía celular y prevenir la producción de ROS en exceso. Mientras que las proteínas LC3 están involucrados en el alargamiento de la membrana del fagóforo, la subfamilia GABARAP / GATE-16 es esencial para una etapa posterior en la maduración de los autofagosomas.
GUSB	(Glucuronidase beta) Glucuronidasa beta. Este gen codifica una hidrolasa que degrada glicosaminoglicanos, incluyendo sulfato de heparán, sulfato de dermatán y sulfato de condroitina-4,6. La enzima forma un homotetramero que se localiza en el lisosoma.
HDAC1	(<i>Histone deacetylase 1</i>) Histona desacetilasa 1. Esta enzima pertenece a la familia de la histona desacetilasa / acua / apha y es un componente del complejo de histona desacetilasa. También interactúa con la proteína supresora de tumores de retinoblastoma y este complejo es un elemento clave en el control de la proliferación y diferenciación celular. Junto con la

	proteína 2 asociada a la metástasis, desacetila p53 y modula su efecto sobre el crecimiento celular y la apoptosis.
HDAC6	(<i>Histone deacetylase 6</i>) Histona desacetilasa 6. Histones play a critical role in transcriptional regulation, cell cycle progression, and developmental events. La proteína codificada por este gen pertenece a la clase II de la familia histona desacetilasa / acuc / alfa. Contiene una duplicación interna de dos dominios catalíticos que parecen funcionar independientemente entre sí. Esta proteína posee actividad de histona desacetilasa y reprime la transcripción
HGS	(<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>). La proteína codificada por este gen regula la clasificación endosómica y juega un papel crítico en el reciclado y la degradación de los receptores de membrana. La proteína codificada ordena las proteínas de membrana monoubiquitinadas en el cuerpo multivesicular, dirigiéndose a estas proteínas para la degradación dependiente de lisosoma.
HSP90AA1	(<i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1</i>). La proteína codificada por este gen es una chaperona molecular inducible que funciona como un homodímero. Su función el plegamiento adecuado de proteínas diana específicas mediante el uso de una actividad de ATPasa modulada por co-chaperones.
HSPA8	(<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 8</i>). Este gen codifica un miembro de la familia de la proteína choque térmico Hsp70, que contiene miembros tanto inducibles por calor como constitutivamente expresados. Esta proteína pertenece a este último grupo. Actúa como una chaperona, y se une a los polipéptidos nacientes para facilitar el correcto plegamiento. También funciona como una ATPasa en el desmontaje de vesículas recubiertas de clatrina durante el transporte de componentes de membrana a través de la célula.
HTT	(<i>Huntingtin</i>) Huntingtina. El gen huntingtina es ampliamente expresado y es necesario para el desarrollo normal. Se expresa como 2 formas alternativas poliadeniladas que muestran diferente abundancia relativa en diversos tejidos fetales y adultos. El defecto genético que conduce a la enfermedad de Huntington puede no necesariamente eliminar la transcripción, pero puede conferir una nueva propiedad al mRNA o alterar la función de la proteína. Un candidato es la proteína 1 asociada a la huntingtina, altamente expresada en el cerebro, que ha aumentado la afinidad por la proteína huntingtina con repeticiones de poliglutamina expandida.
IFNG	(<i>Interferon gamma</i>) Interferon gamma. Este gen codifica una citoquina soluble que es un miembro de la clase de interferón de tipo II. La proteína codificada es secretada por células tanto del sistema inmune innato como adaptativo. La proteína activa es un homodímero que se une al receptor de interferón gamma que desencadena una respuesta celular a infecciones víricas y microbianas.
IGF1	(<i>Insulin like growth factor 1</i>) Factor de crecimiento I similar a

	<p>insulina. La proteína codificada por este gen es similar a la insulina en función y estructura y es miembro de una familia de proteínas implicadas en la mediación del crecimiento y el desarrollo. La proteína codificada se procesa a partir de un precursor, unido por un receptor específico, y se secreta. Los defectos en este gen son una causa de deficiencia de factor I de crecimiento similar a la insulina.</p>
INS	<p>(<i>Insulin</i>) Insulina. Después de la eliminación del péptido señal precursor, la proinsulina se escinde después de la traducción en tres péptidos: los péptidos de cadena B y cadena A, que están unidos covalentemente a través de dos enlaces disulfuro para formar insulina y péptido C. La unión de insulina al receptor de insulina (INSR) estimula la captación de glucosa.</p>
IRGM	<p>(<i>Immunity related GTPase M</i>). Este gen codifica un miembro de la familia de la GTPasa relacionada con la inmunidad asociada a p47. La proteína codificada puede desempeñar un papel en la respuesta inmune innata mediante la regulación positiva de la autofagia en respuesta a la presencia de patógenos intracelulares. Los polimorfismos que afectan a la expresión normal de este gen están asociados con una susceptibilidad a la enfermedad de Crohn ya la tuberculosis.</p>
LAMP1	<p>(<i>Lysosomal associated membrane protein 1</i>). La proteína codificada por este gen es un miembro de una familia de glicoproteínas de membrana. Esta glicoproteína proporciona selectinas con ligandos de carbohidratos. También puede desempeñar un papel en la metástasis de las células tumorales. Se estima que esta proteína constituye el 50% de las proteínas de la membrana del lisosoma. Endosomas tardíos, lisosomas, así como los fagosomas que carecen de LAMP1 y LAMP2 (una isoforma de LAMP1), han mostrado una capacidad reducida para moverse hacia el centro organizador de microtúbulos, lo que probablemente impide su interacción.</p>
MAP1LC3 A	<p>MAP1LCA y MAP1LCB son microtúbulos asociados a las proteínas que median las interacciones físicas entre los microtúbulos y los componentes del citoesqueleto. MAP1A y MAP1B consisten en una subunidad de cadena pesada y múltiples subunidades de cadena ligera. La proteína codificada por este gen es una de las subunidades de la cadena ligera y puede asociarse con MAP1A o MAP1B. Se han encontrado dos variantes de transcripción que codifican diferentes isoformas para este gen. La expresión de la variante 1 se suprime en muchas líneas celulares tumorales, lo que sugiere que puede estar implicado en la carcinogénesis. Modificador de tipo ubiquitina implicado en la formación de vacuolas autofagosómicas (autofagosomas). Mientras que LC3 están involucrado en el alargamiento de la membrana del fagóforo, la subfamilia GABARAP / GATE-16 es esencial para una etapa posterior en la maduración de los autofagosomas.</p>
MAP1LC3 B	

MAPK14	<p>(<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>). La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia MAP quinasa. MAP quinasa actúan como un punto de integración de múltiples señales bioquímicas, y están involucrados en una amplia variedad de procesos celulares como la proliferación, la diferenciación, la regulación de la transcripción y el desarrollo. Esta quinasa es activada por varias tensiones ambientales y citoquinas pro-inflamatorias.</p> <p>La activación requiere su fosforilación por MAP quinasa quinasa (MKK), o su autofosforilación desencadenada por la interacción de la proteína MAP3K7IP1 / TAB1 con esta quinasa. Los sustratos de esta quinasa incluyen el regulador de transcripción ATF2, MEF2C y MAX, el regulador del ciclo celular CDC25B y el supresor tumoral p53, que sugieren los papeles de esta quinasa en la transcripción relacionada con el estrés y la regulación del ciclo celular, así como en la respuesta al estrés genotóxico.</p>
MAPK8	<p><i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>. Esta quinasa es activada por diversos estímulos celulares y se dirige a factores de transcripción específicos, y por lo tanto media la expresión de genes inmediata-temprana en respuesta a estímulos celulares. Se ha encontrado que la activación de esta quinasa por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) es necesaria para la apoptosis inducida por TNF-alfa.</p> <p>Esta quinasa también está implicada en la apoptosis inducida por la radiación UV, que se piensa que está relacionada con la vía de muerte celular mediada por citocromo c. Estudios de la contraparte de ratón de este gen sugiere que esta quinasa desempeñar un papel clave en la proliferación de células T, apoptosis y diferenciación.</p>
mTOR	<p>(<i>Mammalian target of rapamycin</i>). La proteína codificada por este gen pertenece a una familia de quinasa relacionadas con fosfatidilinositol quinasa. Estas quinasa median respuestas celulares a tensiones tales como daño al ADN y privación de nutrientes. Esta proteína actúa como el objetivo de la detención del ciclo celular y los efectos inmunosupresores del complejo FKBP12-rapamicina. Está relacionado con la síntesis de proteínas. Entre sus funciones cabe destacar que constituye el regulador negativo más importante de la autofagia.</p>
NFKB1	<p>(<i>Nuclear factor kappa B subunit 1</i>). Este gen codifica una proteína de 105 kD es un inhibidor de la transcripción específico de proteína Rel y la proteína de 50 kD es una subunidad de unión al ADN del complejo de proteína NF-kappa-B (NFKB). NFKB es un regulador de la transcripción que es activado por varios estímulos intra y extra-celulares tales como citoquinas, radicales libres de oxidantes, irradiación ultravioleta y productos bacterianos o virales. El NFKB activado se transloca en el núcleo y estimula la expresión de genes implicados en una amplia variedad de funciones biológicas. La activación inadecuada de NFKB se ha asociado con una serie de enfermedades inflamatorias, mientras que la inhibición</p>

	persistente de NFκB conduce a un desarrollo inapropiado de células inmunes o crecimiento celular retardado.
NPC1	<i>(NPC intracellular cholesterol transporter 1)</i> . Este gen codifica una proteína grande que reside en la membrana limitante de endosomas y lisosomas y media el tráfico de colesterol intracelular a través de la unión del colesterol a su dominio N-terminal. Esta proteína transporta las lipoproteínas de baja densidad a los compartimentos endosómicos / lisosómicos tardíos donde se hidrolizan y liberan como colesterol libre. Los defectos en este gen causan la enfermedad de tipo C de Niemann-Pick, un trastorno neurodegenerativo autosómico recesivo raro caracterizado por una acumulación excesiva de colesterol y glucosfingolípidos en compartimentos endosomales / lisosómicos tardíos.
PIK3C3	<i>(Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3)</i> . Subunidad catalítica del complejo PI3K que media la formación de fosfatidilinositol 3-fosfato; Se cree que diferentes formas complejas juegan un papel en múltiples vías de tráfico de membrana: PI3KC3-C1 participa en la iniciación de los autofagosomas y PI3KC3-C2 en la maduración de autofagosomas. Además, participa en la regulación del tráfico endocítico degradativo y citocinesis, probablemente en el contexto de PI3KC3-C2.
PIK3CG	<i>(Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma)</i> . (PI3K) que fosforila fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato(PIP2) para generar fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3). El PIP3 juega un papel clave al reclutar proteínas que contienen dominio de PH a la membrana, incluyendo AKT1 y PDK1, activando cascadas de señalización implicadas en el crecimiento celular, supervivencia, proliferación, motilidad y morfología. Enlaza la activación del receptor acoplado a la proteína G a la producción de PIP3. Involucrados en respuestas inmunes, inflamatorias y alérgicas. Modula la quimiotaxis leucocitaria a los sitios inflamatorios y en respuesta a los agentes quimio-atrayentes. Puede controlar la polarización y migración de los leucocitos regulando la acumulación espacial de PIP3 y regulando la organización de la formación de actina F y la adhesión basada en integrina en el borde de ataque
PIK3R4	<i>(Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4)</i> . Subunidad reguladora del complejo PI3K que media la formación de fosfatidilinositol 3-fosfato.
PTEN	<i>(Phosphatase and tensin homolog)</i> . Este gen se identificó como un supresor de tumores que está mutado en un gran número de cánceres a alta frecuencia. Regula negativamente los niveles intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato en las células y funciona como un supresor de tumores mediante la regulación negativa de la vía de señalización AKT / PKB.
RAB24	<i>(Ras-related protein Rab-24)</i> , member RAS oncogene family. RAB24 es una pequeña GTPasa de la subfamilia Rab de

	<p>proteínas relacionadas con Ras que regulan el tráfico intracelular de proteínas. RAB24 desempeña un papel en la maduración y / o eliminación de los compartimentos autofágicos en condiciones ricas en nutrientes, pero no durante periodos cortos de falta de aminoácidos.</p>
RB1	<p>(<i>Retinoblastoma associated protein</i>). Regulador clave de la entrada en la división celular que actúa como un supresor de tumores. Promueve la transición G0-G1 cuando se fosforila por CDK3 / ciclina-C. Actúa como un represor de la transcripción de los genes diana E2F1. La forma activa sub-fosforilada de RB1 interactúa con E2F1 y reprime su actividad de transcripción, dando lugar a la detención del ciclo celular. Participa directamente en la formación de la heterocromatina manteniendo la estructura global de la cromatina y, en particular, la heterocromatina constitutiva mediante la estabilización de la metilación de las histonas.</p>
RGS19	<p>(<i>Regulator of G-protein signaling 19. G</i>) Esta proteína una variedad de procesos celulares. La proteína codificada por este gen pertenece a la familia RGS (reguladores de la señalización de la proteína G) y específicamente interactúa con la proteína G, GAI3.</p>
RPLP0	<p>(<i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>). Este gen codifica una proteína ribosomal que es un componente de la subunidad 60S. La proteína P0 puede interactuar con P1 y P2 para formar un complejo pentamérico que consiste en dímeros P1 y P2 y un monómero P0. La proteína se encuentra en el citoplasma.</p>
RPS6KB1	<p>(<i>Ribosomal protein S6 kinase B1</i>). Este gen codifica un miembro de la familia ribosomal S6 kinase de serina / treonina quinasa. La proteína codificada responde a la señalización de mTOR para promover la síntesis de proteínas, el crecimiento celular y la proliferación celular. La actividad de este gen se ha asociado con cáncer humano</p>
SNCA	<p>(<i>Synuclein alpha</i>). La alfa-sinucleína es un miembro de la familia de las sinucleínas, que también incluye la beta-y gamma-sinucleína. Las sinucleínas se expresan abundantemente en el cerebro y la alfa y la beta-sinucleína inhiben selectivamente la fosfolipasa D2. SNCA puede servir para integrar la señalización presináptica y el tráfico de membranas. Los defectos en SNCA han sido implicados en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. SNCA péptidos son un componente importante de las placas de amiloide en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer.</p>
SQSTM1	<p><i>Sequestosome 1</i>. Esta proteína es un receptor de autofagia que interactúa directamente con la carga a ser degradado y un modificador de autofagia de la familia MAP1 LC3. Se requiere tanto para la formación como para la degradación autofágica de los cuerpos que contienen poliubiquitina, llamados ALIS (estructuras inducidas de tipo <i>aggresome</i>). Puede regular la activación de NFkB1 por TNF-alfa, factor de crecimiento nervioso (NGF) e IL-1. También regula cascadas de señalización a través de la ubiquitinación. Es un adaptador que media la interacción entre TRAF6 y CYLD. Pueden participar</p>

	en la diferenciación celular, apoptosis, respuesta inmune y regulación de los canales K (+).
TGFB1	<p>(<i>Transforming growth factor beta 1</i>). Este gen codifica un ligando secretado de la superfamilia TGF-beta (factor de crecimiento transformante-beta) de proteínas. Los ligandos de esta familia se unen a diversos receptores de TGF-beta que conducen al reclutamiento y activación de factores de transcripción de la familia SMAD que regulan la expresión génica. El péptido maduro también puede formar heterodímeros con otros miembros de la familia TGFB.</p> <p>Esta proteína codificada regula la proliferación, diferenciación y crecimiento celular, y puede modular la expresión y la activación de otros factores de crecimiento incluyendo interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa. Este gen es con frecuencia <i>incrementada</i> en células tumorales, y mutaciones en este gen resultado en la enfermedad de Camurati-Engelmann.</p>
TGM2	<p>(<i>Transglutaminase 2</i>) Transglutaminasa 2. La proteína codificada por este gen actúa como monómero, es inducida por el ácido retinoico, y parece estar implicada en la apoptosis. Finalmente, la proteína codificada es el autoantígeno implicado en la enfermedad celíaca.</p>
TMEM74	<p>(<i>Transmembrane protein 74</i>). Es una nueva molécula relacionada con la autofagia. El análisis de localización subcelular mostró TMEM74 localizada en el lisosoma y el autofagosoma. Por otra parte, <i>knockdown</i> de TMEM74 por pequeño ARN de interferencia abolió las características autofágicas inducidas por la inanición. Estos hallazgos demuestran que TMEM74 puede estar involucrado en la promoción de la autofagia funcional durante el ayuno celular y otras condiciones de estrés.</p>
TNF	<p>(<i>Tumor necrosis factor</i>). Este gen codifica una citoquina proinflamatoria multifuncional que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF). Esta citoquina es secretada principalmente por los macrófagos. Puede unirse a, y por lo tanto funciona a través de sus receptores TNFRSF1A / TNFR1 y TNFRSF1B / TNFR2. Esta citoquina está implicada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos que incluyen proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y coagulación. Esta citoquina ha estado implicada en una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes, resistencia a la insulina y cáncer.</p>
TNFSF10	<p>(<i>Tumor necrosis factor superfamily member 10</i>). La proteína codificada por este gen es una citoquina que pertenece a la familia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF). Esta proteína induce preferentemente la apoptosis en células transformadas y tumorales, pero no parece matar células normales, aunque se expresa a un nivel significativo en la mayoría de los tejidos normales.</p> <p>Esta proteína se une a varios miembros de la superfamilia del</p>

	receptor de TNF incluyendo TNFRSF10A / TRAILR1, TNFRSF10B / TRAILR2, TNFRSF10C / TRAILR3, TNFRSF10D / TRAILR4 y posiblemente también a TNFRSF11B / OPG. La actividad de esta proteína puede ser modulada por unión a los receptores de señuelo TNFRSF10C / TRAILR3, TNFRSF10D / TRAILR4 y TNFRSF11B / OPG que no pueden inducir apoptosis. Se ha demostrado que la unión de esta proteína a sus receptores desencadena la activación de MAPK8 / JNK, caspasa 8 y caspasa 3.
TP53	(<i>Tumor protein p53</i>). Este gen codifica una proteína supresora de tumores que contiene dominios de activación transcripcional, unión al ADN y oligomerización. La proteína codificada responde a diversos tipos de estrés celular para regular la expresión de los genes diana, induciendo así la detención del ciclo celular, la apoptosis, la senescencia, la reparación del ADN o los cambios en el metabolismo. Las mutaciones en este gen están asociadas con una variedad de cánceres humanos, incluyendo cánceres hereditarios tales como el síndrome de Li-Fraumeni.
ULK1	(<i>Unc-51 like autophagy activating kinase 1</i>). Es una serina/treonina kinasa implicada en la activación de la autofagia ante señales de estrés como el ayuno celular. La autofagia está regulada positivamente por un complejo formado por 4 proteínas que incluyen ULK1 que actúa <i>up stream</i> de PIK3C3 para regular la formación de los fagóforos, las estructuras precursoras de los autofagosomas.
ULK2	(<i>Unc-51 like autophagy activating kinase 2</i>). Este gen codifica una isoforma de ULK1. Es una serina/treonina kinasa involucrada también en la activación de la autofagia ante señales de estrés como el ayuno celular.
UVRAG	(<i>UV radiation resistance associated</i>). Este gen complementa la sensibilidad ultravioleta de las células del grupo C del xeroderma pigmentoso y codifica una proteína con un dominio C2. La proteína codificada activa el complejo Beclin1-PI (3) KC3, promoviendo la autofagia y suprimiendo la proliferación y tumorigenicidad de las células humanas de cáncer de colon.
WIPI1	(<i>WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1</i>). Este gen codifica una proteína de repetición WD40. Los miembros de la familia de repetición WD40 son componentes clave de muchas funciones biológicas esenciales. Regulan el ensamblaje de complejos multiprotéicos presentando una plataforma de hélice beta para interacciones proteína-proteína simultáneas y reversibles. Juega un papel importante en la autofagia y en particular en la autofagia mediada por el hambre y el calcio, así como en la mitofagia. Actúa <i>up stream</i> del complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 y LC3, y aguas abajo de los complejos ULK1 y PI3-quinasa.