

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE
CELULAR INDUCIDA POR COBRE”**

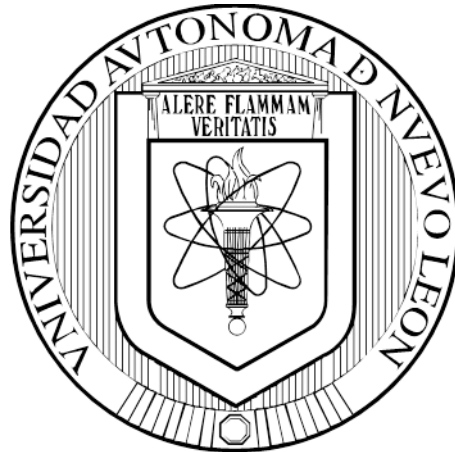
POR

JUAN ANTONIO CASTILLO GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MORFOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“EVALUACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE
CELULAR INDUCIDA POR COBRE”**

POR

M.C. JUAN ANTONIO CASTILLO GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MORFOLOGÍA**

NOVIEMBRE, 2016

**“EVALUACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA
POR COBRE”**

Aprobación de la tesis:

**Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Directora de Tesis**

**Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha
Co-Director De Tesis**

**Dra. C. Aracely García García
Comisión De Tesis**

**Dr. C. Roberto Montes De Oca Luna
Comisión De Tesis**

**Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Comisión De Tesis**

**Dra. Med. Raquel Garza Guajardo
Subdirectora De Estudios De Posgrado**

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE, 2016

**“EVALUACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA
POR COBRE”**

Presentado por

M.C. Juan Antonio Castillo González

Este trabajo se realizó en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. María de Jesús Loera Arias y la co-dirección del Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha.

FIRMAS

Dra. C. María De Jesús Loera Arias
Directora de Tesis

Dr. C. Humberto Rodríguez Rocha
Co-director de Tesis

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE, 2016

RESUMEN

M.C Juan Antonio Castillo González.
Universidad de Nuevo León
Facultad de Medicina.

Fecha de titulación: Noviembre 2016

Título del estudio: "EVALUACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR COBRE"

Páginas en el estudio: 79

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología

Área de estudio: Morfología

Propósito y método de estudio:

Se sabe que el cobre cumple en nuestro organismo la función de ser cofactor de varias enzimas que participan en una amplia gama de procesos de gran relevancia fisiológica. Cuando su homeostasis esta desregulada induce patologías tales como la Enfermedad de Menkes y Wilson, aunque también está relacionado con otras como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades priónicas, etc. Ante situaciones de estrés la célula lleva a cabo un proceso catabólico denominado macro autofagia (comúnmente denominado autofagia) para contrarrestar cualquier insulto celular; sin embargo, esta reportado que si este proceso se encuentra saturado y/o inhibido puede conducir a la muerte celular. El objetivo de este trabajo fue definir el papel de la autofagia en la sobrevivencia y/o muerte celular inducida por cobre. Para ello se procedió a cultivar células HEK-293 a las cuales se les incubó con diferentes concentraciones de Cu^{2+} para determinar el incremento de la conversión del marcador de autofagia LC3-I a LC3-II. En paralelo, se determinó el efecto del Cu^{2+} sobre la viabilidad celular mediante las técnicas de azul tripano y calceína; así como también un Western Blot para corroborar si el cobre induce autofagia (por medio del uso de hidroxiclороquina). Además, se analizó la inducción de autofagia en células expuestas a otros metales como Zn^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{3+} . Por último, se realizó microscopia electrónica de transmisión a células expuesta a Cu^{2+} y Zn^{2+} para determinar la presencia de autofagosomas.

Conclusiones y contribuciones:

Se determinó que conforme se incrementa la concentración de Cu^{2+} se incrementa la señal del marcador de autofagia LC3-II, así como una disminución en la viabilidad celular de células HEK-293. Del resto de los metales analizados, únicamente el Zn^{2+} fue capaz de inducir autofagia y se comprobó la formación de autofagosomas en células HEK-293 expuestas a cobre o zinc. A manera de conclusión, se determinó que el cobre induce la muerte celular y la autofagia de manera dosis-dependiente en la línea celular HEK-293.

Dra. María de Jesús Loera Arias
Director de Tesis

ABSTRACT

Copper fulfills in our organism the function of being cofactor of several enzymes that participate in a wide range of processes of great physiological relevance. When its homeostasis is dysregulated induces pathologies such as Menkes Disease and Wilson, although it is also related to others such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, prion diseases, etc. In situations of stress the cell carries out a catabolic process called macro autophagy (commonly called autophagy) to counteract any cellular insult; however, it is reported that if this process is saturated and/or inhibited it can lead to cell death. The aim of this study was to define the role of autophagy in copper-induced survival and/or cell death. For this purpose, HEK-293 cells were cultured and incubated with different concentrations of Cu^{2+} to determine the increase in the conversion of the autophagy marker LC3-I to LC3-II. In parallel, the effect of Cu^{2+} on cell viability was determined by trypan blue and calcein techniques; as well as a Western Blot to corroborate whether copper induces autophagy (through the use of hydroxychloroquine). In addition, the autophagy induction was analyzed in cells exposed to other metals such as Zn^{2+} , Mn^{2+} and Fe^{3+} . Finally, transmission electron microscopy was performed on cells exposed to Cu^{2+} and Zn^{2+} to determine the presence of autophagosomes.

It was determined that as the concentration of Cu^{2+} increases the signal of the autophagy marker LC3-II, as well as a decrease in cell viability of HEK-293 cells. Of the rest of the analyzed metals, only Zn^{2+} was able to induce autophagy and autophagosomes were detected in HEK-293 cells exposed to copper or zinc. As conclusion, copper was determined to induce cell death and autophagy in a dose-dependent manner in the HEK-293 cell line.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi comisión de tesis sobre todo a la Dra. María de Jesús Loera Arias, así como al Dr. Roberto Montes de Oca Luna y a cada una de las personas que me apoyaron de manera directa e indirecta durante todo el doctorado. Aprecio mucho sus consejos, recomendaciones, comentarios y momentos que me compartieron.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi doctorado.

Agradezco de manera especial a mis padres y hermano, personas especiales para mí y amigos que me apoyaron a lo largo de estos años.

CONTENIDO TEMÁTICO

Capítulo	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Metales de importancia biológica	1
1.2. Cobre y su relevancia biológica	4
1.3. Absorción y homeostasis del cobre	7
1.4. Patologías ligadas al exceso / deficiencia de cobre	10
1.5. Macro autofagia (autofagia)	16
1.6. Mecanismos moleculares de la autofagia	20
1.7. Autofagia selectiva	22
1.8. Relación entre cobre autofagia	25
1.9. Modelo celular HEK-293	26
II. JUSTIFICACIÓN E HIPOTESIS	30
2.1. Justificación	30
2.2. Hipótesis	30
III. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo general	31

3.2. Objetivos específicos	31
IV. ESTRATEGIA GENERAL	32
V. MATERIALES	33
5.1. Material biológico	33
5.2. Material para cultivo celular	33
5.3. Reactivos	34
5.3.1. Reactivos para cultivo celular	34
5.3.2. Reactivos para tratamientos con metales y análisis de la autofagia	34
5.3.3. Reactivos para geles de acrilamida	35
5.3.4. Reactivos para Western Blot	35
5.3.5. Anticuerpos para Western Blot	36
5.4. Equipos	36
5.4.1. Equipos generales	36
5.4.2. Equipo para cultivo celular	37
5.4.3. Equipo para Western Blot	37
5.4.4. Equipo para Microscopia Electrónica de Transmisión	38
VI. MÉTODOS	39
6.1. Cultivo celular de células HEK-293	39

6.2. Ensayos de viabilidad celular por ensayo de calceína	39
6.3. Ensayos de viabilidad celular por azul de tripano	40
6.4. Cuantificación de proteína total	41
6.5. Western Blot para la detección del marcador de autofagia LC3-II	41
6.6. Microscopía electrónica (MET) para la observación de autofagosomas	42
6.7. Inhibición del flujo de la vía de la autofagia	43
6.8. Estadística	43
VII. RESULTADOS	44
7.1. El cobre disminuye de manera dosis dependiente la viabilidad celular	44
7.2. El cobre induce autofagia en la línea celular HEK-293	46
7.3. El Zn induce autofagia en la línea celular HEK-293	49
7.4. El cobre y el zinc induce la formación de autofagosomas en la línea celular HEK-293	52
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. CONCLUSIÓN	65
X. REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Tabla periódica de los elementos	2
2	Absorción, transporte y homeostasis del cobre	7
3	Enfermedad de Menkes	11
4	Enfermedad de Wilson	13
5	Autofagia	17
6	Mecanismo de autofagia	22
7	Ensayo de viabilidad celular por medio con calceína	45
8	Ensayo de viabilidad celular por azul de tripano en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de CuSO ₄ , durante 24 horas	46
9	Activación de la autofagia por cobre	47
10	Detección de LC3-II en células tratadas con CQ.	49
11	Análisis de la inducción de la autofagia en células tratadas con Zn ²⁺	50
12	Análisis de la inducción de la autofagia en células tratadas con Fe ³⁺ .	51
13	Análisis de la inducción de la autofagia en células tratadas con Mn ²⁺	51
14	Inducción de la formación de autofagosomas por Cu ²⁺ y Zn ²⁺	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Metales de importancia biológica y sus principales funciones metabólicas	3
2	Componentes que se unen al cobre en el plasma sanguíneo	5
3	Enzimas humanas que requieren cobre como cofactor	6

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
μl	Microlitros
μM	Micromolar
AMPK	Adenosin-5-monofosfato proteína quinasa activada
ATG	Genes relacionados a la autofagia
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATTC	American Type Culture Collection
AV	Vacuolas autofagicas
BCA	Ácido bicinconínico
Bcl-2	Proteína de linfoma de células B-2
b-FGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
BID	Dominio BH3 interactivo antagonista de muerte
BNIP3	Proteína interactiva E1B 19Kda de BCL2/Adenovirus
Co	Cobalto
CO₂	Dióxido de carbono.
COMMD1	Dominio contenido del metabolismo de cobre 1
CQ	Hidroxicloroquina
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Cu⁺	Ión cúprico
Cu²⁺	Ión cuproso
Cu-DA	Complejos cobre-dopamina
CuSO₄	Sulfato de Cobre
DMEM	Medio basal de Eagle modificado de Dulbecco.
DMT1	Proteína de transporte de metal di catión
E1	Proteína temprana del gen 1 de adenovirus
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eIF2α	Factor iniciativo eucariótico 2α
ERAD	Sistema de degradación por proteosoma relacionada con degradación asociada a ER
F	Flúor
FeCl₃	Cloruro de Fierro

FOXO3	Factores de transcripción FOXO3
Fpn1	Transportador de hierro ferroportina-1
GRX1	Glutaredoxina
hCTR1	Proteína humana transportadora de cobre 1
HEK-293	Línea celular proveniente de células de riñón fetal línea celular 293
HIF	Factor inducible por hipoxia
I	Yodo
IL-1,6	Interleucina 1, 6
Ire-1	Proteínas asociadas a membranas de ER
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
LC3-I /II	Proteína 1/2 asociada al microtúbulo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LMP	Permeabilización de la membrana lisosomal
MAF1	Represor de la transcripción de RNA polimerasa III homólogo de MAF1
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
Mn	Manganeso
MNK	Proteína de Menkes
MnSO₄	Sulfato de Manganeso
Mo	Molibdeno
MT3	Metaloteína 3
mTOR	Blanco de la rampamicina en mamíferos
NaCl	Cloruro de Sodio
NADH	Di nucleótido de adenina
NBR1	Proteína cercana al gen BCR 1
NF-κβ	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NP-40	Nonil Fenoxypoliethoxyletanol
NRF2	Factor nuclear derivado eritroide-2
P38 MAPK	p38 proteína quinasa activada por mitogenos MAPK
P62/SQSTM1	Nucleoporina 62/ sequestroma 1
p70 S6K	Proteína quinasa S6 ribosomal p70
PAX2	Factor pareado del box gene 2
PBS	Buffer de Fosfato Salinos.
PI3/Akt	Fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa clase III

PKC	Proteína quinasa C
PrP	Proteína Priónica
PrPsc	Enfermedad de Scrapie
PSG4	Proteína beta 1 glicoproteína específica de embarazo 4
Redox	Reacciones de óxido-reducción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Se	Selenio
SOD	Superóxido dismutasa
TBS-T	Buffer Tris Salino con Tween 20
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
TORC1	Coactivador transcripcional regulado por CREB-1
Tsc1 / Tsc2	Proteínas de esclerosis tuberosa 1/ 2
ULK	Quinasas tipo Unc-51
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
UPS	Sistema Ubiquitina-Proteosoma
UVRAG	Proteína génica asociada a la resistencia a la radiación ultravioleta
V	Vanadio
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
Zn	Zinc
ZnSO₄	Sulfato de Zinc

Capítulo I.

INTRODUCCIÓN

1.1. Metales de importancia biológica

El 96% de la materia viva del planeta se encuentra compuesta por 4 elementos químicos: oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno. Se reconoce que 50 elementos de la tabla periódica se encuentran en los organismos vivos, identificándose, tanto en humanos como en mamíferos, a 23 elementos que poseen actividad fisiológica, de los cuales 11 han sido clasificados como elementos traza (ET) y/u oligoelementos **Figura 1** (Fraga, 2005; Frieden, 1972; Kienlen, 1976), cuatro de estos elementos se encuentran en el período 4 de la tabla periódica, por lo que poseen una relación favorable entre tamaño de núcleo/accesibilidad de electrones, otorgándoles la capacidad de interactuar con moléculas orgánicas presentes en los organismos vivos (Fraga, 2005; Frieden, 1985).

Entre los oligoelementos se encuentran metales de transición como: Vanadio (V), Cromo (Cr), Manganeso (Mn), Hierro (Fe), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Zinc (Zn) y Molibdeno (Mo) y elementos no metálicos como el Selenio (Se), Yodo (I) y Flúor (F), los cuales son requeridos en la dieta en cantidades muy pequeñas de alrededor de menos de 100mg/día (Fraga, 2005; Frieden, 1974).

1A		2A																				3A					4A					5A					6A					7A					0
1	H																																									2					
3	Li																					5					6					7					8					9					10
6.941	9.0122																					10.811					12.01115					14.0067					15.9994					18.9984					20.179
11	Na																					13					14					15					16					17					18
22.9898	24.305																					26.9815					28.086					30.9738					32.064					35.453					39.948
19	K																					31					32					33					34					35					36
39.098	40.08																					69.72					72.59					74.9216					78.95					79.904					83.80
37	Rb																					49					50					51					52					53					54
85.47	87.62																					114.82					118.69					121.75					127.60					129.9045					131.30
55	Cs																					81					82					83					84					85					86
132.905	137.53																					204.37					207.19					208.980					(210)					(210)					(222)
87	Fr																																														
(223)	226.0254																																														
89	Ac																																														
(227)	(257)																																														
104	Rf																																														
105	Ha																																														
106																																															
107																																															
108																																															
109																																															

Figura 1. Tabla periódica de los elementos. Se señalan los iones importantes en amarillo, en rojo los elementos que componen el 96% de la materia viva, en azul los elementos que son cofactores y en negro elementos que resultan tóxicos (Fraga, 2005)

Los metales encontrados en los oligoelementos se encuentran unidos a proteínas u otras moléculas pequeñas tales como fosfatos, fitatos, polifenoles y otros compuestos quelantes (Shi et al., 2005). Dentro de las proteínas, en la categoría de las enzimas, los metales cumplen con tres funciones: la primera es que forman parte de los sitios activos de las enzimas, la segunda es que se encargan de estabilizar las estructuras tanto terciarias como cuaternarias de las proteínas, y la tercera es la asociación con los sustratos, para formar complejos de unión débiles, contribuyendo así a la orientación del sustrato para llevar a cabo la reacción correspondiente o estabilizar los estados de carga de transición (Fraga, 2005; Nielsen, 1990). Una vez que forman parte de los constituyentes de los sitios activos, los metales que poseen electrones no apareados, llevan a cabo la

mediación de los procesos de óxido-reducción (redox) por medio de cambios reversibles en sus estados de oxidación, facilitando la transferencia o recepción de electrones de o desde el substrato y/o el cofactor (Fraga, 2005; Stohs and Bagchi, 1995). En la **Tabla 1** se resumen las funciones principales de los 4 metales más relevantes a nivel fisiológico (Cu, Zn, Mn y Fe).

Metal	Función biológica
Cu (Fraga, 2005; Linder and Hazegh-Azam, 1996)	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de tejido conectivo, recubrimiento de nervios y hueso. • Reductante en las enzimas superóxido dismutasa, citocromo oxidasa, lisil oxidasa y dopamina hidroxilasa.
Zn (Tapiero and Tew, 2003)	<ul style="list-style-type: none"> • Relacionado con la actividad de alrededor de 300 enzimas (RNA polimerasa, anhidrasa carbónica • Presente en los dedos de zinc en el DNA
Mn (Davis and Greger, 1992; Rabin et al., 1993)	<ul style="list-style-type: none"> • Relacionado con el desarrollo óseo • Metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos • Forma parte de las enzimas Mn superóxido dismutasa, glutamina sintasa, arginasa, así como en varias hidrolasas, transferasas y carboxilasas.
Fe (Chanarin, 1999)	<ul style="list-style-type: none"> • Este metal se encuentra en 4 clases de proteínas: • Fe-Hemo (mioglobina, catalasa, citocromo). • Fe-sulfuro (aconitasa, fumarato reductasa). • Proteínas de transporte y almacén de hierro (hemosiderina, lactoferrina, ferritina). • Otras (dinucleótido de adenina deshidrogenasa (NADH), succinato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa).

Tabla 1. Metales de importancia biológica y sus principales funciones metabólicas.

1.2. Cobre y su relevancia biológica

El cobre es un elemento traza de gran relevancia para los seres vivos, tanto en su forma oxidada Cu^{2+} , como en su forma reducida Cu^+ (Linder and Goode, 1991), debido a que interviene en la fosforilación oxidativa mitocondrial, la desintoxicación de radicales libres, la síntesis y desnaturalización de neurotransmisores, la formación de pigmentos, la síntesis de tejido conectivo y el metabolismo del hierro (Madsen and Gitlin, 2007; Peña et al., 1999).

Se calcula que la concentración de cobre en un ser humano adulto (con un peso promedio de 70 kilogramos) es de alrededor de 100 mg, distribuidos la mayor parte en el esqueleto, medula ósea (46 mg), músculo esquelético (26 mg), hígado (10 mg), cerebro (8mg) y sangre (6mg) (Linder and Goode, 1991), de los cuales se calcula que la concentración de cobre libre en el tejido sanguíneo es de entre 10^{-18} a 10^{-13} M, mientras que el cobre restante se encuentra unido a diferentes componentes del plasma sanguíneo, tal como se muestra en la **Tabla 2** (Linder and Goode, 1991; Scott and Turnlund, 1994; Tapiero et al., 2003; Turnlund et al., 1989).

Componente	µg/l	µM	%
Ceruplasmina	650-700	10-11	65-70
Albumina	120-180	2-3	12-18
Transcupreína	90	1.4	9
Ferroxidasa II	10	0.16	1
Superóxido dismutasa (SOD) extracelular y glicoproteína rica en histidina	<10	< 0.16	<1
Factores de coagulación V y VII	< ¿5? *	< 0.08	< ¿0.5? *
Metalotioneína y amino oxidasa	< ¿1? *	< 0.02	< ¿0.1? *
Componentes de 15-60 kDA	40	0.63	4
Péptidos pequeños y aminoácidos	35	0.55	4

Tabla.2. Componentes que se unen al cobre en el plasma sanguíneo (Tapiero et al., 2003).
*Posibles concentraciones

La mayoría de los átomos de este metal están involucrados como cofactores de diversas enzimas como las mostradas en la **Tabla 3** (Tapiero et al., 2003). Simultáneamente, este metal interviene en otros procesos no enzimáticos como lo son la angiogénesis, mielinización de nervios y la actividad de endorfinas (Lane et al., 1994); así como también presenta un papel relevante en el desarrollo cerebral, reproducción, expresión génica, desarrollo y crecimiento sano (Kodama and Fujisawa, 2009; Kodama et al., 1999).

Enzima	Función
Citocromo c- oxidasa	Transporte de electrones dentro de la mitocondria
Cu/Zn SOD	Desintoxicación de radicales libres
Metalotioneínas	Almacenaje de exceso de Cu y otros metales divalentes (excepto Fe ²⁺) Posible donador de cobre a ciertas apoproteínas
Ceruplasmina (extracelular)	Ferroxidasa encargada de promover el flujo de hierro desde el hígado hasta los scavengers sanguíneos de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) Transporte de cobre
Proteína-lisina-6-oxidasa	Entre cruzamiento de colágeno y elastina
Tirosinasa (catecol oxidasa)	Formación de melanina
Dopamina-β-monooxigenasa	Producción de catecolaminas
Enzima α-amidasa	Maduración de péptidos hipotalámicos
Diamina oxidasa	¿Inactivación de histamina y poliaminias? (Celulares y extracelulares)
Amina oxidasa (extracelular)	¿Inactivación de histamina, tiramina, dopamina y serotonina?
Peptidil glicina monooxigenasa	Activación de péptidos hormonales
Hefaestina	Ferroxidasa localizada en la red trans Golgi de los enterocitos, apoya en la absorción de hierro Homologa a la ceruplasmina
CMGP	Ferroxidasa / amina oxidasa, homologa a la ceruplasmina (Condrocitos y epitelio ciliar ocular)
Proteína precursora de β-amiloide	Se desconoce su función normal
Proteína Priónica (PrP)	Posible actividad similar a SOD debido a su unión a cobre. Puede regresar el cobre a las neuronas en su sinapsis
S-Adenosil L-homocisteína	Hidrolasa metabólica para aminoácidos con sulfuro
Angiogenina	Formación de vasos sanguíneos
Factores de coagulación V y VII	Coagulación sanguínea

Tabla 3. Enzimas humanas que requieren cobre como cofactor (Tapiero et al., 2003).

1.3. Absorción y homeostasis del cobre

El cobre es absorbido por el estómago y el intestino delgado, principalmente en la región del íleon como se muestra en la **Figura 2** (Turnlund et al., 1989). Sin embargo, el tracto gastrointestinal recibe alrededor de 1 mg de cobre al día proveniente de la dieta y alrededor de 4.5 mg/día a través de la saliva, bilis, jugos gástricos y células en apoptosis de la mucosa gastrointestinal (Wapnir, 1998).

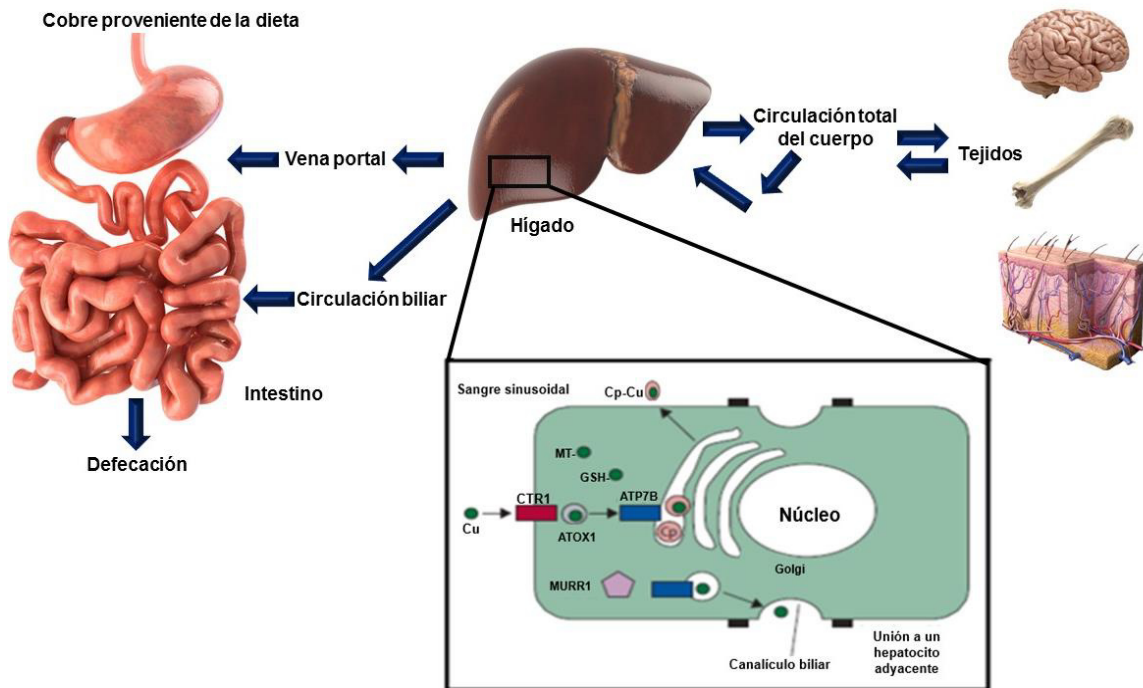


Figura 2. Absorción, transporte y homeostasis del cobre. En esta figura se esquematiza el proceso desde la absorción del cobre hasta su distribución a distintos órganos (Behari and Pardasani, 2010).

A nivel celular la principal bomba relacionada en el transporte del cobre en los enterocitos es la proteína humana transportadora de cobre 1 (hCTR1, por sus siglas en inglés). Se localiza en la membrana plasmática de los enterocitos, en donde actúa como un transportador convencional, otorga una vía permeable a los

iones Cu^{2+} y puede internalizarse ante una alta concentración de cobre. Se reconoce que este transportador posee una alta afinidad cuya acción es dependiente del tiempo; además, está bajo influencia de la saturación de iones de cobre, es susceptible a la acción del pH ácido extracelular y a las altas concentraciones de potasio (Lee et al., 2002).

Por otro lado el transporte del ion Cu^+ en las células intestinales es llevado a cabo por la proteína de transporte de metal di catión I (DMT1, por sus siglas en inglés), conocido también como Nram2 o DCT1 (Arredondo et al., 2003).

Atreves de diferentes estudios se ha elucidado que el transporte de Cu^{2+} y el de Fe^{2+} están interconectados, (Han and Wessling-Resnick, 2002) demostrándose que la suplementación con cobre en células Caco-2 activa a los receptores DMT1 como la hefaestina y el transportador de hierro ferroportina-1 (Fpn1), esclareciendo la relación en la regulación del transporte de hierro por parte del cobre en las células intestinales (Wapnir, 1998).

Una vez que llega el cobre al citoplasma, este ion es transportado a través del citoplasma por medio de metalotioneínas (Crisponi et al., 2010; Kägi and Vallee, 1960), siendo la unión del cobre a las metalotioneínas un proceso esencial para evitar la toxicidad y estrés oxidativo inducido por el cobre (Sturniolo et al., 1999). Así mismo, dichas proteínas se encargan del transporte del cobre desde el polo luminal de las células intestinales hasta el polo baso-lateral (Bremner, 1980).

A partir de la región baso-lateral son transportados hacia el principal transportador de cobre a través de la membrana basal celular, la ATP7A, conocida

también como proteína de Menkes (MNK) (Bankier, 1995). Trabajos previos bajo condiciones de falta y exceso de cobre en células epiteliales intestinales, han demostrado que bajo condiciones de escasez de cobre la proteína ATP7A es retenida en la red trans de Golgi (Nyasae et al., 2007); en contraparte, en condiciones de exceso de cobre, la ATP7A se relocaliza desde el aparato de Golgi hacia la periferia celular (Greger and Snedeker, 1980).

En conjunto con la ATP7A se reporta otra proteína distinta de transporte de cobre, la ATP7B (proteína Wilson) que, en conjunto con la ATP7A, lleva a cabo funciones esenciales en la homeostasis del cobre (Lutsenko et al., 2007). En el hígado la ATP7B se localiza en la red trans de Golgi, en donde provee iones cobre a cupro-enzimas esenciales. En condiciones de estrés tanto la ATP7A y ATP7B detectan el incremento de los niveles de cobre y se translocan a la membrana de la célula para liberar el exceso de cobre (La Fontaine and Mercer, 2007). En los hepatocitos la ATP7B se encuentra en la red trans de Golgi cuando la concentración de cobre alcanza niveles muy escasos (por debajo de $1\mu\text{mol/L}$); en contraste, cuando las concentraciones son altas se distribuye en estructuras vesiculares y canalículos biliares (Roelofsen et al., 2000).

La Glutaredoxina (GRX1) también ha sido propuesta como esencial en la función de ATP7A/B, mediante la catálisis de los enlaces di sulfuro y la reversión de la glutationización de los residuos de cisteína en los seis dominios de unión de cobre, MXCXXC, favoreciendo la unión a cobre y subsecuentemente su transporte (Lim et al., 2006). Adicionalmente, otra proteína, la subunidad p62 de la dinactina, interactúa con la ATP7B, dando lugar al complejo ATP7B/p62, siendo un

componente relevante en la vía en donde el cobre unido a ATP7B es enviado a las vesículas subapicales del hepatocito para remover el exceso de cobre de la bilis (Lim et al., 2006).

1.4. Patologías ligadas al exceso o deficiencia de cobre

Una gran parte del conocimiento con el que se cuenta hasta el momento sobre los mecanismos de la homeostasis del cobre a nivel molecular proviene de los modelos de dos enfermedades relacionadas con el metabolismo del cobre: la enfermedad de Menkes (**Figura 3**), la cual se caracteriza por una aparente deficiencia de cobre; y la enfermedad de Wilson (**Figura 4**), que se manifiesta como un exceso de cobre en el cuerpo (Andrews, 2002; Llanos and Mercer, 2002; Mercer, 1998). Dichas enfermedades son diferentes entre sí, pero su origen surge a partir de dos bombas de cobres muy similares, la ATP7A y ATP7B, respectivamente (Tapiero et al., 2003).

Los análisis genéticos tanto de pacientes con enfermedad de Menkes, como de modelos animales, han demostrado que alrededor del 20% de las mutaciones que producen esta enfermedad son deleciones en el gen de la ATP7A, al igual que cambios en un par de bases, mutaciones de empalme, mutaciones sin sentido y duplicaciones (Tümer and Horn, 1997). En estos pacientes el cobre no puede ser expulsado de las células intestinales por las bombas de cobre, lo cual evita que el metal llegue al torrente sanguíneo al hígado y de ahí al resto del

cuerpo (Kaler, 1998), mimetizándose como una severa deficiencia nutricional de cobre.

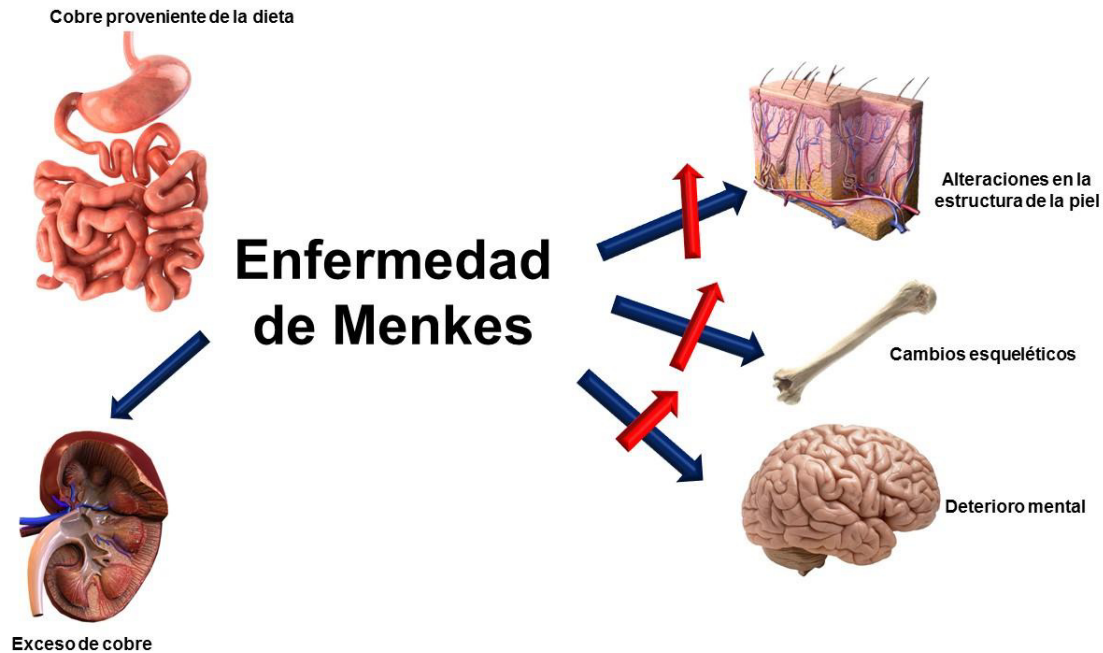


Figura 3. Enfermedad de Menkes. En este esquema se muestran los síntomas de la enfermedad de Menkes (Tapiero et al., 2003).

Por otro lado, la enfermedad de Wilson, conocida también como degeneración hepatolenticular, es una enfermedad autosómica recesiva del cromosoma 13, en donde el transporte de cobre se encuentra alterado (Llanos and Mercer, 2002; Mercer, 2001). Se estima que existen una frecuencia de 1/30,000, lo cual indica una frecuencia heterocigota de 1/90 en toda la población (Stern et al., 2007).

Esta enfermedad es provocada por la poca o nula incorporación del cobre en la ceruplasmina derivando en una excreción biliar deficiente de cobre, debido a mutaciones en la proteína ATP7B. Esto permite el desarrollo de una toxicosis a

causa del exceso de cobre almacenado en el organismo, principalmente en hígado y cerebro, y en menor cantidad riñones, ojos y otros órganos (Stern et al., 2007).

Los síntomas se manifiestan en rangos de edad que abarcan desde los 3 a 50 años de edad y pueden ser variados; pero los principales abarcan manifestaciones hepáticas, neurológicas y psiquiátricas, y raramente renales, esqueléticas o endocrinas. Las manifestaciones de la enfermedad a nivel hepático pueden ser de dos tipos, aquellas que aparentan ser una cirrosis aguda mientras las manifestaciones más agresivas evolucionan rápidamente hacia una hepatitis fulminante (Ferenci et al., 2003).

A nivel neurológico, el daño ocurre inicialmente en el putamen y globo pálido, conocidos en conjunto como núcleo lenticular (razón por la que a la enfermedad también se le denomina degeneración hepatolenticular), induciendo síntomas tales como temblor en las extremidades superiores, movimientos lentos y cambio de temperamento (Ferenci et al., 2003).

Una característica muy evidente de esta enfermedad es la presencia de anillos Kayser-Fleischer, de color café oxidado en los bordes externos del iris, resultado del acumulamiento de cobre, evidenciando que el cobre ha empezado a acumularse en el sistema nervioso e iniciado el daño sobre este. Este síntoma se presenta alrededor del 90% de los casos de esta enfermedad, y ocasionalmente, con colestasis prolongada y cirrosis criptogénica (Ferenci et al., 2003).

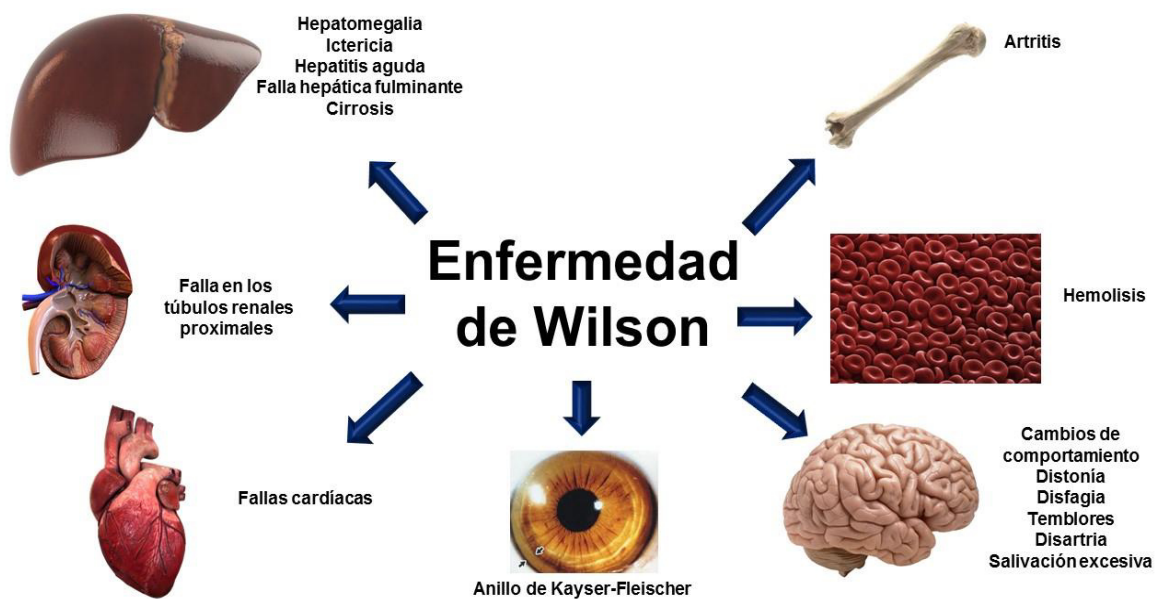


Figura 4. Enfermedad de Wilson. Principales síntomas de la enfermedad de Wilson (Tapiero et al., 2003)

Aunque el papel del cobre en patologías humanas, no se limita solamente a la enfermedad de Wilson y Menkes, existen reportes que relacionan al cobre con cáncer, diabetes, problemas cardiovasculares, aterosclerosis y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica) (Jomova and Valko, 2011).

Para el caso del cáncer se ha demostrado que existe un alza en la concentración de cobre tanto en suero como tejido tumoral a comparación de un paciente sano y de otros metales tales como el zinc, hierro y selenio cuyas concentraciones disminuyen durante el desarrollo del tumor (Gupte and Mumper, 2009). Una de las posibles explicaciones de dicho aumento en la concentración del cobre es debido a que el metal favorece la angiogénesis, un mecanismo por el

cual los tumores desarrollan vasos sanguíneos que facilitan el transporte de nutrientes a través de la sangre hacia el tumor (Folkman, 1995). Este proceso es favorecido por la acción de diferentes citosinas y factores de crecimiento tales como la interleucina 1 (IL-1), factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). La relación del cobre con estos factores fue establecida gracias a que se ha demostrado que, al eliminar el cobre en modelos celulares, la expresión de estos factores y citosinas se ve suprimida (Brem et al., 1990).

En lo que respecta a la diabetes, problemas cardiovasculares y aterosclerosis, se ha reportado que los niveles de ceruplasmina incrementan tanto en la diabetes tipo 1 como en el tipo 2, a comparación de individuos sanos (Uriu-Adams and Keen, 2005). De manera simultánea, los pacientes con diabetes que padecen de complicaciones de la misma enfermedad como retinopatía e hipertensión, presentan altas concentraciones de cobre en el plasma (Kang et al., 2000). Una posible explicación a esto es que las proteínas glicosiladas poseen una mayor afinidad hacia metales de transición tales como el cobre, pudiendo con esto favorecer la formación de radicales libres incrementando el estrés oxidativo en la diabetes (Yim et al., 2001). De hecho, los daños inducidos por estrés oxidativo (proteínas dañadas, peroxidación de lípidos y daño en el DNA) han sido observados e implicados en la patogénesis de las complicaciones de diabetes (Aydin et al., 2001; Flores et al., 2004).

Igualmente se ha reportado que niveles elevados de ceruplasmina, y por consecuencia de cobre, se encuentran relacionados a enfermedades cardíacas y

coronarias; observándose que las moléculas antiinflamatorias, como lo son las lipoproteínas de alta densidad (HDL) cambian durante la fase aguda de la enfermedad a moléculas proinflamatorias (Cunningham et al., 1995). También el cobre está involucrado con la aterosclerosis, siendo la evidencia más relevante la posible interacción del cobre con la homocisteína, produciendo radicales libres y oxidando las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales han sido localizadas en las placas ateroscleróticas (Haidari et al., 2001).

En el campo de las enfermedades neurodegenerativas, el cobre, se encuentra relacionado a diversas patologías, tales como las encefalopatías espongiiformes (enfermedad de la vaca loca, Scrapie y Creutzfeldt-Jakob), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Bleackley and MacGillivray, 2011). Para el caso de las encefalopatías espongiiformes, estas son causadas por alteraciones en la estructura de la PrP, cuya función específica no está aún bien definida, pero se ha relacionado a esta proteína en la homeostasis del cobre en el cerebro, transportando cobre hacia la célula protegiéndola del estrés oxidativo, entre otras funciones (Westergard et al., 2007); así mismo, se ha demostrado *in vivo* que se esta proteína se une al cobre (Rana et al., 2009).

En el caso de la enfermedad de Scrapie, el mecanismo neurotóxico es inducido por la interacción entre el cobre y otro metal (Zn, Fe y Mn), alterando la unión a metales por la proteína PrP^{Sc} y contribuyendo al desarrollo de la patología (Wong et al., 2001).

En lo concerniente de la enfermedad de Huntington, tanto las concentraciones de hierro y cobre se encuentra elevadas en el cuerpo estriado de los pacientes que la padecen (Dexter et al., 1991). Las características de esta enfermedad es el deterioro progresivo a nivel motor, cognitivo y psiquiátrico, producto de la expansión dominante en el extremo amino de glutamina en la proteína huntingtina. La proteína mutante es procesada por la caspasa 6, siendo los productos de su escisión los mediadores de la enfermedad (Graham et al., 2006). Tanto en su estado normal como mutante esta proteína interacciona exclusivamente con el ion cobre. Además, se ha reportado que el cobre promueve la agregación, mientras que el tratamiento quelante previene la agregación de los fragmentos de la proteína mutante (Fox et al., 2007).

Además, el cobre se encuentra relacionado con la aceleración en la agregación de la α -sinucleína, lo que favorece la formación de cuerpos de Lewis en la enfermedad de Parkinson (Rasia et al., 2005), y se posee evidencia de que el cobre interactúa con la proteína precursora del β -amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Dingwall, 2007).

1.5. Macro autofagia (autofagia)

La autofagia (del vocablo “auto” de propio y “fagia” de comer), se refiere a cualquier proceso de degradación celular, en el cual se vea involucrada la entrega de componentes citoplasmáticos hacia los lisosomas. Este término fue acuñado por Christian de Duve, hace más de 50 años (alrededor de 1963) al observar la

degradación de mitocondrias y otras estructuras intracelulares dentro de lisosomas localizados en los hígados de ratas perfundidos con la hormona glucagón (Deter and De Duve, 1967; Klionsky, 2007; Ohsumi, 2014; Zhang et al., 2016).

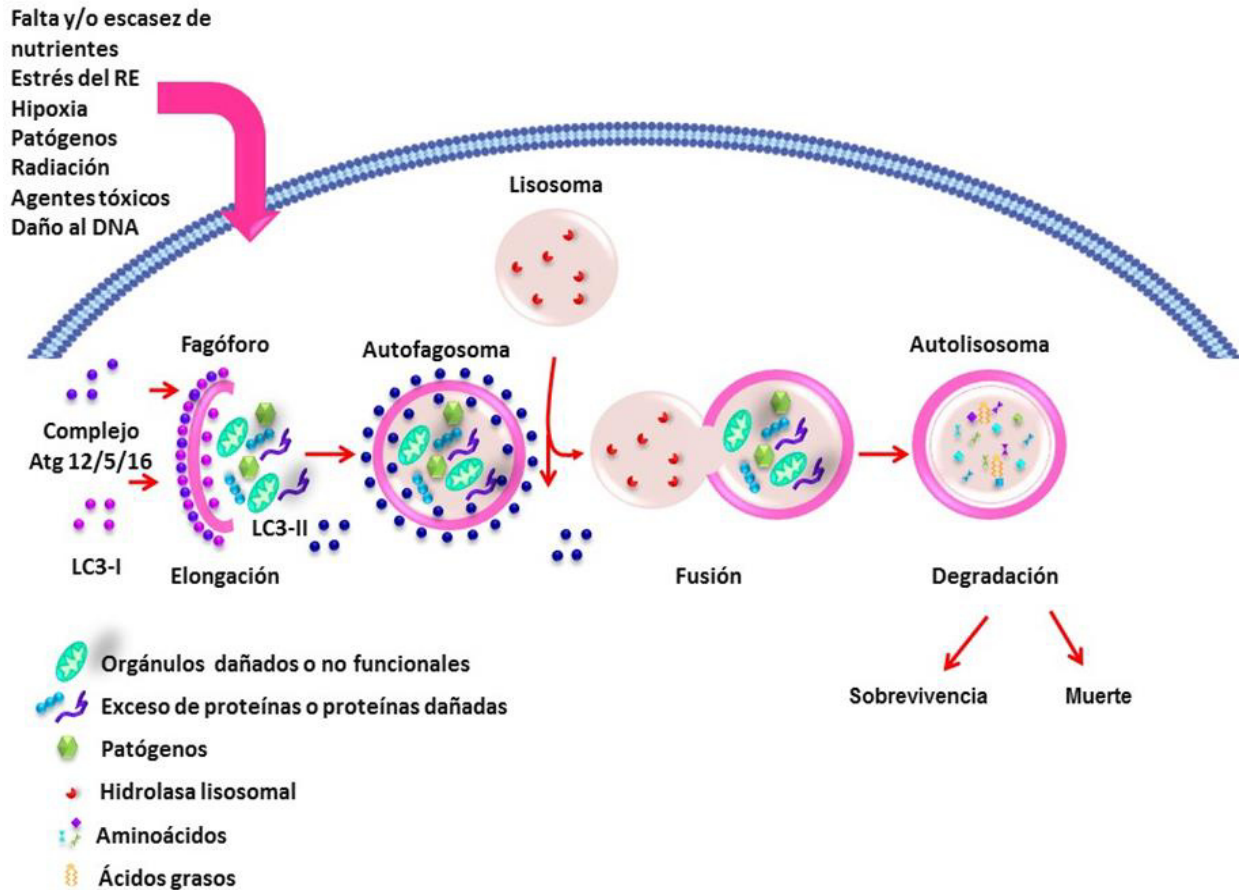


Figura 5. Autofagia. Vía general de la macro autofagia (autofagia) (Rodriguez-Rocha et al., 2011).

Existen tres tipos principales de autofagia reconocidas: autofagia mediada por chaperonas, macro autofagia (comúnmente denominada autofagia) y micro autofagia. Estos procesos varían de acuerdo a sus funciones fisiológicas y en el modo en el cual transportan el material citoplasmático para su degradación lisosomal (Levine and Kroemer, 2008).

A nivel genómico se reconocen 32 diferentes tipos de genes relacionados con la autofagia (Atg), identificados por medio de tamizaje genético en levaduras. De manera significativa, muchos de estos genes se han conservado en otros organismos eucariotas, enfatizando la relevancia de la respuesta a la falta de nutrientes a nivel filogenético (Nakatogawa et al., 2009).

Uno de los eventos más relevantes en la autofagia, es la escasez de energía, debido a la falta de nutrientes o a cantidades limitadas de ATP (Glick et al., 2010), lo cual induce a la activación de AMPK y por consecuencia esta quinasa activa la autofagia. De igual modo la falta de factores de crecimiento induce a la inhibición del coactivador transcripcional regulado por CREB-1 (TORC1, por sus siglas en inglés), encargado de inhibir la autofagia; sin embargo, cuando la AMPK se encuentra activa y/o se inhibe TORC1, el proceso de autofagia se activa.

El principal objetivo de la autofagia, es la entrega de componentes celulares al interior de los lisosomas para ser degradados, con el fin de obtener recursos para cumplir con la demanda energética y de metabolitos requeridos durante periodos de hambruna. Sin embargo, este proceso también puede llevar a cabo la degradación selectiva de orgánulos dañados o sobrantes (autofagia selectiva) (Green and Levine, 2014).

A nivel general, este proceso inicia cuando se forma una membrana de aislamiento, denominada fagoforo, la cual posiblemente provenga de una membrana lipídica del retículo endoplásmico (ER) y/o de la red trans de Golgi y endosomas, aunque su origen específico resulta algo controversial (Axe et al.,

2008; Simonsen and Tooze, 2009). Como se observa en la **Figura 5**, esta estructura se expande para rodear el material a degradar, y por lo tanto, llevar a la formación de una estructura membranosa denominada autofagosoma (Mizushima, 2007).

Al poseer contenido, el autofagosoma se fusiona con lisosomas, dando paso al autofagolisosoma y promoviendo la degradación del material de su interior por medio del uso de las proteasas acidas lisosomales. Una vez degradado el contenido hasta aminoácidos, u otros materiales, las permeasas y transportadores lisosomales los exportan hacia el citoplasma, donde son reutilizados para la creación de macromoléculas o en distintos procesos metabólicos (Mizushima, 2007).

Los 5 pasos esenciales en el proceso de autofagia son: 1) la formación del fagoforo; 2) la conjugación de Atg5-Atg12 y su interacción con Atg16L y su multimerización en el fagoforo; 3) el procesamiento de la cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada al microtúbulo (LC3) y su inserción en la membrana durante la expansión del fagoforo; 4) la captura de material aleatorio o específico para su degradación y 5) la fusión con los lisosomas y la degradación del contenido del autofagolisosoma (Glick et al., 2010).

1.6. Mecanismos moleculares de la autofagia

Se reconoce que el primer paso regulatorio de la autofagia, involucra la represión del blanco de la rampamicina en mamíferos Ser/Thr quinasa (mTOR, por sus siglas en inglés), encargada de inhibir la autofagia por medio de la fosforilación del Atg13 (**Figura 6**). Esta fosforilación promueve la disociación del Atg13 de un complejo proteico que contiene la quinasa Atg1 y Atg17, y a la par inactiva la actividad quinasa de Atg1. Sin embargo, cuando mTOR es inhibido, la Atg13 desfosforilada se asocia con Atg, estimulando la actividad catalítica, induciendo la autofagia (Díaz-Troya et al., 2008).

Entre los pasos iniciales de la nucleación de la vesícula, se encuentra la activación de Vps34, una clase de fosfatidilinositol 3-quinasa clase 3 (PI3K) para generar el fosfatidilinositol-3 fosfato. La activación de esta quinasa es dependiente de la formación de un complejo proteico en el cual Beclin-1 (análogo de Atg6 en mamíferos), el gen supresor de tumores relacionado a la resistencia a UV (UVRAG, por sus siglas en inglés) y p150 forman parte (Backer, 2008; Liang et al., 2006).

Una vez ensamblado este complejo, 2 sistemas similares a ubiquitina son encargados del proceso de la elongación de la vesícula, como se observa en la **Figura 6**. El primero involucra la conjugación de Atg12 a Atg5, por la actividad similar de E1 de Atg7, y la similar a E2 de Atg10. El segundo involucra la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3 (en mamíferos) / Atg8 (en

levaduras), por la acción secuencial de la actividad proteolítica de Atg4, la actividad parecida a E1 de Atg7 y la actividad parecida a E2 de Atg3, para dar paso a la formación de la forma asociada a vesículas (LC3-II), a partir de forma soluble de LC3 (LC3-I). Debido a esto, LC3-II es utilizada como un marcador de autofagia. Sin embargo, el mecanismo donde interviene Atg9 es aún poco conocido (Barth et al., 2010; Kabeya et al., 2000; Kirkin et al., 2009). Conforme los autofagosomas maduran se fusionan con lisosomas para formar los autolisosomas. En estos, la membrana interior y el contenido luminal de las vacuolas es degradado por las enzimas lisosomales (Eskelinen, 2008).

Cabe mencionar que el proceso de autofagia puede ser inducido o inhibido por diferentes tipos de fármacos. Entre los fármacos inductores se encuentra la rampamicina. Mientras entre los fármacos reportados que inhiben dicho proceso se encuentran aquellos que inhiben las PI3K clase 3 como la 3-metiladenina, o los que evitan la actividad de las bombas de protones lisosomales como la bafilomicina A1 o aquellos agentes alcalinizantes lisosomales tales como la cloroquina y la 3- hidroxicloroquina (Rubinsztein et al., 2007).

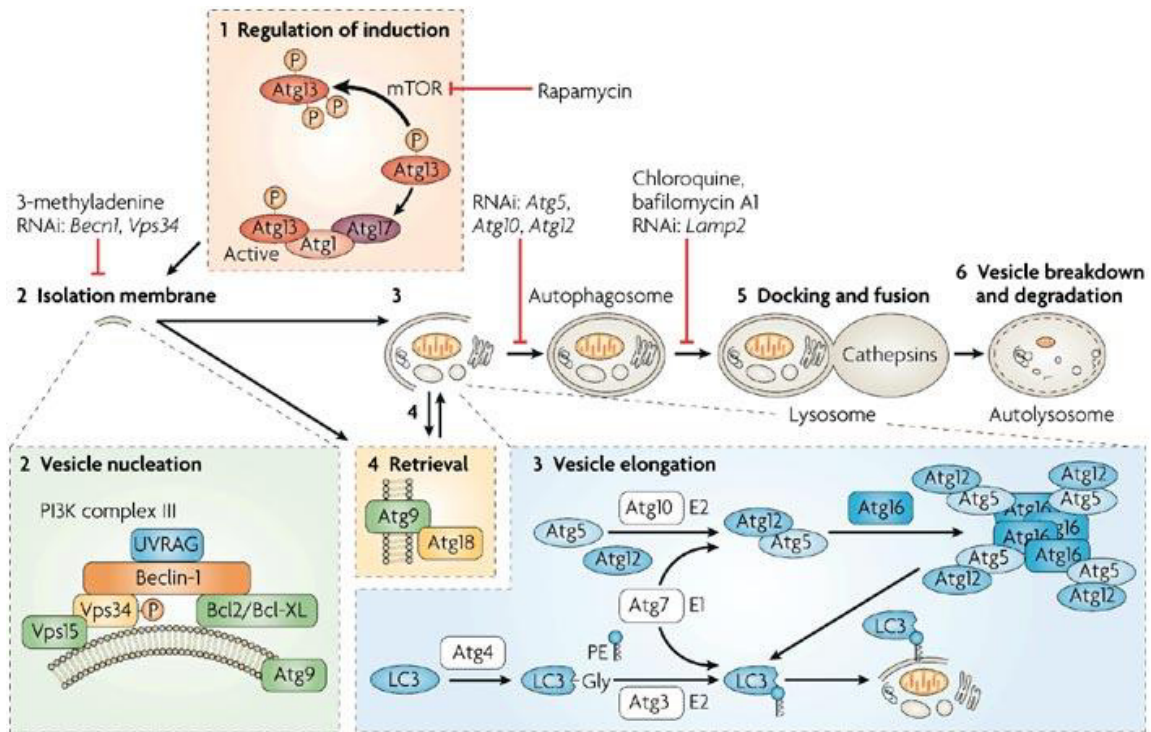


Figura 6. Mecanismo de la autofagia. Circuito molecular y señalización regulatoria de la autofagia (Maiuri et al., 2007).

1.7. Autofagia selectiva

Aunque en general la autofagia ha sido vista como un proceso aleatorio, debido a que se engulle cualquier componente del citoplasma sin discriminación, por microscopia electrónica se han distinguido una variedad de componentes celulares incluyendo mitocondrias, membranas de ER y Golgi (Eskelinen, 2008). Adicionalmente, existe mucha evidencia que indica que la membrana del fagoforo en crecimiento puede interactuar selectivamente con agregados proteicos y orgánulos, haciendo que se proponga que LC3-II, actúa como un “receptor” en el fagoforo con un “adaptador” que se encuentra en el blanco a degradar (agregados

de proteínas, mitocondrias, etc.) para promover su captura y degradación selectiva (Glick et al., 2010).

La molécula mejor descrita en este aspecto es la nucleoporina 62/sequestroma 1 (p62/SQSTM1), un adaptador multifuncional que promueve la remoción de agregados de proteínas poli-ubiquitinadas. La mutación de este adaptador se encuentra relacionada con la enfermedad de Paget, patología en donde la remodelación de los huesos resulta en malformaciones óseas, artritis y daño a los nervios (Ralston, 2008). Los osteoclastos de los pacientes que sufren esta enfermedad muestran una baja señalización del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) como resultado de la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas, lo cual comprueba la relación entre la autofagia y un desarrollo normal de los huesos (Ralston, 2008).

Otras moléculas, tales como la proteína cercana al gen BCR 1 (NBR1), poseen una función similar a p62/SQSTM1 relacionada con promover la remoción de proteínas ubiquitinadas, mientras que, en levaduras, Uth1 y Atg32 han sido identificadas como proteínas que promueven la adquisición selectiva de mitocondrias, un proceso denominado mitofagia, el cual es relevante para mantener la integridad de la mitocondria y limitar la producción de ROS (Kim et al., 2007).

Se puede mencionar que la autofagia selectiva tiene una gran relevancia para el caso de neuropatías, cáncer y enfermedades cardíacas (Glick et al., 2010). Ejemplos de esta relación se han establecido en modelos murinos carentes de

Atg7 (Komatsu et al., 2005), en donde agregados de proteínas poli-ubiquitinadas asociadas a p62 se acumulan, y en conjunto con la delección de Atg7 y p62 se ha observado que la célula se “salva” de formar inclusiones citosólicas aberrantes (Komatsu et al., 2007). Lo anterior coincide con lo observado en los cuerpos de Mallory, los cuales se encuentran acumulados en carcinomas hepatocelulares humanos, en donde su componente más prominente es p62. Recientemente se ha indicado que un alto nivel de p62 juega un papel importante en la desregulación de la señalización de NF- κ B, induciendo una inflamación relacionada con el proceso de tumorigénesis (Mathew et al., 2009).

Se sabe que la acumulación de agregados intracelulares es un factor muy relevante en enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, Huntington, Parkinson y la Creutzfeld-Jakob/prion. Por ejemplo, las repeticiones de poliglutaminas, observadas en mutantes de la proteína huntingtina (enfermedad de Huntington), formas mutantes de α -sinucleína (enfermedad de Parkinson familiar) y diferentes formas de la proteína Tau (enfermedad de Alzheimer) son dependientes de la autofagia para su remoción en las neuronas (Hara et al., 2006; Rubinsztein, 2006; Yue et al., 2009). Además, se ha observado que la inactivación de los genes Atg5 o Atg7 resulta en un incremento en los agregados intracelulares y el desarrollo de neurodegeneración en modelos murinos (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2005).

1.8. Relación entre cobre y autofagia

Se reconoce que el cobre induce autofagia tanto en células neuronales como tumorales (Paris et al., 2009; Zhang et al., 2016). Un ejemplo de esto son los complejos cobre-dopamina (Cu-DA), los cuales inducen a una excesiva mitofagia y, subsecuentemente, una muerte por apoptosis en líneas celulares catecolaminérgicas (Paris et al., 2009). Así mismo, el cobre potencia el flujo de la autofagia en células dopaminérgicas, de manera dosis-dependiente. Se ha reportado que la inducción de la autofagia es producto de la activación de la señalización de AMPK-ULK; por otro lado, la inhibición de la autofagia a nivel genético agrava la muerte celular inducida por cobre, indicando un posible papel protector en contra de la apoptosis relacionada a cobre (Anandhan et al., 2015). Esta reportado además el desarrollo de compuestos cúpricos como tratamientos antitumorales; por ejemplo, el complejo coordinado de cobre Cas-III-ia, posee la capacidad de inducir autofagia en células de glioma C-6 posiblemente por la formación de ROS y la posterior activación de JNK por medio de ROS (Trejo-Solís et al., 2012). La inhibición de la autofagia inducida por Cas-III-ia potencia la muerte celular inducida por este compuesto, por lo cual se considera que la autofagia es un proceso antagónico de la apoptosis. A la par, otro complejo cúprico anti tumoral, HYF127c/Cu, ha sido reportado de inducir autofagia con acción protectora a través de la activación de la señalización de la p38 proteína quinasa activada por mitógenos MAPK (p38 MAPK, por sus siglas en inglés) (Zhong et al., 2014).

En contraste, compuestos basados en Cu, como el LCu, activan la muerte celular inducida por ROS en células HeLa (Guo et al., 2010). Las diferencias entre

los resultados obtenidos pueden deberse al tipo celular a usarse, concentraciones y tiempos de exposición; sin embargo, todos los estudios señalan que el cobre es capaz de inducir autofagia. Por lo cual aún no existe un consenso con respecto en el papel protector o inductor de la autofagia ante la presencia de cobre (Zhang et al., 2016).

1.9. Modelo celular HEK-293

La línea celular proveniente de células de riñón fetal línea celular 293 (HEK-293) fue reportada por primera vez en el año de 1977 cuando Graham *et al* reportó la transfección con el adenovirus tipo 5 de células de riñón fetal de un aborto legal, aisladas por Alex van der Ebs en 1973 (Graham et al., 1977).

Se ha demostrado que las células HEK-293, y otras líneas celulares derivadas de estas (293T y 293S), poseen de 5 a 6 copias de fragmentos de DNA de adenovirus 5, los cuales codifican para el gen temprano 1 (E1) (Lin et al., 2014). Un sitio de inserción del DNA del adenovirus 5 se encuentra en el locus de la beta 1 glicoproteína específica de embarazo 4 (PSG4), localizada en el cromosoma 19q13.2 (Lin et al., 2014).

Cabe mencionar que después de las células HeLa y células CHO, las células HEK-293 son las más utilizadas para diversos procesos (Lin et al., 2014), tales como la producción de vacunas adenovirales (Stepanenko and Dmitrenko, 2015), producción de proteínas recombinantes (Geisse and Fux, 2009), ensayos

de sinapsis neuronales en cultivos mixtos (Biederer and Scheiffele, 2007), electrofisiología y neurofarmacología (Thomas and Smart, 2005). Así mismo, se ha utilizado para el análisis de la transformación y/o capacidad oncogénica de genes asociados a cáncer (Kavsan et al., 2011). Debido a esto, no es tan correcto mencionar que dichas células son células no tumorigénicas o aún “células normales” (Stepanenko and Dmitrenko, 2015).

Aún no se ha podido determinar exactamente de qué tipo de tejido en específico pertenecen las células HEK-293, ya que se han considerado por mucho tiempo como células epiteliales de riñón embrionario (Cusick et al., 2010) o fibroblastos (Yung et al., 2012). Algunos autores han demostrado que expresan marcadores de estadios de desarrollo renales entre la mesénquima condensado y cuerpos epiteliales en forma de S, pero sin expresión de marcadores de segmentos tubulares, túbulo proximal, o conductos colectores (Torban and Goodyer, 1998), además de la expresión ectópica del factor pareado del box gene 2 (PAX2), el cual es relevante para los estadios tempranos para la nefrogénesis, así como de E-cadherina, vimentina modificada, y Wilms 1 Tumor, de tal manera como sucede en la transición del mesénquima del epitelio hacia la nefrogénesis *in vivo* (Torban and Goodyer, 1998).

Se puede indicar que cuando estas células son crecidas en esferas 3D en placas de baja adherencia de cultivo celular, las HEK-293 incrementan marcadores de células madres embrionarias, endodermo, mesodermo y ectodermo, así como de células progenitoras renales, marcadores de glomérulos,

túbulos proximales, asa de Henle y túbulos distales, a comparación de las células cultivadas en monocapa (Su et al., 2013).

Al analizar las líneas celulares que resultan blancos preferenciales para el Ad5, mediante inmunocitoquímica como análisis de transcriptoma, se asumió que las células HEK-293 posiblemente son derivadas de un linaje neuronal, al igual que otras células transformadas por Ad, tanto humanas como murinas, las cuales expresaban neurofilamentos y más de 60 genes específicos de neuronas, entre ellos neuroreceptores, subunidades de canales de iones neuronales, vesículas sinápticas, y enzimas metabólicas (Shaw et al., 2002) (Thomas and Smart, 2005).

Una posible explicación de la presencia de estos marcadores es la expresión de la proteína E1 del Ad5, la cual realiza una reprogramación en el transcriptoma, haciendo que las células sean capaces de expresar un fenotipo similar a neuronas bajo ciertas condiciones (Arnhold et al., 2008). Además, estudios electrofisiológicos de las células HEK-293 demostraron canales dependientes de voltaje endógenos específicos de neuronas de calcio, potasio y sodio y sensibles a diversos agonistas relacionados en la señalización neuronal (ejemplo acetilcolina, bradiquinina, histamina, neurotensina y ATP) (He and Soderlund, 2010; Vetter and Lewis, 2010). Igualmente, estas células pueden servir como vehículos para la propagación de virus altamente neurotrópicos (virus de la polio y rabia) (Campbell et al., 2005; Jahan et al., 2011; Madhusudana et al., 2010). Aun así, estas células no manifiestan un fenotipo funcional neuronal, pero poseen características de células de linaje neuronal (Stepanenko and Dmitrenko, 2015).

No obstante, en estudios más recientes del transcriptoma de estas células, y comparándolo con otros previamente publicados y de diferentes tejidos humanos (riñón, SNC, glándula pituitaria, y glándulas adrenales), se observó que el mayor número de coincidencias correspondía a la glándula adrenal, mientras que el riñón fue la que tuvo menos coincidencias (Lin et al., 2014).

Por lo que se realizó la hipótesis que las células HEK-293 son originadas en la estructura precursora adrenal embrionaria (medula adrenal), la cual está sumamente relacionada con el riñón durante el desarrollo y con el origen de la cresta neuronal del ectodermo (Lin et al., 2014).

Capítulo II.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1. Justificación

Debido a la trascendencia biológica del cobre en la célula y su relación en patologías de importancia médica, es de gran interés determinar los mecanismos implicados en la muerte celular inducida por este metal.

2.2 Hipótesis

La sobre exposición al ion cobre, induce la activación de la autofagia en células HEK-293.

Capítulo III.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Definir el papel de la autofagia en la supervivencia y/o muerte celular inducida por cobre.

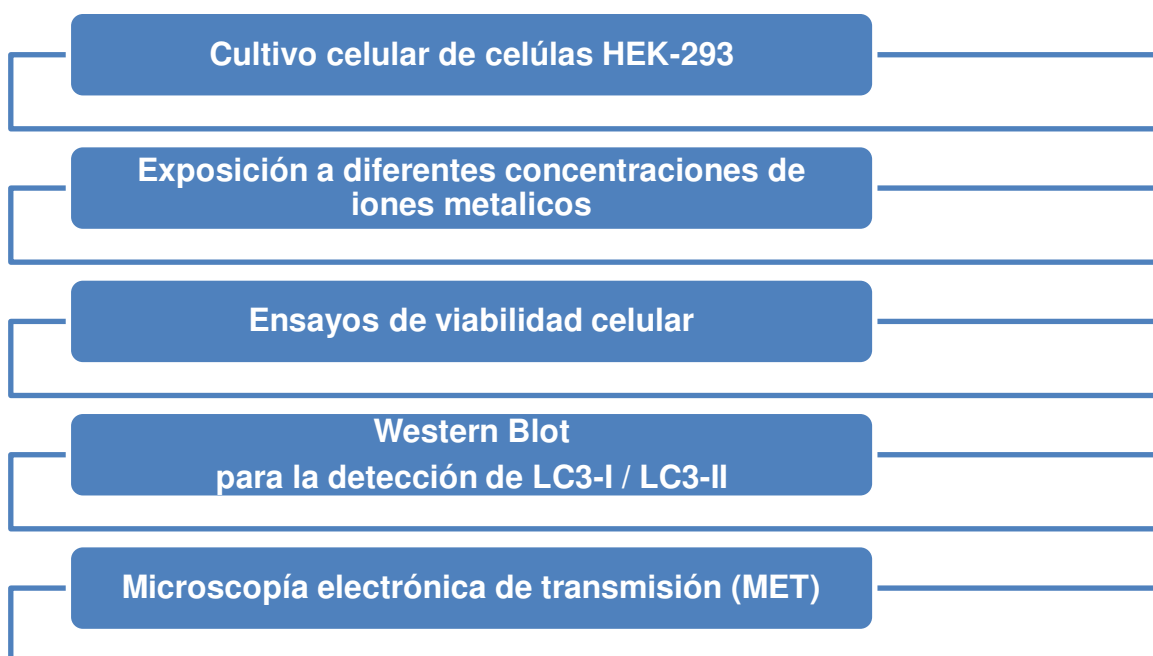
3.2. Objetivos específicos

1. Determinar si el cobre induce muerte celular en la línea celular HEK-293.
2. Demostrar si el cobre activa la vía de la autofagia en esta línea celular.
3. Determinar si otros metales inducen autofagia en esta línea celular.
4. Comprobar el proceso de autofagia mediante la identificación de autofagosomas.

Capítulo IV.

ESTRATEGIA GENERAL

Para llevar a cabo los objetivos planteados en el presente proyecto de tesis, se realizó la siguiente estrategia general.



Capítulo V.

MATERIALES

5.1. Material biológico

5.1.1. Línea celular HEK-293 de riñón embrionario humano

Esta línea celular fue desarrollada por Graham *et al* en el año de 1977 (Graham et al., 1977), mediante la transfección con DNA de adenovirus tipo 5 en células de riñón embrionario humano, dichas células poseen el gen E1 integrado en su genoma. Su registro en la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés) es el QBI-293A. Estas células se cultivan en medio DMEM Advance con 4% de suero fetal bovino, 1% de glutamina, y 1% de Penicilina, Estreptomomicina-Anfotericina B. Incubándolas a una atmósfera de 5% de CO₂.

5.2. Material

5.2.1. Material para cultivo celular

Caja de cultivo 75 cm ²	Corning (Corning, NY, USA)
Caja de 96 pozos	Corning (Corning, NY, USA)
Tubos tipo Falcón de 50 ml y 15 ml	Corning (Corning, NY, USA)
Pipetas serológicas de 10 ml y 5 ml	Corning (Corning, NY, USA)
Cámara de Neubauer	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Alemania)

5.3. Reactivos.

5.3.1. Reactivos para cultivo celular

Dulbecco's Modified Eagle Advanced DMEM	Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA)
L- Glutamina (200 mM 100X).	Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA)
Suero Fetal Bovino (FBS).	Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA)
Tripsina-EDTA (0.25%).	Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA)
Solución de antibiótico penicilina- estreptomicina	Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA)
Calceína	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Azul de tripano	Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY, USA)

5.3.2. Reactivos para tratamientos con metales y análisis de la autofagia

Sulfato de Cobre (CuSO_4)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sulfato de Zinc Hidratado (ZnSO_4)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Sulfato de Manganeso (MnSO_4)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Cloruro de Hierro Heptahidratado (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hidroxiclороquina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.3.3. Reactivos para geles de acrilamida.

Acrilamida 40%	BioRad (Nobel Drive Hercules, CA, USA)
TEMED	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PSA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Page Ruler Plus Protein Ladder	Thermo (Waltham, MA, USA)
Tris-Base	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Beta Mercaptoetanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Azul de Coomassie R-250	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.3.4. Reactivos para Western Blot

Na-deoxicolato	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NP-40	US-Biological (Swampscott, MA USA).
Coctel de inhibidor de proteasas y fosfatasas	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Pierce™ ECL Substrate	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Triton X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
NaCl	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Metanol 95%	CTR (Mty, NL, México).
Glicina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.3.5. Anticuerpos para Western Blot

Anti LC3 policlonal (rabbit IgG) [1:1000]	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti β -actina monoclonal (mouse IgG) [1:5000]	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti conejo HRP (goat IgG) [1:300]	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
Anti ratón IgG HRP (rabbit IgG) [1:5000]	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.4. Equipos

5.4.1. Equipos generales

Micro centrifuga 1-15K	Sigma (Osterode am Harz Alemania)
Micropipetas de 1000 μ l, 200 μ l, 20 μ l, 10 μ l y 2 μ l BioPette	Labnet (Edison, NJ, USA)
Báscula Analítica (A&D) GR-120	A&D (San Jose CA, USA)
Ultra refrigerador (-80°C) (Thermo)	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Congelador (-20°C)	Torrey (Monterrey, NL, México)

Fluorómetro
BioRad (Nobel Drive Hercules, CA, USA)

5.4.2. Equipo para cultivo celular

Micro centrifuga 1-15K
Sigma (Osterode am Harz Alemania)

Incubadora de CO₂
Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)

Baño térmico
Lab Armor (Cornelius, OR, USA)

Campana de flujo laminar nivel de bioseguridad II Telstar AH-100
Telstar -Life Sciencies (Terrassa, España)

Microscopio invertido
Southern Precision Instrument (San Antonio, TX, USA)

5.4.3. Equipo para Western Blot

Centrifuga sigma 3-18K
Sigma (Osterode am Harz Alemania)

Micro centrifuga 1-15K
Sigma (Osterode am Harz Alemania)

Estación de poder Labnet Power Station 300V Plus
Labnet (Edison, NJ, USA)

Cámara de electroforesis Mini Protean Tetra Cell
BioRad (Nobel Drive Hercules, CA, USA)

Cámara de transferencia Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
BioRad (Nobel Drive Hercules, CA, USA)

Incubadora Orbital MRC Orbital Shaker Incubator
MRC (Holon, Israel)

Escáner de quimioluminiscencia LI-COR (Lincoln, NE, USA)

5.4.4. Equipo para microscopía electrónica

Micro centrifuga 1-15K Sigma (Osterode am Harz Alemania)

Microscopio electrónico de
transmisión Carl Zeiss (Alemania)

Capítulo VI.

MÉTODOS

6.1. Cultivo celular de la línea celular HEK-293

Las células HEK-293 (ATCC QBI-293) fueron mantenidas en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C y 95% O₂ en condiciones estériles, en medio DMEM Advanced con 4% de suero fetal bovino, 1% de glutamina, y 1% de antibióticos-antimicóticos (100x Penicilina, Estreptomicina-Anfotericina B). Luego de 24 horas de cultivo, las células se sembraron de acuerdo al tipo de placa que los ensayos requirieran utilizando medio fresco adicionado con concentraciones ascendentes tanto de Cu²⁺ como de otros metales (Zn²⁺, Mn²⁺, Fe³⁺).

6.2. Ensayos de viabilidad celular por calceína

Con el fin de elucidar el efecto del Cu²⁺ en la sobrevivencia de células HEK-293, se prepararon placas de 96 pozos a una densidad de 7.5 x 10⁴ células por pozo expuestas a diferentes concentraciones de Cu²⁺ que abarcaba desde 0.0 mM (Control) hasta 1 mM. Después de 24 horas, la viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de calceína-AM, el cual se basa en la actividad de estereasas intracelulares de células metabólicamente activas. Para esto se desechó el medio de cultivo, lavando cada pozo con 100µl de PBS 1X, ya lavados los pozos, se aplicó 100µl de calceína 5 µM durante 30 minutos a las células, al culminar los 30

minutos se adiciono 50 μ l de buffer de lisis celular, mezclando con cuidado la solución de lisis y calceína, depositando 150 μ l de suspensión celular con buffer de lisis/calceína en celdillas para fluorómetro para registrar las señales de fluorescencia a λ excitación=495 nm λ emisión=515 nm. El ensayo se realizó por triplicado.

6.3. Ensayos de viabilidad celular por azul tripano

Una vez realizado el ensayo de viabilidad celular por calceína-AM se pretendía indagar cuánto era el porcentaje de células vivas y muertas ante la exposición de diferentes concentraciones de Cu^{2+} desde 0.0 mM (Control) hasta 1 mM, para esto se utilizaron placas de 6 pozos con 3×10^5 células por pozo. Transcurrido 24 horas de exposición, se colectó en tubos de 15 ml el medio de cultivo viejo, en conjunto con la mezcla hecha por el PBS 1X de lavado /Tripsina-EDTA/ medio nuevo y células de cada pozo, centrifugando la mezcla a 300 g por 5 minutos con el fin de obtener las pastillas celulares. Enseguida las pastillas se lavaron con 1 ml de PBS 1X estéril, centrifugando de nuevo a 300 g por 5 minutos, desechando el PBS 1X y resuspendiendo de nuevo las células en PBS 1X estéril y almacenando sus respectivos tubos en hielo. Posteriormente se mezclaron 10 μ L de suspensión celular con 10 μ L de azul tripano, cargando 10 μ L de esta mezcla en una cámara de Neubauer. Se observaron al microscopio a un aumento de 10X realizando el conteo estándar de células, tomando en cuenta como células vivas

las células birrefringentes y como muertas a aquellas con una coloración azulada. Los experimentos se realizaron por duplicado.

6.4. Extracción de proteína total

Preparadas las células HEK-293 se efectuó la extracción de proteína total de células sembradas en placas de 6 pozos e incubadas con concentraciones ascendentes de diferentes iones metálicos tales como el Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} (0.0 a 1 mM) y Fe^{3+} (0.0, 0.1, 0.5, 1 y 3 mM), después de 24 horas las células fueron procesadas para obtener las respectivas pastillas celulares, retirando cualquier rastro del medio de cultivo por medio de lavados con PBS 1X frío, aplicando posteriormente a los lavados, 30 μl de buffer de lisis RIPA 1X con inhibidores de proteasas [1:100] en sus respectivos tubos, e incubándolos en hielo durante 30 minutos, sometiéndolos a vórtex en intervalos de 10 minutos. Concluida la incubación, los tubos se centrifugaron a máxima velocidad a 4°C transfiriendo el volumen total a tubos de 1.5 ml. Cuantificando la concentración total con el kit de Pierce™ BCA Protein Assay Kit acorde a las indicaciones del fabricante.

6.5. Western Blot para la detección del marcador de autofagia LC3-II

Una vez listos y cuantificados los extractos de proteína de los diferentes tratamientos con iones metálicos, se realizó SDS-PAGE utilizando geles de

poliacrilamida al 15% cargando 25 μg de proteína total por carril, la electroforesis se realizó durante 2 horas a 120 V. Culminada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (120 mA /1 hora) utilizando una cámara de transferencia semi-húmeda. Preparada la membrana, se bloqueó con leche al 5% en TSB-Tween 1X durante una hora a 4°C con agitación. Bloqueada la membrana, se aplicó el anticuerpo primario anti-LC3 (1:1000) incubándola durante toda la noche a 4°C con agitación constante, al día siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos de cada uno con TSB-Tween 1X, incubando la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:3000). Se observaron las bandas mediante el uso del estuche Clarity (BioRad) acorde a las indicaciones del fabricante. En todos los Western Blots fueron normalizados utilizando β -actina.

Para analizar si el flujo de la autofagia se ve inhibido o activado por el cobre se procedió a realizar la misma metodología de cultivo celular y Western Blot para la detección de LC3-II, la única diferencia fue que solo se utilizó la concentración de Cu^{2+} de 0.25 mM con utilizando como control la Hidroxicloroquina 40 μM (CQ).

6.6. Microscopia electrónica

Para corroborar los resultados obtenidos por el Western Blot con respecto a la presencia del marcador de autofagia LC3, se prepararon botellas T-75 (2 x 10⁶ células por tratamiento) incubados con 0.25 mM de Cu^{2+} y Zn^{2+} , con sus respectivos controles negativo y positivo (Hidroxicloroquina 40 μM). Después de 12 horas de incubación se obtuvo la pastilla celular, fijándolo en glutaraldehído 2%

durante toda la noche. Finalizado la fijación los paquetes celulares se lavaron 3 veces con buffer de cacodilatos 0.01 M pH 7.4 de 5 minutos c/u, fijándolos en tetraóxido de osmio 2% por 30 minutos. Repitiendo los lavados con buffer de cacodilatos, aplicando nitrato de uranilo al 1 % por otros 30 minutos lavando posteriormente con 3 lavados de buffer de cacodilatos, inmediatamente se aplicaron tratamientos de acetona en porcentajes ascendentes (30%, 50%, 70% y 90%) de 5 minutos cada uno y 3 lavados de 5 minutos cada uno con acetona al 100% aplicando posteriormente un tratamiento de resina Epon/acetona 100% (1:1) durante toda la noche. Se evaporó la mezcla durante 3 horas a temperatura ambiente. Acabada la evaporación se aplicó resina Epon pura, permitiendo polimerizar la resina por 72 horas a 60°C. Una vez listos los bloques se realizaron cortes semifinos, tiñéndolos con azul de toluidina y montados en laminillas, así como se realizó las secciones requeridas para observarlas al microscopio electrónico de transmisión.

6.7. Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de ANOVA para una variable con test de Dunnett. Todos los resultados con $p < 0.05$ fueron considerados significativos utilizando el programa SPSS Versión 15.0 (I.B.M).

Capítulo VII.

RESULTADOS

7.1. El cobre disminuye de manera dosis dependiente la viabilidad celular

Se reconoce que el Cu^{2+} , debido a su naturaleza redox, es capaz de llevar a cabo reacciones que inducen la formación de ROS, las cuales inducen daño celular, y por consecuencia, la inducción de muerte celular por diversos mecanismos (Jomova and Valko, 2011). Es por eso que en este objetivo se buscó determinar si las concentraciones utilizadas en los tratamientos de Cu^{2+} eran capaces de disminuir la viabilidad celular y/o inducir la muerte celular.

Para esto se realizaron ensayos utilizando el reactivo calceína-AM, el cual esta conjugada con grupo acetoximetil (AM). Una vez que es transportado hacia el interior de las células vivas, esta molécula es procesada por las esterasas intracelulares, que liberan su grupo AM, provocando la emisión de fluorescencia.

Por otro lado, el ensayo de azul tripano se fundamenta que células viables son impermeables a este reactivo, en cambio las células muertas, absorben este colorante. Para esto, se cultivaron células tanto en placas de 96 pozos como en placas de 6 pozos, expuestas a diferentes concentraciones de Cu^{2+} (0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mM) durante 24 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos mediante el uso de calceína (**Figura 7**), muestran que la viabilidad celular disminuyó de acuerdo a la concentración de Cu^{2+} utilizada, observando un descenso significativo en las concentraciones de 0.5 y 0.75 mM. De manera similar, al realizar en ensayo de azul tripano (**Figura 8**), se observó que a partir de la concentración de 0.25 mM la viabilidad celular disminuía de manera significativa. Por lo cual existe una relación entre la concentración del Cu^{2+} con la sobrevivencia celular (Trejo-Solís et al., 2012).

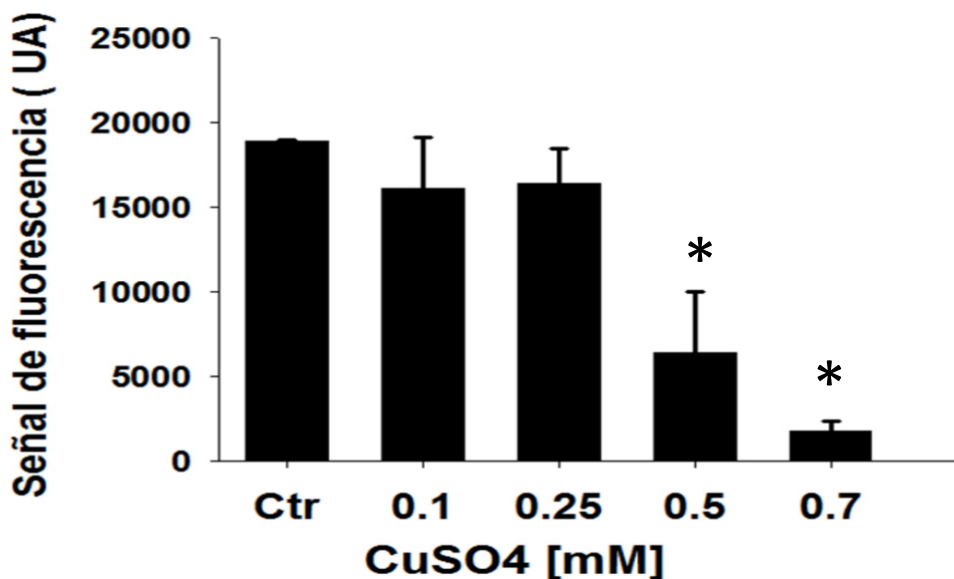


Figura 7. Ensayo de viabilidad celular con calceína. Por medio del uso de la calceína en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de CuSO_4 , durante 24 horas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. UA= Unidades arbitrarias. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

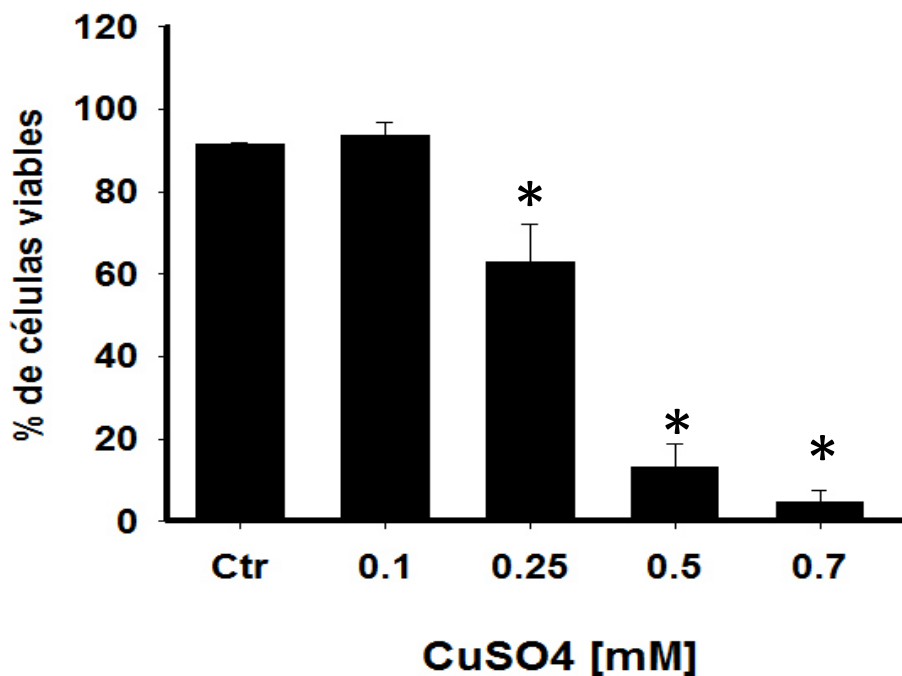


Figura 8. Ensayo de viabilidad celular por azul tripano. Por medio del uso de azul de tripano en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de CuSO₄, durante 24 horas. * Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

7.2. El cobre induce autofagia en la línea celular HEK-293

Una vez que se determinó el efecto del Cu²⁺ sobre la viabilidad celular en las células HEK-293, lo siguiente fue probar si este metal induce la activación del proceso catabólico de la macroautofagia (autofagia). Para lo cual, a dichas células se les expuso a diferentes concentraciones de este ión con el fin de observar si la activación de este proceso era dependiente de la concentración. Lo anterior se evaluó por la técnica de Western Blot utilizando anticuerpos específicos contra la proteína LC3, un marcador reconocido como un método estándar en el estudio de la autofagia (Mizushima and Yoshimori, 2007).

Durante el proceso de autofagia, a la proteína LC3 se le une un lípido (fosfatidiletanolamina). Tanto la forma nativa como la forma lipidada son detectadas a través de éste anticuerpo. Sin embargo, la forma nativa (LC3-I) posee un peso molecular de 16 kDA, mientras en su forma lipidada (LC3-II) es de 14 kDA. Debido a esta diferencia se puede observar un incremento en LC3-II cuando este proceso se encuentra activo (Kabeya et al., 2000; Mizushima and Yoshimori, 2007).

En este experimento se observó que conforme se incrementa la concentración de Cu^{2+} el nivel de LC3-II se incrementa, principalmente a partir de una concentración de 0.25 mM, como se observa en la **Figura 9**. Este resultado sugiere que la concentración del ión se encuentra relacionada con la posible activación de la autofagia en las células HEK-293 expuestas a este metal.

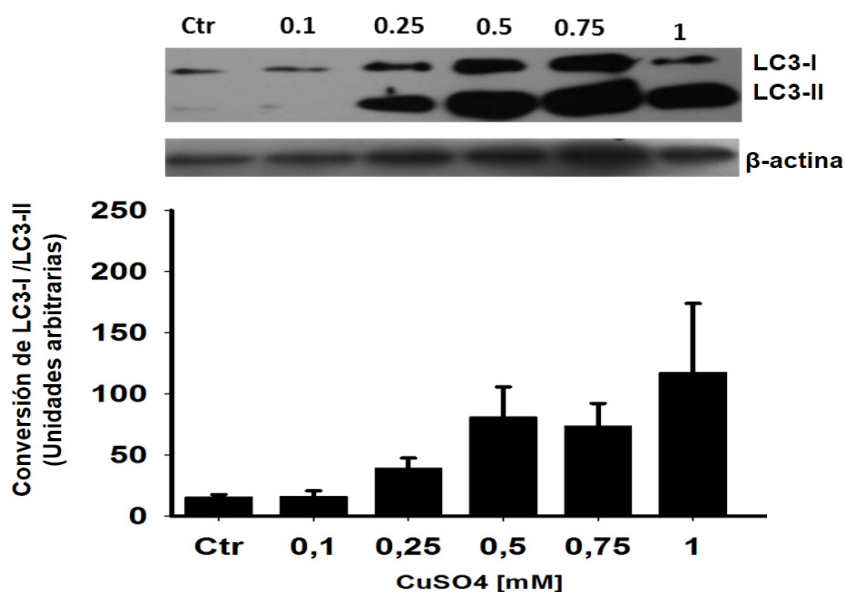


Figura 9. Activación de la autofagia por cobre. Western Blot para la detección de la conversión de LC3-I a LC3-II en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Cu^{2+} por 24 horas.

A pesar de que los resultados de WB indicaban que al aumentar la concentración de Cu^{2+} se incrementaba el nivel de LC3-II era necesario corroborar que el proceso de autofagia inducida por este metal, no era defectiva, ya que existen reportes que indican que el aumento de LC3-II, puede señalar un proceso de autofagia defectiva en la cual los autofagosomas no se fusionan con los lisosomas (Mizushima and Yoshimori, 2007). Es por esa razón que se realizó WB, para detectar los niveles de LC3-II, en células tratadas en presencia y ausencia de Cu^{2+} 0.25 mM e hidroxiclороquina (CQ) 40 μM . La CQ se utilizó debido a que es un fármaco inhibidor de la fusión autofagosoma-lisosoma, la cual es comúnmente utilizada para evaluar el flujo de la autofagia (Pasquier, 2016).

En la **Figura 10** se demuestra que el nivel de LC3-II en el control negativo es baja en comparación con el tratamiento con 0.25 mM de Cu^{2+} . En contraparte, tanto el grupo control como el grupo con 0.25 mM de Cu^{2+} incubados en presencia de CQ, muestran un incremento en comparación con sus contrapartes en ausencia de CQ. Lo anterior demuestra la inducción de una autofagia funcional activada por la presencia de este metal.

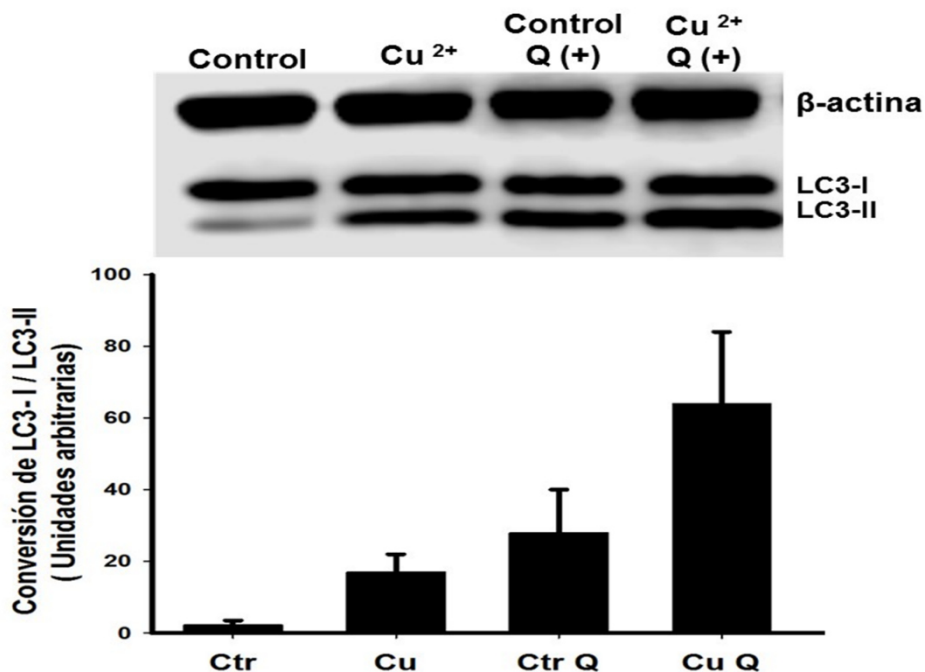


Figura 10. Detección de LC3-II en células tratadas con CQ. Western Blot para la detección de la conversión de LC3-I a LC3-II en células HEK-293 tratadas con Cu^{2+} 0.25 mM en presencia y ausencia de CQ 40 μM , con sus respectivos controles en presencia y ausencia de CQ 40 μM .

7.3 El Zn induce autofagia en la línea celular HEK-293

Una vez comprobado que el Cu^{2+} estimula a la activación del proceso de autofagia, se decidió determinar si otros metales de relevancia fisiológica (Zn^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{3+}) eran también capaces de inducirla.

En el caso de las células tratadas con Zn^{2+} (**Figura 11**) se observó los niveles de LC3-II poseían una tendencia a incrementarse conforme la concentración de este ión aumentaba, siendo el incremento más notorio a partir de una concentración de 0.25 mM.

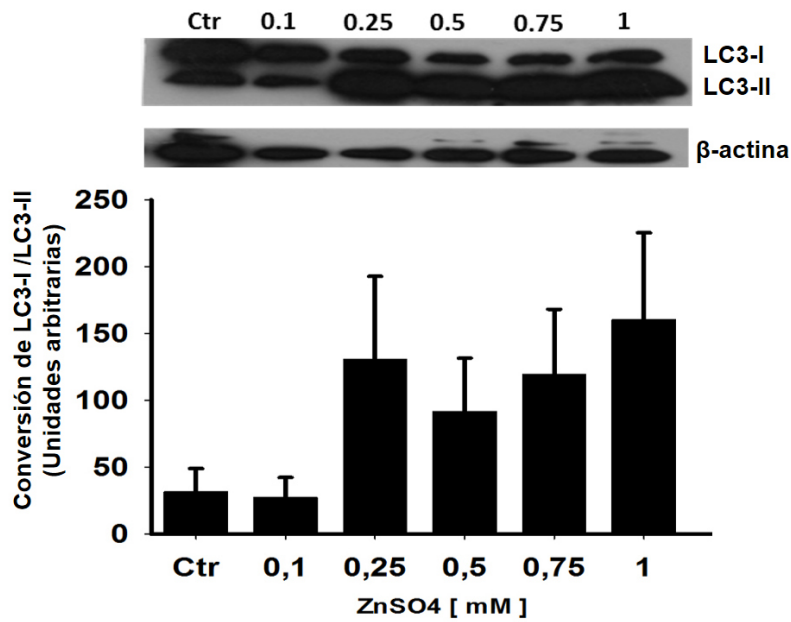


Figura 11. Análisis de la inducción de la autofagia en células tratadas con Zn^{2+} . Western Blot para la detección de la conversión de LC3-I a LC3-II en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Zn^{2+} por 24 horas.

En lo que respecta a las células tratadas con el ión Fe^{3+} (**Figura 12**) solo se observó un aumento en la conversión de LC3 en una concentración de 3 mM, la cual es mucho mayor a la requerida tanto por Zn^{2+} y Cu^{2+} .

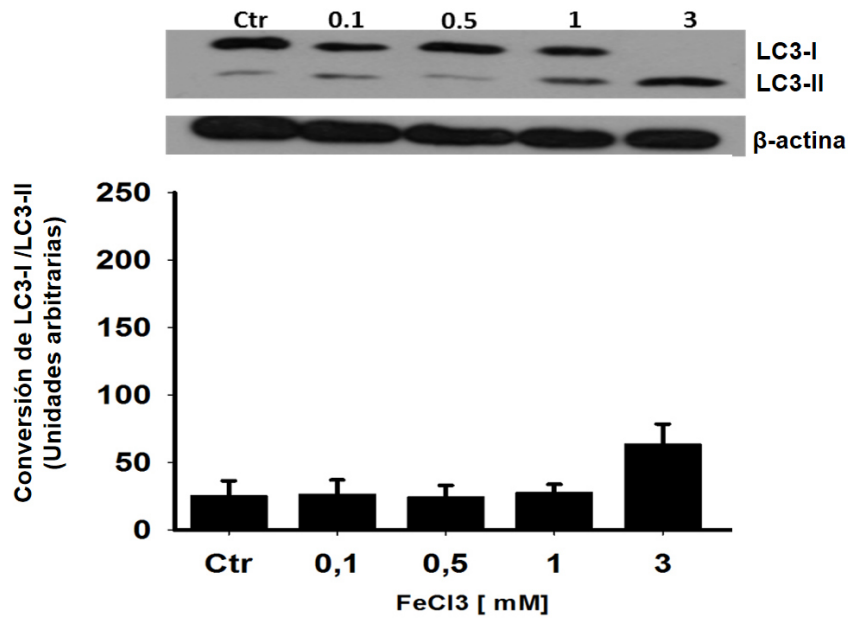


Figura 12. Análisis de la inducción de la autofagia en células tratadas con Fe³⁺. Western Blot para la detección de la conversión de LC3-I a LC3-II en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Fe³⁺ por 24 horas.

Las células tratadas con el ión Mn²⁺ no mostraron un cambio representativo en el nivel de LC3-II en ninguna de las concentraciones analizadas (**Figura 13**).

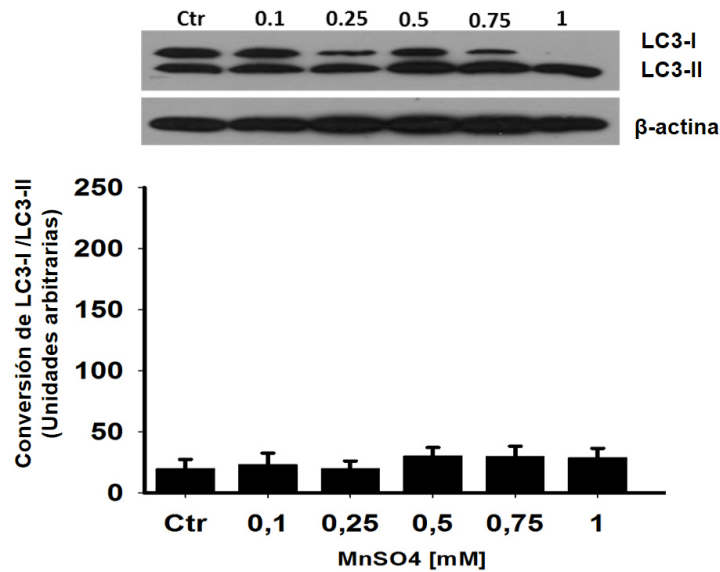


Figura 13. Análisis de la inducción de la autofagia en células tratadas con Mn²⁺. Western Blot para la detección de la conversión de LC3-I a LC3-II en células HEK-293 tratadas con diferentes concentraciones de Mn²⁺ por 24 horas.

7.4 El cobre y el zinc induce la formación de autofagosomas en la línea celular HEK-293

Una vez que se determinó la relación entre las concentraciones del Cu^{2+} y Zn^{2+} con respecto al incremento en los niveles de LC3-II, era necesario corroborar si el proceso de autofagia se estaba llevando a cabo. Esto se realizó por MET, para observar otro *estándar de oro* en el estudio de la autofagia, la presencia de estructuras de doble membrana denominadas autofagosomas, los cuales en su interior llevan el material a degradar (Kabeya et al., 2000; Klionsky et al., 2016).

Como se muestra en la Figura **14a** en la microfotografía de las células sin Cu^{2+} como control negativo, no se lograron detectar estructuras circulares de doble membrana, sólo se observa el núcleo con contenidos de electrodensidad variable, cerca del núcleo se logra apreciar una mitocondria fusiforme apreciándose las crestas mitocondriales. Estos se pueden observar como estructuras circulares de doble membrana con contenido electrodensos y electrolúcido en su interior, como las observadas en la **Figura 14b** tratadas con CQ. Para el caso del tratamiento con Cu^{2+} a 0.25 mM se observó un mayor número de estructuras circulares electrodensas, acumuladas muy cercas unas de las otras, observándose también otras similares de manera aislada como se muestra en la **Figura 14c**, lo cual señala que a esta concentración de Cu^{2+} , comienza a aparecer el proceso de autofagia.

Al ser el Zn^{2+} (**Figura 14d**) el único metal que sigue una tendencia similar al Cu^{2+} , también se logró observar suficientes estructuras circulares de doble

membrana con contenido electrodenso y electrolúcido en su interior, indicando que también este metal da paso a la formación de autofagosomas a la misma concentración de Cu^{2+} .

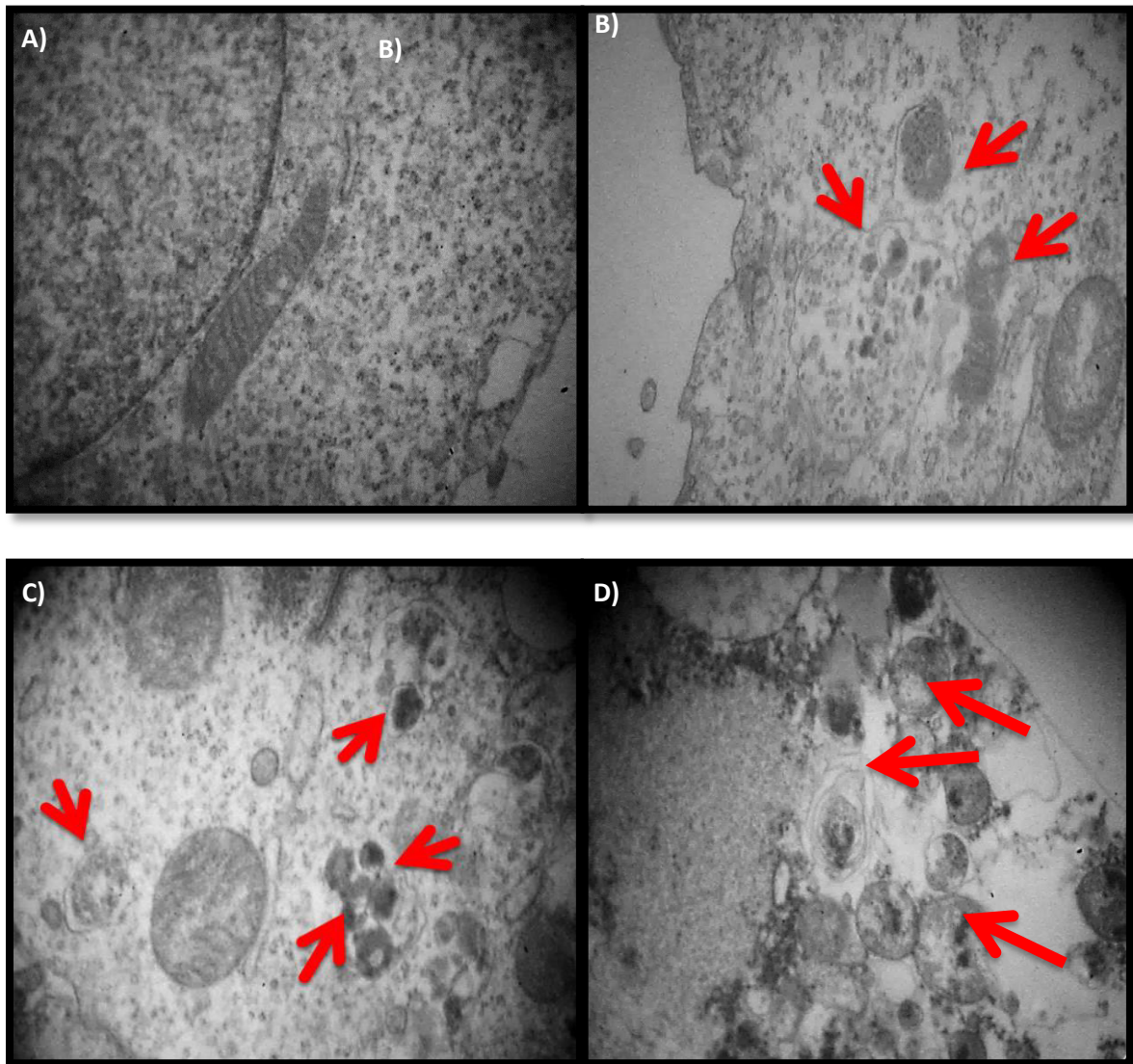


Figura 14. Inducción de la formación de autofagosomas por Cu^{2+} y Zn^{2+} . Microfotografías de autofagosomas (flechas rojas) en células HEK-293 durante su exposición por 12 horas a los tratamientos **a)** Control negativo, **b)** Control positivo hidroxiclороquina (CQ) 40 μM **c)** 0.25 mM de Cu^{2+} **d)** 0.25 mM de Zn^{2+}

Capítulo VIII.

DISCUSIÓN

La autofagia es un proceso catabólico propio entre los eucariotas inferiores a superiores, relacionado con la degradación de proteínas de vida media y orgánulos dañados y/o disfuncionales. Este proceso participa como una respuesta ante varias condiciones adversas y/o estresantes para la célula, entre las cuales se encuentra la privación de nutrientes, hipoxia, disminución de energía, entre otros procesos desfavorables, cumpliendo con la función de proporcionar nutrientes, sobre todo aminoácidos, para su utilización en varias vías de síntesis vitales para la célula (Lynch-Day et al., 2012).

La desregulación de este proceso está relacionada a diferentes tipos de patologías, por ejemplo cáncer, enfermedades cardíacas y neurodegenerativas, entre otras de importancia médica (Levine and Kroemer, 2008). Entre los procesos que se han considerado como factores que pueden activar dicho proceso están la presencia de diferentes metales bajo distintas situaciones (homeostasis alterada, sobre exposición o su utilización como terapias antitumorales) (Guo et al., 2010; Paris et al., 2009; Trejo-Solís et al., 2012; Zhang et al., 2016).

Entre estos metales se encuentra el cobre, el cual es de suma importancia como cofactor de diferentes enzimas que regulan diferentes procesos metabólicos relevantes para el organismo. Sin embargo, también posee la capacidad de realizar procesos citotóxicos para la célula. El desbalance del cobre se encuentra

relacionado con diferentes patologías de origen genético como la enfermedad de Wilson y Menkes, así como distintas neuropatías tales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, Prp y Huntington (Crisponi et al., 2010; Kozlowski et al., 2012). Por dicho motivo, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto del cobre en la inducción de la vía de la autofagia.

Una vez examinando los resultados alcanzados se pudo apreciar que el Cu^{2+} disminuye la viabilidad celular conforme incrementa su concentración, además indujo un aumento en la cantidad de autofagosomas y, se demostró la inducción del proceso de autofagia en las células HEK-293.

Los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular (**Figuras 7 y 8**) y Western Blot (**Figuras 9-10**) se pueden fundamentar en el hecho que el Cu^{2+} posee la capacidad de activar mecanismos que favorecen la activación de la vía de la autofagia por ejemplo: la formación de ROS (Gaetke and Chow, 2003; Jomova and Valko, 2011), participa en la respuesta de la célula ante la hipoxia por el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1, por sus siglas en inglés) (Feng et al., 2009; Martin et al., 2005), y una posible inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, por sus siglas en inglés) (Xiao et al., 2010). Dichos procesos podrían estar llevándose a cabo simultáneamente o de manera independiente en la célula.

Un hecho factible que pudiera desencadenar los diversos procesos mencionados, podría ser la alteración en el transporte del ion cobre en la cual se incrementa la concentración de este metal en el interior de la célula y ante la presencia de reductantes biológicos como el glutatión (GHS) o el ácido ascórbico,

llevando a cabo la conversión de Cu^{2+} a Cu^+ , el cual es capaz de inducir la formación de ROS (Gaetke and Chow, 2003), por medio de reacciones tipo Fenton-Weiss (Lloyd et al., 1997). Además, esta conversión puede realizarse por la proteína 20S del proteosoma, la cual en presencia de Cu^+ interactúa con este metal en la formación de ROS, inhibiendo al proteosoma (Xiao et al., 2010) por lo que resulta ser un factor relevante a la hora de que el ión cobre lleva a cabo la mimetización del proceso de hipoxia (Jaakkola et al., 2001; Maxwell et al., 1999).

La inactivación de ATG4 por ROS está reportada como uno de los mecanismos inductores de la vía de la autofagia, resultando ser necesaria para la conjugación de ATG8 (LC-3 en mamíferos) a fosfatidilinositol-3 (PI3) para inducir la formación del autofagosoma (Scherz-Shouval and Elazar, 2011; Scherz-Shouval et al., 2007; Scherz-Shouval et al., 2007). Simultáneamente, está reportado que ROS es capaz de inhibir a mTOR (Deeb et al., 2010), el cual es un regulador negativo en la vía de autofagia, por medio de la activación de AMPK en conjunto con la inactivación de AKT, induciendo así la muerte celular por la vía tanto de la autofagia como por apoptosis (Eom et al., 2010) o por medio de la vía JNK (Trejo-Solís et al., 2012).

Sin embargo, existen otros reportes en donde la inhibición de la autofagia agrava la muerte celular con compuestos de cobre, indicando que la autofagia es un mecanismo protector para contrarrestar muerte celular por apoptosis (Anandhan et al., 2015).

Coincidentemente, la vía de la autofagia puede ser inducida también a través de la proteína Ataxia telangiectasia mutada (ATM) la cual es activada por ROS, activando a su vez a TSC2 en el citoplasma por medio de AMPK (Alexander et al., 2010).

Otro probable mecanismo en donde la formación de ROS por el ion cobre puede intervenir es por la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) estimulada por el estrés del retículo endoplasmático rugoso. Se reconoce que las ROS inducen estrés del RER (Holtz et al., 2006) por medio de la oxidación de proteínas permitiendo su plegamiento incorrecto y acumulación, lo cual evita que sean degradadas de manera apropiada dando paso a la activación de la UPR (Jenner, 2003). Dichas proteínas oxidadas son marcadas por ubiquitinas para su posterior degradación en el proteosoma por medio del sistema de degradación por proteosoma relacionada con degradación asociada a ER (ERAD, por sus siglas en inglés) (Shringarpure et al., 2003). Al encontrarse saturado este sistema, la autofagia se encarga de degradar las proteínas mal plegadas (Kruse et al., 2006). Ante tal situación, la vía de la autofagia se puede ver potenciada por diferentes hechos relevantes en donde el cobre puede participar.

Primero el Cu^+ inhibe la actividad similar a quimiotripsina del proteosoma (Xiao et al., 2010), ante la incapacidad de este sistema de degradar proteínas dañadas por ROS o al verse saturado el proteosoma, se incrementa la respuesta del UPR, la cual actúa por medio de la activación de la chaperona GRP78/ BiP (Li et al., 2008), moléculas de señalización transmembranales de ER, IRE1-JNK (Ogata et al., 2006) o PERK/eIF2 α (Fujita et al., 2007). A la vez, se reconoce que

el estrés de RE, induce la desregulación de la vía de señalización AKT/TSC/mTOR (Qin et al., 2010).

Un mecanismo ajeno a los anteriores, es la activación del HIF-1 el cual es un factor de transcripción encargado de regular muchos genes de mamíferos durante la hipoxia (un factor relacionado en la activación de la autofagia) (Semenza, 1999). Dicho factor está conformado por HIF α 1 y HIF β 1 (Wang et al., 1995) siendo un paso limitante para la activación de HIF-1, la síntesis y acumulación de HIF α 1, el cual bajo condiciones normales de oxigenación es degradado por el UPS, gracias al proceso de hidroxilación de este llevado por diferentes HIF prolin hidroxilasas (PHDs) (Jaakkola et al., 2001). Una vez hidroxilado HIF α 1 es reconocido por la proteína Von Hippel-Lindau encargada de marcar HIF α 1 para su degradación por el proteosoma en el citosol (Maxwell et al., 1999). Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, el HIF α 1 no es degradado, permitiendo su acumulación y translocación al núcleo, donde se dimeriza con HIF β 1 e interactúa con sus respectivos cofactores para ensamblar el complejo de transcripción HIF-1 (Feng et al., 2009). El Cu²⁺ es capaz de estabilizar a HIF α 1 y de evitar la acción de las PHD's, lo cual permite se acumule en el núcleo y la expresión de HIF (Feng et al., 2009; Martin et al., 2005)

Está establecido que ROS, estabiliza a HIF α 1, permitiendo la formación del factor de transcripción HIF1 y que este active sus genes blancos (Jung et al., 2008). Una vez formado y activo HIF-1, este es capaz de activar a BNIP3 y NIX, los cuales regulan de manera positiva a la vía de la autofagia, compitiendo con Beclin por el sitio de unión a BCL-2, permitiendo que Beclin se una a PIK3C3

(Bellot et al., 2009; Zhang et al., 2008). Esto da paso a la posibilidad que bajo condiciones en donde el Cu^{2+} se encuentre dentro de la célula en exceso, se simulen las condiciones de hipoxia, como en el caso de otros metales que mimetizan la hipoxia, por ejemplo, cobalto y níquel (Maxwell and Salnikow, 2004), permitiendo con esto la estabilización de HIF α 1 en conjunto con ROS, y tomando en cuenta que existe la posibilidad de que el proteosoma se encuentre inhibido por el ion cobre, la degradación de HIF α 1 sería poca o nula, permitiendo su acumulación para la activación de HIF1 (Mazure and Pouyssegur, 2010).

Además, esta reportada la relación entre activación de los factores de transcripción de forkhead box O3 (FOXO3) y del factor nuclear derivado eritroide-2 (NRF2) por el estrés oxidativo inducido por ROS y la inducción de la autofagia. El primero estimula la transcripción de ATG8 (LC-3) y de BNIP3 (Jain et al., 2010; Mammucari et al., 2007), mientras el segundo induce la transcripción de p62, el cual regula de manera positiva la transcripción de NRF2, siendo estas tres actividades de transcripción reguladoras positivas de la vía de la autofagia (Komatsu et al., 2010).

Mientras al analizar los resultados de los tratamientos con Cu^{2+} en presencia y ausencia de CQ (**Figuras 9 y 10**) como sus respectivos controles bajo las mismas condiciones en las células HEK-293, los resultados concuerdan con lo reportado por Musiwaro *et al* (Musiwaro et al., 2013) cuyo grupo de investigación observó un incremento en la señal de LC3-II en células HEK-293 al estar expuestas a CQ, bajo condiciones normales de cultivo, a comparación de otros fármacos. De igual manera bajo condiciones de hambruna, el incremento más

representativo de LC3-II fue en células expuestas CQ, por lo cual se puede mencionar que, bajo condiciones de estrés para la célula, la administración de este fármaco incrementara la señal de LC3-II y la acumulación de autofagosomas.

Con respecto a los resultados obtenidos con Zn^{2+} (**Figura 11 y 14d**) estos se podrían encontrar fundamentos a través de la interacción del Zn^{2+} , con la NADPH oxidasa, y de ROS con la metaloteína 3 (MT3). Un posible mecanismo inducido por Zn^{2+} es a través de la cascada de activación Zn^{2+} / Proteína quinasa C (PKC) / NADPH oxidasas (Noh and Koh, 2000). En el cual la sobre exposición a Zn^{2+} favorece la activación de la PKC, una vez activada esta se encarga de que se lleve a cabo la translocación de las sub-unidades citosólicas p47^{PHOX} y p67^{PHOX} a la membrana y así iniciar la producción de ROS, el cual hace que se produzcan cambios conformacionales debido al estado redox de la MT3 (oxidándola), haciendo que esta libere Zn^{2+} intracelular (Maret and Vallee, 1998), el cual favorece a la formación de vacuolas autofagicas (AVs) acumulándose dentro de ellas (Lee et al., 2009). También se ha demostrado que el incremento de Zn^{2+} intracelular y de ROS, hace que se active la ERK, el cual es parte de la cascada de activación de la vía de la autofagia (Hwang et al., 2010).

Existe la evidencia que fuentes de externas de ROS (UV, toxinas, etc.) (Finkel and Holbrook, 2000) favorecen la liberación de Zn^{2+} de las MT3 (Maret and Vallee, 1998), haciendo que este sea transportado por canales de Ca^{+} uniport hacia la mitocondria (principal fuente de ROS intracelular) (Malaiyandi et al., 2005; Sensi et al., 2003), en donde este ion inhibe la cadena de transporte de

electrones, reduciendo el potencial de membrana de la mitocondria, con una subsecuente producción de ROS (Dineley et al., 2005; Medvedeva et al., 2009).

El incremento en la concentración de Zn^{2+} intracelular, como de ROS, hace que se incremente de manera desmedida la autofagia con la acumulación de este metal dentro de los lisosomas, lo cual hace que se induzca la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP), haciendo que el contenido de los lisosomas sea liberado al citosol, induciendo con esto la degradación de componentes celulares y que se activen señales de muerte celular como el dominio BH3 interactivo antagonista de muerte (BID) (Boya and Kroemer, 2008). Por lo cual, se puede pensar que a pesar de que la vía de la autofagia es un mecanismo de sobrevivencia celular, este no es capaz de rescatar a las células expuestas a Zn^{2+} debido a la inducción de la LMP por éste ión (Lee and Koh, 2010).

Sin embargo, también hay que tomar en cuenta que la producción de ROS mediada por Zn^{2+} , puede activar otros mecanismos relacionados con la vía de la autofagia, como el UPR, la inactivación de ATG4, y otros mencionados anteriormente en el caso del Cu^{2+} (Scherz-Shouval and Elazar, 2011).

En contraste el Fe^{3+} y Mn^{2+} , (**Figuras 12 y 13**) muestran resultados opuestos a Cu^{2+} y Zn^{2+} . Sin embargo, existe evidencia donde tanto la administración directa como la utilización de nano partículas de Fe^{2+} , inducen a la vía de la autofagia, tanto en modelos *in vivo* (Chen et al., 2013) como *in vitro* (Khan et al., 2012). También existe evidencia que demuestra que la exposición a nanopartículas de Mn induce la vía de la autofagia (Ngwa et al., 2011), al igual que

bajo la administración directa en un modelo animal de saturnismo inducido por Mn^{2+} (Zhang et al., 2013). Dicho estudio demuestra que el Mn^{2+} es un inductor de la vía de la autofagia por medio de la inhibición de mTOR y la proteína quinasa S6 ribosomal p70 (p70S6K) (Jung et al., 2010; Saiki et al., 2011) en periodos cortos (máximo 12 horas); sin embargo, durante largos periodos (máximo 28 días), la vía de la autofagia es inhibida por la activación de mTOR/ p70s6K (Zhang et al., 2013).

Esto hace considerar que bajo la utilización de un modelo celular utilizando Mn^{2+} , quizá la vía de la autofagia se vea activada en periodos muy cortos (minutos o por unas pocas horas), inhibiéndose en periodos de tiempo más largos (quizá más de 12 horas), lo cual podría justificar lo observado en los resultados obtenidos en donde se aprecia un incremento en la muerte celular, como se pudo apreciar antes de realizar las extracciones de proteína total, conforme se incrementa la concentración de Mn^{2+} , hace considerar que la actividad de mTOR/ p70s6K se vea recuperada durante la exposición a Mn^{2+} induciendo la muerte celular por medio de la inhibición de la vía de la autofagia (Wang et al., 2013). Sin embargo, se deberán de hacer más experimentos para evaluar esto.

En conjunto, los resultados sugieren que las células HEK-293 utilizan, al igual que otras células, el mecanismo de autofagia como vía para evitar los efectos citotóxicos inducidos por la exposición a diferentes iones metálicos; sin embargo, esta investigación se enfocó en el Cu^{2+} por su relevancia fisiológica, cuya homeostasis se encuentra alterada en diferentes patologías de importancia.

No existen reportes previos enfocados al estudio de la autofagia en células HEK-293 expuestas a iones metálicos.

Será interesante estudiar a futuro, otras vías en donde los metales intervengan, así como realizar un estudio más profundo de los mecanismos implicados en los efectos sobre esta línea celular observados en este estudio.

Capítulo IX.

CONCLUSIONES

- El cobre induce un incremento en LC3-II en células HEK-293.
- El cobre disminuye la viabilidad celular en células HEK-293, de manera dependiente de la dosis, lo cual sugiere una correlación entre la concentración de cobre con la disminución de viabilidad celular.
- El zinc induce un incremento en la autofagia en células HEK-293.
- El manganeso y el hierro no inducen el proceso de autofagia.
- El cobre y el zinc inducen la formación de autofagosomas lo cual confirma, junto con el incremento de LC3-II, que estos metales inducen la activación de la autofagia.

Capítulo X.

REFERENCIAS

Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., and Person, M.D. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 4153–4158.

Anandhan, A., Rodriguez-Rocha, H., Bohovych, I., Griggs, A.M., Zavala-Flores, L., Reyes-Reyes, E.M., Seravalli, J., Stanciu, L.A., Lee, J., and Rochet, J.-C. (2015). Overexpression of alpha-synuclein at non-toxic levels increases dopaminergic cell death induced by copper exposure via modulation of protein degradation pathways. *Neurobiol. Dis.* *81*, 76–92.

Andrews, N.C. (2002). Metal transporters and disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *6*, 181–186.

Arnhold, S., Post, C., Glüer, S., Hoopmann, M., Wensch, S., Volpers, C., and Addicks, K. (2008). Neuronal characteristics of amniotic fluid derived cells after adenoviral transformation. *Cell Biol. Int.* *32*, 1559–1566.

Arredondo, M., Muñoz, P., Mura, C.V., and Núñez, M.T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *284*, C1525–C1530.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *182*, 685–701.

Aydın, A., Orhan, H., Sayal, A., Özata, M., Şahin, G., and Işimer, A. (2001). Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin. Biochem.* *34*, 65–70.

Backer, J.M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* *410*, 1–17.

Bankier, A. (1995). Menkes disease. *J. Med. Genet.* *32*, 213.

Barth, S., Glick, D., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: assays and artifacts. *J. Pathol.* *221*, 117–124.

Behari, M., and Pardasani, V. (2010). Genetics of Wilsons disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* *16*, 639–644.

- Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., and Mazure, N.M. (2009). Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 2570–2581.
- Biederer, T., and Scheiffele, P. (2007). Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. *Nat. Protoc.* *2*, 670–676.
- Bleackley, M.R., and MacGillivray, R.T. (2011). Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *Biometals* *24*, 785–809.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* *27*, 6434–6451.
- Brem, S.S., Zagzag, D., Tsanaclis, Am., Gately, S., Elkouby, M.P., and Brien, S.E. (1990). Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am. J. Pathol.* *137*, 1121.
- Bremner, I. (1980). Absorption, transport and distribution of copper (Amsterdam).
- Campbell, S.A., Lin, J., Dobrikova, E.Y., and Gromeier, M. (2005). Genetic determinants of cell type-specific poliovirus propagation in HEK 293 cells. *J. Virol.* *79*, 6281–6290.
- Chanarin, I. (1999). Nutritional aspects of hematological disorders. *Mod. Nutr. Health Dis. Phila. PA Lippincott Williams Wilkins* 214–287.
- Chen, G., Jing, C., Liu, P., Ruan, D., and Wang, L. (2013). Induction of autophagic cell death in the rat brain caused by iron. *Am. J. Med. Sci.* *345*, 369–374.
- Crisponi, G., Nurchi, V.M., Fanni, D., Gerosa, C., Nemolato, S., and Faa, G. (2010). Copper-related diseases: from chemistry to molecular pathology. *Coord. Chem. Rev.* *254*, 876–889.
- Cunningham, J., Leffell, M., Mearkle, P., and Harmatz, P. (1995). Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism* *44*, 996–999.
- Cusick, J.K., Mustian, A., Goldberg, K., and Reyland, M.E. (2010). RELT induces cellular death in HEK 293 epithelial cells. *Cell. Immunol.* *261*, 1–8.
- Davis, C.D., and Greger, J.L. (1992). Longitudinal changes of manganese-dependent superoxide dismutase and other indexes of manganese and iron status in women. *Am. J. Clin. Nutr.* *55*, 747–752.
- Deeb, D., Gao, X., Jiang, H., Janic, B., Arbab, A.S., Rojanasakul, Y., Dulchavsky, S.A., and Gautam, S.C. (2010). Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth

and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 79, 350–360.

Deter, R.L., and De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J. Cell Biol.* 33, 437–449.

Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P., and Marsden, C.D. (1991). Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114, 1953–1975.

Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4, 851–865.

Dineley, K.E., Richards, L.L., Votyakova, T.V., and Reynolds, I.J. (2005). Zinc causes loss of membrane potential and elevates reactive oxygen species in rat brain mitochondria. *Mitochondrion* 5, 55–65.

Dingwall, C. (2007). A copper-binding site in the cytoplasmic domain of BACE1 identifies a possible link to metal homeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 571–573.

Eom, J.-M., Seo, M.-J., Baek, J.-Y., Chu, H., Han, S.H., Min, T.S., Cho, C., and Yun, C.-H. (2010). Alpha-eleostearic acid induces autophagy-dependent cell death through targeting AKT/mTOR and ERK1/2 signal together with the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 903–908.

Eskelinen, E.-L. (2008). To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells. *Autophagy* 4, 257–260.

Feng, W., Ye, F., Xue, W., Zhou, Z., and Kang, Y.J. (2009). Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol. Pharmacol.* 75, 174–182.

Ferenci, P., Caca, K., Loudianos, G., Mieli-Vergani, G., Tanner, S., Sternlieb, I., Schilsky, M., Cox, D., and Berr, F. (2003). Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease¹. *Liver Int.* 23, 139–142.

Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

Flores, L., Rodela, S., Abian, J., Clària, J., and Esmatjes, E. (2004). F₂ isoprostane is already increased at the onset of type 1 diabetes mellitus: effect of glycemic control. *Metabolism* 53, 1118–1120.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* *1*, 27–30.

Fox, J.H., Kama, J.A., Lieberman, G., Chopra, R., Dorsey, K., Chopra, V., Volitakis, I., Cherny, R.A., Bush, A.I., and Hersch, S. (2007). Mechanisms of copper ion mediated Huntington's disease progression. *PLoS One* *2*, e334.

Fraga, C.G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol. Aspects Med.* *26*, 235–244.

Frieden, E. (1972). The chemical elements of life. *Sci. Am.* *227*, 52–60.

Frieden, E. (1974). The Evolution of Metals as Essential Elements [with special reference to iron and copper]. In *Protein-Metal Interactions*, (Springer), pp. 1–31.

Frieden, E. (1985). New perspectives on the essential trace elements. *J Chem Educ* *62*, 917.

Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., and Momoi, T. (2007). Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD (I) and autophagy/lysosome ERAD (II). *Hum. Mol. Genet.* *16*, 618–629.

Gaetke, L.M., and Chow, C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* *189*, 147–163.

Geisse, S., and Fux, C. (2009). Recombinant protein production by transient gene transfer into Mammalian cells. *Methods Enzymol.* *463*, 223–238.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* *221*, 3–12.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* *36*, 59–72.

Graham, R.K., Deng, Y., Slow, E.J., Haigh, B., Bissada, N., Lu, G., Pearson, J., Shehadeh, J., Bertram, L., and Murphy, Z. (2006). Cleavage at the caspase-6 site is required for neuronal dysfunction and degeneration due to mutant huntingtin. *Cell* *125*, 1179–1191.

Green, D.R., and Levine, B. (2014). To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. *Cell* *157*, 65–75.

Greger, J.L., and Snedeker, S.M. (1980). Effect of dietary protein and phosphorus levels on the utilization of zinc, copper and manganese by adult males. *J. Nutr.* *110*, 2243–2253.

Guo, W., Ye, S., Cao, N., Huang, J., Gao, J., and Chen, Q. (2010). ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper (II) complex. *Exp. Toxicol. Pathol.* *62*, 577–582.

Gupte, A., and Mumper, R.J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* *35*, 32–46.

Haidari, M., Javadi, E., Kadkhodae, M., and Sanati, A. (2001). Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. *Clin. Chem.* *47*, 1234–1240.

Han, O., and Wessling-Resnick, M. (2002). Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *282*, G527–G533.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., and Okano, H. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* *441*, 885–889.

He, B., and Soderlund, D.M. (2010). Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na^v1.7 sodium channels. *Neurosci. Lett.* *469*, 268–272.

Holtz, W.A., Turetzky, J.M., Jong, Y.-J.I., and O'Malley, K.L. (2006). Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J. Neurochem.* *99*, 54–69.

Hwang, J.J., Kim, H.N., Kim, J., Cho, D.-H., Kim, M.J., Kim, Y.-S., Kim, Y., Park, S.-J., and Koh, J.-Y. (2010). Zinc (II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line. *Biometals* *23*, 997–1013.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.-M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., and Schofield, C.J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* *292*, 468–472.

Jahan, N., Wimmer, E., and Mueller, S. (2011). A host-specific, temperature-sensitive translation defect determines the attenuation phenotype of a human rhinovirus/poliovirus chimera, PV1 (RIPO). *J. Virol.* *85*, 7225–7235.

Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., and Johansen, T. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* *285*, 22576–22591.

- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* *53*, S26–S38.
- Jomova, K., and Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* *283*, 65–87.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* *584*, 1287–1295.
- Jung, S.-N., Yang, W.K., Kim, J., Kim, H.S., Kim, E.J., Yun, H., Park, H., Kim, S.S., Choe, W., and Kang, I. (2008). Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* *29*, 713–721.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* *19*, 5720–5728.
- Kägi, J.H., and Vallee, B.L. (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* *235*, 3460–3465.
- Kaler, S.G. (1998). Metabolic and molecular bases of Menkes disease and occipital horn syndrome. *Pediatr. Dev. Pathol.* *1*, 85–98.
- Kang, Y.J., Wu, H., and Saari, J.T. (2000). Alterations in hypertrophic gene expression by dietary copper restriction in mouse heart. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *223*, 282–287.
- Kavsan, V.M., Iershov, A.V., and Balynska, O.V. (2011). Immortalized cells and one oncogene in malignant transformation: old insights on new explanation. *BMC Cell Biol.* *12*, 1.
- Khan, M.I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S.A.H., Chauhan, L.K.S., and Ahmad, I. (2012). Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* *33*, 1477–1488.
- Kienlen, J. (1976). [Deficiencies in trace elements during parenteral alimentation]. In *Annales de L'anesthesiologie Francaise*, pp. 1019–1034.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch. Biochem. Biophys.* *462*, 245–253.
- Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* *34*, 259–269.

Klionsky, D.J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 931–937.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., and Adeli, K. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* *12*, 1–222.

Kodama, H., and Fujisawa, C. (2009). Copper metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment. *Metallomics* *1*, 42–52.

Kodama, H., Murata, Y., and Kobayashi, M. (1999). Clinical manifestations and treatment of Menkes disease and its variants. *Pediatr. Int.* *41*, 423–429.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., and Uchiyama, Y. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* *169*, 425–434.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., and Murata, S. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* *131*, 1149–1163.

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., and Tong, K.I. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 213–223.

Kozlowski, H., Luczkowski, M., Remelli, M., and Valensin, D. (2012). Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.* *256*, 2129–2141.

Kruse, K.B., Brodsky, J.L., and McCracken, A.A. (2006). Characterization of an ERAD gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human α -1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ. *Mol. Biol. Cell* *17*, 203–212.

La Fontaine, S., and Mercer, J.F. (2007). Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* *463*, 149–167.

Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Johnson, R.S., and Sage, E.H. (1994). SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis. *J. Cell Biol.* *125*, 929–943.

Lee, S.-J., and Koh, J.-Y. (2010). Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Mol. Brain* 3, 1–9.

Lee, J., Peña, M.M.O., Nose, Y., and Thiele, D.J. (2002). Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* 277, 4380–4387.

Lee, S.-J., Cho, K.S., and Koh, J.-Y. (2009). Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc. *Glia* 57, 1351–1361.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27–42.

Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D.R., and Lee, A.S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 15, 1460–1471.

Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8, 688–698.

Lim, C.M., Cater, M.A., Mercer, J.F., and La Fontaine, S. (2006). Copper-dependent interaction of glutaredoxin with the N termini of the copper-ATPases (ATP7A and ATP7B) defective in Menkes and Wilson diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 428–436.

Lin, Y.-C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., and Drmanac, R. (2014). Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat. Commun.* 5.

Linder, M.C., and Goode, C.A. (1991). Biochemistry of Copper. *Biochemistry of the Elements* (Frieden, E., Ed.) (Plenum Press, New York).

Linder, M.C., and Hazegh-Azam, M. (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 797S–811S.

Llanos, R.M., and Mercer, J.F. (2002). The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders. *DNA Cell Biol.* 21, 259–270.

Lloyd, R.V., Hanna, P.M., and Mason, R.P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 885–888.

Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., and Dmitriev, O.Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol. Rev.* 87, 1011–1046.

Lynch-Day, M.A., Mao, K., Wang, K., Zhao, M., and Klionsky, D.J. (2012). The role of autophagy in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a009357.

Madhusudana, S.N., Sundaramoorthy, S., and Ullas, P.T. (2010). Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *Int. J. Infect. Dis.* 14, e1067–e1071.

Madsen, E., and Gitlin, J.D. (2007). Copper and iron disorders of the brain. *Annu Rev Neurosci* 30, 317–337.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741–752.

Malaiyandi, L.M., Vergun, O., Dineley, K.E., and Reynolds, I.J. (2005). Direct visualization of mitochondrial zinc accumulation reveals uniporter-dependent and-independent transport mechanisms. *J. Neurochem.* 93, 1242–1250.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., and Zhao, J. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 6, 458–471.

Maret, W., and Vallee, B.L. (1998). Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3478–3482.

Martin, F., Linden, T., Katschinski, D.M., Oehme, F., Flamme, I., Mukhopadhyay, C.K., Eckhardt, K., Tröger, J., Barth, S., and Camenisch, G. (2005). Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* 105, 4613–4619.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., and Gelinas, C. (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075.

Maxwell, P., and Salnikow, K. (2004). HIF-1, an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol. Ther.* 3, 29–35.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.-W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., and Ratcliffe, P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399, 271–275.

Mazure, N.M., and Pouyssegur, J. (2010). Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 177–180.

- Medvedeva, Y.V., Lin, B., Shuttleworth, C.W., and Weiss, J.H. (2009). Intracellular Zn²⁺ accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization, and cell death in an acute slice oxygen–glucose deprivation model of ischemia. *J. Neurosci.* *29*, 1105–1114.
- Mercer, J.F. (1998). Menkes syndrome and animal models. *Am. J. Clin. Nutr.* *67*, 1022S–1028S.
- Mercer, J.F. (2001). The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol. Med.* *7*, 64–69.
- Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev.* *21*, 2861–2873.
- Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* *3*, 542–545.
- Musiwaro, P., Smith, M., Manifava, M., Walker, S.A., and Ktistakis, N.T. (2013). Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy* *9*, 1407–1417.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458–467.
- Ngwa, H.A., Kanthasamy, A., Gu, Y., Fang, N., Anantharam, V., and Kanthasamy, A.G. (2011). Manganese nanoparticle activates mitochondrial dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *256*, 227–240.
- Nielsen, F.H. (1990). New essential trace elements for the life sciences. *Biol. Trace Elem. Res.* *26*, 599–611.
- Noh, K.-M., and Koh, J.-Y. (2000). Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, RC111-RC111.
- Nyasae, L., Bustos, R., Braiterman, L., Eipper, B., and Hubbard, A. (2007). Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *292*, G1181–G1194.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., and Yoshinaga, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 9220–9231.
- Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* *24*, 9–23.

- Paris, I., Perez-Pastene, C., Couve, E., Caviedes, P., LeDoux, S., and Segura-Aguilar, J. (2009). Copper· dopamine complex induces mitochondrial autophagy preceding caspase-independent apoptotic cell death. *J. Biol. Chem.* *284*, 13306–13315.
- Pasquier, B. (2016). Autophagy inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 985–1001.
- Peña, M.M., Lee, J., and Thiele, D.J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* *129*, 1251–1260.
- Qin, L., Wang, Z., Tao, L., and Wang, Y. (2010). ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy* *6*, 239–247.
- Rabin, O., Hegedus, L., Bourre, J.-M., and Smith, Q.R. (1993). Rapid Brain Uptake of Manganese (II) Across the Blood-Brain Barrier. *J. Neurochem.* *61*, 509–517.
- Ralston, S.H. (2008). Pathogenesis of Paget's disease of bone. *Bone* *43*, 819–825.
- Rana, A., Gnaneswari, D., Bansal, S., and Kundu, B. (2009). Prion metal interaction: Is prion pathogenesis a cause or a consequence of metal imbalance? *Chem. Biol. Interact.* *181*, 282–291.
- Rasia, R.M., Bertocini, C.W., Marsh, D., Hoyer, W., Cherny, D., Zweckstetter, M., Griesinger, C., Jovin, T.M., and Fernández, C.O. (2005). Structural characterization of copper (II) binding to α -synuclein: Insights into the bioinorganic chemistry of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 4294–4299.
- Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Panayiotidis, M.I., and Franco, R. (2011). DNA damage and autophagy. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* *711*, 158–166.
- Roelofsen, H., Wolters, H., Van Luyn, M.J., Miura, N., Kuipers, F., and Vonk, R.J. (2000). Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology* *119*, 782–793.
- Rubinsztein, D.C. (2006). The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature* *443*, 780–786.
- Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., and Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 304–312.
- Saiki, S., Sasazawa, Y., Imamichi, Y., Kawajiri, S., Fujimaki, T., Tanida, I., Kobayashi, H., Sato, F., Sato, S., and Ishikawa, K.-I. (2011). Caffeine induces apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR/p70S6K inhibition. *Autophagy* *7*, 176–187.

Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 30–38.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., and Elazar, Z. (2007). Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. *Autophagy* *3*, 371–373.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* *26*, 1749–1760.

Scott, K.C., and Turnlund, J.R. (1994). Compartmental model of copper metabolism in adult men. *J. Nutr. Biochem.* *5*, 342–350.

Semenza, G.L. (1999). Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *15*, 551–578.

Sensi, S.L., Ton-That, D., Sullivan, P.G., Jonas, E.A., Gee, K.R., Kaczmarek, L.K., and Weiss, J.H. (2003). Modulation of mitochondrial function by endogenous Zn²⁺ pools. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 6157–6162.

Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* *16*, 869–871.

Shi, W., Zhan, C., Ignatov, A., Manjasetty, B.A., Marinkovic, N., Sullivan, M., Huang, R., and Chance, M.R. (2005). Metalloproteomics: high-throughput structural and functional annotation of proteins in structural genomics. *Structure* *13*, 1473–1486.

Shringarpure, R., Grune, T., Mehlhase, J., and Davies, K.J. (2003). Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* *278*, 311–318.

Simonsen, A., and Tooze, S.A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* *186*, 773–782.

Stepanenko, A.A., and Dmitrenko, V.V. (2015). HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* *569*, 182–190.

Stern, B.R., Solioz, M., Krewski, D., Aggett, P., Aw, T.-C., Baker, S., Crump, K., Dourson, M., Haber, L., and Hertzberg, R. (2007). Copper and human health: biochemistry, genetics, and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* *10*, 157–222.

Stohs, S.J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* *18*, 321–336.

- Sturniolo, G.C., Mestriner, C., Irato, P., Albergoni, V., Longo, G., and D'Inca, R. (1999). Zinc therapy increases duodenal concentrations of metallothionein and iron in Wilson's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* *94*, 334–338.
- Su, G., Zhao, Y., Wei, J., Han, J., Chen, L., Xiao, Z., Chen, B., and Dai, J. (2013). The effect of forced growth of cells into 3D spheres using low attachment surfaces on the acquisition of stemness properties. *Biomaterials* *34*, 3215–3222.
- Tapiero, H., and Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* *57*, 399–411.
- Tapiero, H., Townsend, D.M., and Tew, K.D. (2003). Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomed. Pharmacother.* *57*, 386–398.
- Thomas, P., and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *51*, 187–200.
- Torban, E., and Goodyer, P.R. (1998). Effects of PAX2 expression in a human fetal kidney (HEK293) cell line. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* *1401*, 53–62.
- Trejo-Solís, C., Jimenez-Farfan, D., Rodriguez-Enriquez, S., Fernandez-Valverde, F., Cruz-Salgado, A., Ruiz-Azuara, L., and Sotelo, J. (2012). Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* *12*, 1.
- Tümer, Z., and Horn, N. (1997). Menkes disease: recent advances and new aspects. *J. Med. Genet.* *34*, 265.
- Turnlund, J.R., Keyes, W.R., Anderson, H.L., and Acord, L.L. (1989). Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *Am. J. Clin. Nutr.* *49*, 870–878.
- Uriu-Adams, J.Y., and Keen, C.L. (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Mol. Aspects Med.* *26*, 268–298.
- Vetter, I., and Lewis, R.J. (2010). Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochem. Pharmacol.* *79*, 908–920.
- Wang, G.L., Jiang, B.-H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 5510–5514.
- Wang, Y., Hu, Z., Liu, Z., Chen, R., Peng, H., Guo, J., Chen, X., and Zhang, H. (2013). MTOR inhibition attenuates DNA damage and apoptosis through autophagy-mediated suppression of CREB1. *Autophagy* *9*, 2069–2086.

Wapnir, R.A. (1998). Copper absorption and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 1054S–1060S.

Westergard, L., Christensen, H.M., and Harris, D.A. (2007). The cellular prion protein (PrP C): its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Basis Dis.* 1772, 629–644.

Wong, B.-S., Chen, S.G., Colucci, M., Xie, Z., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P., Sy, M.-S., and Brown, D.R. (2001). Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *J. Neurochem.* 78, 1400–1408.

Xiao, Y., Chen, D., Zhang, X., Cui, Q., Fan, Y., Bi, C., and Dou, Q.P. (2010). Molecular study on copper-mediated tumor proteasome inhibition and cell death. *Int. J. Oncol.* 37, 81.

Yim, M.B., Yim, H.-S., Lee, C., Kang, S.-O., and Chock, P.B. (2001). Protein Glycation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 48–53.

Yue, Z., Friedman, L., Komatsu, M., and Tanaka, K. (2009). The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 1793, 1496–1507.

Yung, L.Y., Lam, W.S., Ho, M.K., Hu, Y., Ip, F.C., Pang, H., Chin, A.C., Harley, C.B., Ip, N.Y., and Wong, Y.H. (2012). Astragaloside IV and cycloastragenol stimulate the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in multiple cell types. *Planta Med.* 78, 115–121.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283, 10892–10903.

Zhang, J., Cao, R., Cai, T., Aschner, M., Zhao, F., Yao, T., Chen, Y., Cao, Z., Luo, W., and Chen, J. (2013). The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neurotox. Res.* 24, 478–490.

Zhang, Z., Miah, M., Culbreth, M., and Aschner, M. (2016). Autophagy in Neurodegenerative Diseases and Metal Neurotoxicity. *Neurochem. Res.* 41, 409–422.

Zhong, W., Zhu, H., Sheng, F., Tian, Y., Zhou, J., Chen, Y., Li, S., and Lin, J. (2014). Activation of the MAPK11/12/13/14 (p38 MAPK) pathway regulates the transcription of autophagy genes in response to oxidative stress induced by a novel copper complex in HeLa cells. *Autophagy* 10, 1285–1300.