



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CENTRO DE QUÍMICA DEL INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
ÁREA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Efecto de Cd, Hg y Zn en el envejecimiento cronológico de  
*Schizosaccharomces pombe***

Tesis presentada para obtener el título de:  
Maestría en Ciencias Químicas en el  
Área de Bioquímica y Biología Molecular

*Presenta*

L.F. Guadalupe Rojas Sánchez

*Directora de tesis*

D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta  
Centro de Química- Instituto de Ciencias

Puebla, Puebla, septiembre 2017



**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Bertha Alicia León Chávez, Dra. Nidia Pazos Salazar, y la Dra. Sandra Reyes Carmona, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Efecto del Cd, Hg y Zn en el envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*”**, que presenta la alumna **L.F. Guadalupe Rojas Sánchez** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los doce días del mes de septiembre del año dos mil diecisiete.

**ATENTAMENTE**

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Bertha Alicia León Chávez

Dra. Nidia Gary Pazos Salazar

Dra. Sandra Reyes Carmona

**80** AÑOS  
**DE UNIVERSIDAD**

Posgrado en Ciencias Químicas  
Facultad de Ciencias Químicas  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Ciudad Universitaria  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7397  
posgrado.quimica@correo.buap.mx

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Para la realización de este trabajo tuve los siguientes apoyos:

CONACYT. Becario CONACYT por 2 años (2015-2017), con el número de registro CVU **702827**.

Proyecto VIEP 2016, NHRM-NAT16-I Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado

Proyecto VIEP 2017, NHRM-NAT17-I Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del programa II. Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

Agradecemos a la Dra. Carolina Moran Raya del Laboratorio de Biología de la Reproducción del Instituto de Ciencias por las facilidades para el uso del microscopio de fluorescencia.

## Agradecimientos

A Dios

Por custodiar a mi familia y seres queridos.

A mi directora de tesis, una profesora talentosa y científica apasionada

Dra. Nora, gracias por su apoyo incondicional, estoy en deuda y agradecida por las oportunidades que me ofrece día con día. Gracias por apreciar mis aptitudes, pero más por apoyarme a fortalecer mis debilidades como aspirante a investigador. Gracias por enseñarme que la nobleza, la humildad y el compañerismo deben ser parte de nuestro trabajo cotidiano.

A mis compañeros de laboratorio

Especialmente a Deyna, por tu invaluable apoyo, dedicación e interés en el trabajo, así como por tu gran compañía y amistad.

A mi esposo e hija

Jorge, gracias por apoyarme y cuidarme en todo momento, por tu paciencia y por la dedicación que le brindas a nuestra familia, gracias por caminar a mi lado tomados de la mano, te amo. Sofía Elena, aún eres muy pequeña, pero tus sonrisas, abrazos, paciencia y dulzura son un bálsamo de frescura e inspiración, gracias hijita.

A mi mamá

Por cuidar y proteger a mi familia, gracias por tu inmenso amor y ternura, por tu sabiduría y enseñanzas. Gracias porque en estos dos años de maestría me acompañaste en mis noches de estudio, por darme ánimo constante y por tus tiernos detalles, por esa taza de café o chocolate caliente, por todo. No tengo palabras para agradecer todo lo que brindas sin esperar algo a cambio, te amo.

A mis hermanos y sobrinos

Por su invaluable apoyo en el día con día, por escucharme y aconsejarme, gracias por amar y cuidar de Sofía Elena. Queridos sobrinos, deseo de todo corazón que encuentren en sus futuras profesiones la pasión y la alegría por realizar sus actividades, desarróllense con amor, respeto y compromiso, siempre estaré a su lado.

## Efecto de Cd, Hg y Zn en el envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*

**RESUMEN:** El envejecimiento es un proceso altamente conservado entre eucariotas y es un declive gradual, acumulativo e irreversible de las funciones moleculares y bioquímicas celulares, influenciado por la carga genética, el medio ambiente y la edad. Su estudio se encuentra altamente validado en levaduras, siendo *Schizosaccharomyces pombe* nuestro modelo de estudio, ya que es capaz de realizar modificaciones postranscripcionales y postrasduccionales en comparación a la levadura de gemación; en este trabajo estudiamos el envejecimiento cronológico que es equiparable a células somáticas diferenciadas. El envejecimiento se encuentra influenciado por varios factores, uno de ellos es la exposición a metales pesados, por lo que el objetivo de este trabajo fue el estudio de la exposición de cadmio, mercurio y dosis altas de zinc y su efecto en el envejecimiento cronológico de la levadura de fisión, caracterizando la morfología, la capacidad para entrar al ciclo celular, la viabilidad, la modificación de patrones génicos relacionados a la homeostasis de zinc como *zrtI*, *zhfI* y *zym*, y de *atg1*, *3*, *4*, *5*, *8*, *13* y *17*, también se analizó el efecto de la inhibición e inducción de la autofagia. La exposición a la EC<sub>10</sub> de cadmio, mercurio y zinc induce un fenotipo temprano de envejecimiento acompañado de una disminución de la capacidad energética, sin embargo, sólo el HgCl<sub>2</sub> disminuyó la capacidad de ingreso al ciclo celular. La exposición a ZnCl<sub>2</sub> al día CLS6 incrementa los niveles de *zym* y *pcaI*, mientras que en el CLS8 aumenta el de *zrt*. Por último, la autofagia es importante para el mantenimiento de la morfología y la viabilidad en el CLS de células expuestas a los metales.

**PALABRAS CLAVE:** Envejecimiento, envejecimiento cronológico, *Schizosaccharomyces pombe*, cadmio, mercurio, zinc, patrones génicos, autofagia, homeostasis del zinc.

**ABSTRACT:** Aging is a highly conserved process among eukaryotes, it is a gradual, accumulative and irreversible decline of molecular and biochemical functions; it is influenced by genetics, environment and age. Aging study is validated in yeast, being *Schizosaccharomyces pombe* our study model, because is capable of making postrasduccional and postranscriptional modifications in comparison to the classical baker yeast model. In this study, we studied chronological aging, which equals to differentiated somatic cells. Aging is influenced by lots of factors; one of them is the exposure to heavy metals, so the aim of this work was the study of the exposure of cadmium, mercury and high doses of zinc and its effect on the chronological aging of the fission yeast. Morphology, the capacity of entering to cell cycle, viability, genetic patterns of *zrtI*, *zhfI* and *zym*, also *atg1*, *3*, *4*, *5*, *8*, *13* and *17*, and inhibition/induction of autophagy were evaluated. The exposure of cadmium, mercury and zinc EC<sub>10</sub> induced an early aging phenotype, among of the diminishment of energetic capacity however, only HgCl<sub>2</sub> attenuated the capacity of entering to cell cycle. Exposure to ZnCl<sub>2</sub> at CLS6 increased levels of *zym* and *pcaI*, meanwhile at CLS8 *zrtI* increased. Last, autophagy is important to the maintenance of morphology and viability in the CLS of cells exposed to metals.

**KEYWORDS:** Aging, chronological life span, *Schizosaccharomyces pombe*, cadmium, mercury, zinc, genetic patterns, autophagy, zinc homeostasis.

# Índice

## Tabla de contenido

<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
1. Introducción .....	2
1.1. Antecedentes generales .....	3
1.2. <i>Schizosacharomyces pombe</i> como modelo de envejecimiento.....	4
1.2.1. Envejecimiento cronológico en <i>S. pombe</i> .....	5
1.3. Pérdida de proteostasis en el envejecimiento .....	7
1.3.1. La autofagia.....	8
1.3.2. Maquinaria molecular de la autofagia.....	10
1.3.3. Regulación de la autofagia .....	13
1.4. Apoptosis.....	16
1.4.1. Apoptosis en <i>S. pombe</i> .....	18
1.5. Metales pesados y envejecimiento .....	18
1.5.1. Zinc .....	19
1.5.2. La homeostasis de zinc en <i>S. pombe</i> .....	20
1.5.3. Cadmio .....	21
1.5.4. Mercurio .....	22
2. Justificación.....	22
3. Planteamiento del problema .....	23
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos .....	23
5.1. Objetivo general .....	23
5.2. Objetivos particulares.....	23
<b>CAPÍTULO II</b> .....	24
6. Metodología .....	25
6.1. Diseño Experimental .....	25
6.2. Caracterización del CLS de <i>S. pombe</i> en presencia de CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	25
6.2.1. Cultivo de <i>S. pombe</i> en CLS, UFCs y evaluación de la viabilidad celular .....	25
6.3. Modificación del programa génico de <i>S. pombe</i> en presencia de CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	26
6.3.1. Extracción de ARN .....	26
6.3.2. qPCR .....	27
6.3.2.1. Generación de curvas estándar de los genes <i>sdh</i> , <i>atg4</i> , <i>pcal</i> , <i>zym</i> , <i>zrt1</i> y <i>zhf</i> .....	27
6.3.2.2. Ensayos de qPCR con cuantificación relativa por el método de la curva estándar para los genes <i>sdh</i> , <i>atg4</i> , <i>pcal</i> , <i>zym</i> , <i>zrt1</i> y <i>zhf</i> .....	29
6.4. Evaluación de la autofagia en el CLS de <i>S. pombe</i> después de la exposición a CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	30
6.4.1. Ensayo de inhibición de la autofagia.....	30
6.4.2. Ensayo de inducción de la autofagia .....	31
6.4.3. Evaluación de la autofagia .....	31
<b>CAPÍTULO III</b> .....	33
7. Resultados y discusión .....	34
7.1. Grupo control .....	34
7.2. Caracterización del envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i> después de la exposición a la EC <sub>10</sub> de CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	37
7.2.1. Grupo cadmio.....	41
7.2.3. Grupo zinc .....	45
7.3. Modificación del programa génico de <i>S. pombe</i> en presencia de CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	47
7.3.1. Grupo control .....	49
7.3.2. Grupo cadmio.....	53

7.3.3.Grupo mercurio .....	56
7.3.4.Grupo zinc .....	59
7.4. Determinación del estado de la autofagia en el CLS de <i>S. pombe</i> después de la exposición a CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> .....	62
7.4.1.Control y CQ .....	63
7.4.2.Cadmio .....	65
7.4.3 Mercurio .....	67
7.4.4.Zinc .....	69
7.4.5.Control sin zinc .....	72
7.4.6.Cadmio sin zinc.....	73
7.4.7.Mercurio sin zinc.....	75
7.4.8.Zinc sin zinc .....	76
7.5. Evaluación de la autofagia .....	78
7.5.1.Control.....	81
7.5.2.Cadmio .....	85
7.5.3.Mercurio .....	88
7.5.4.Zinc .....	91
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	96
8. Conclusiones .....	97
9. Perspectivas .....	98
10. Bibliografía .....	99
Apéndice A Soluciones generales .....	105

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Vías de señalización de sensado de nutrientes asociadas al envejecimiento. ....	6
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de las proteínas Atg en el proceso de autofagia.....	12
<b>Figura 3.</b> Regulación molecular de la autofagia.....	15
<b>Figura 4.</b> Vías de activación de la apoptosis en mamíferos y <i>S. pombe</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i> . ....	34
<b>Figura 6.</b> Determinación de la viabilidad celular en el envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i> . ....	36
<b>Figura 7.</b> Estandarización de la exposición de <i>S. pombe</i> a CdCl <sub>2</sub> .....	37
<b>Figura 8.</b> Estandarización de la concentración y tiempo de exposición a CdCl <sub>2</sub> en <i>S. pombe</i> y la inducción de envejecimiento cronológico.....	39
<b>Figura 9.</b> Estandarización de la concentración y tiempo de exposición a CdCl <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> y ZnCl <sub>2</sub> en <i>S. pombe</i> y la inducción de envejecimiento cronológico. ....	40
<b>Figura 10.</b> Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i> expuesto a CdCl <sub>2</sub> 2 h. ....	41
<b>Figura 11.</b> Determinación de la viabilidad celular en el CLS tras la exposición a CdCl <sub>2</sub> .....	43
<b>Figura 12.</b> Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i> expuesto a HgCl <sub>2</sub> 2 h. X. ....	44
<b>Figura 13.</b> Determinación de la viabilidad celular en el CLS2 tras la exposición a HgCl <sub>2</sub> . ....	45
<b>Figura 14.</b> Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de <i>S. pombe</i> expuesto a ZnCl <sub>2</sub> 2 h.....	46
<b>Figura 15.</b> Determinación de la viabilidad celular en el CLS2 tras la exposición a ZnCl <sub>2</sub> .....	46
<b>Figura 16.</b> Cinética de la estandarización de la exposición de <i>S. pombe</i> a cloroquina.....	63
<b>Figura 17.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia en el CLS de <i>S. pombe</i> . ....	64
<b>Figura 18.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	65

<b>Figura 19.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a CdCl <sub>2</sub> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	66
<b>Figura 20.</b> Efecto de la inhibición de autofagia y la exposición a CdCl <sub>2</sub> en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	67
<b>Figura 21.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a HgCl <sub>2</sub> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	68
<b>Figura 22.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a HgCl <sub>2</sub> en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	69
<b>Figura 23.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a ZnCl <sub>2</sub> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	70
<b>Figura 24.</b> Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a ZnCl <sub>2</sub> en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	70
<b>Figura 25.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	72
<b>Figura 26.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	73
<b>Figura 27.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición a cadmio en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	74
<b>Figura 28.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición de cadmio en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	74
<b>Figura 29.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición a mercurio en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	75
<b>Figura 30.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición de mercurio en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	76
<b>Figura 31.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición a zinc en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	77
<b>Figura 32.</b> Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición de zinc en la viabilidad celular en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	78
<b>Figura 33.</b> Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo control.....	85
<b>Figura 34.</b> Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo cadmio.....	88
<b>Figura 35.</b> Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo mercurio.....	91
<b>Figura 36.</b> Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo zinc.....	94

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características de <i>S. pombe</i> .....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación y características de las proteínas Atg.....	9
<b>Tabla 3.</b> Tratamiento con DNasa.....	28
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de reacción para la síntesis de ADNc.....	28
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de reacción para la construcción de curvas estándar por qPCR.....	29
<b>Tabla 6.</b> Condiciones del termociclador para la amplificación del ADNc para las curvas estándar más la curva de disociación.....	29
<b>Tabla 7.</b> Mezcla de reacción para la amplificación del ADNc por qPCR.....	30
<b>Tabla 8.</b> Diseños de oligonucleótidos para qPCR de los genes <i>zym</i> , <i>zrt1</i> y <i>zhf</i> .....	48

<b>Tabla 9.</b> Resumen de la modificación de los patrones génicos de <i>S. pombe</i> de los grupos control, cadmio, mercurio y zinc de: <i>atg4</i> , <i>pcaI</i> , <i>zym</i> , <i>zrtI</i> y <i>zhfI</i> .....	61
<b>Tabla 10.</b> Diseños de oligonucleótidos para qPCR de los genes <i>atg1</i> , 3, 5, 8, 13 y 17..	79
<b>Tabla 11.</b> Resumen de la modificación de los patrones génicos de la autofagia de <i>S. pombe</i> de los grupos control, cadmio, mercurio y zinc del CLS2, 8 y CLS8 sin zinc.....	95

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Unidades formadoras de colonias de <i>S. pombe</i> después la exposición de $CdCl_2$ , $HgCl_2$ y $ZnCl_2$ en el envejecimiento cronológico.....	36
<b>Gráfica 2.</b> Curvas de disociación de los genes <i>sdh</i> , <i>atg4</i> , <i>pcaI</i> , <i>zym</i> , <i>zrtI</i> y <i>zhf</i> .....	48
<b>Gráfica 3.</b> Curvas estándar de los genes <i>sdh</i> , <i>atg4</i> , <i>pcaI</i> , <i>zym</i> , <i>zrtI</i> y <i>zhf</i> .....	49
<b>Gráfica 4.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg4</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	50
<b>Gráfica 5.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>pcaI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	51
<b>Gráfica 6.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zym</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	52
<b>Gráfica 7.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zrtI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	52
<b>Gráfica 8.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zhfI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> .....	53
<b>Gráfica 9.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg4</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $CdCl_2$ .....	54
<b>Gráfica 10.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>pcaI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $CdCl_2$ .....	54
<b>Gráfica 11.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zym</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $CdCl_2$ .....	55
<b>Gráfica 12.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zrtI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $CdCl_2$ .....	56
<b>Gráfica 13.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zhfI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $CdCl_2$ .....	56
<b>Gráfica 14.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg4</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $HgCl_2$ .....	57
<b>Gráfica 15.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>pcaI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $HgCl_2$ .....	57
<b>Gráfica 16.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zym</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $HgCl_2$ .....	58
<b>Gráfica 17.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zrtI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $HgCl_2$ .....	58
<b>Gráfica 18.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zhfI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $HgCl_2$ .....	58
<b>Gráfica 19.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg4</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $ZnCl_2$ .....	59
<b>Gráfica 20.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>pcaI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $ZnCl_2$ .....	60
<b>Gráfica 21.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zym</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $ZnCl_2$ .....	60
<b>Gráfica 22.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zrtI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $ZnCl_2$ .....	60
<b>Gráfica 23.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>zhfI</i> en el CLS de <i>S. pombe</i> expuesta 2 h a $ZnCl_2$ .....	61
<b>Gráfica 24.</b> Unidades formadoras de colonias de <i>S. pombe</i> con autofagia inducida y expuesta a $CdCl_2$ , $HgCl_2$ y $ZnCl_2$ en CLS.....	71

<b>Gráfica 25.</b> Curvas de disociación de los genes <i>atg1</i> , 3, 5, 8, 14 y 17..	80
<b>Gráfica 26.</b> Curvas estándar de los genes <i>atg1</i> , 3, 5, 8, 14 y 17..	81
<b>Gráfica 27.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg1</i> y <i>atg7</i> del complejo de iniciación en los CLS2 y 8 control.....	82
<b>Gráfica 28.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg5</i> , 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 control.....	83
<b>Gráfica 29.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg14</i> del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8 control. 2. ....	84
<b>Gráfica 30.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg1</i> y <i>atg7</i> del complejo de iniciación en los CLS2 y 8 grupo cadmio. 2.....	86
<b>Gráfica 31.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg5</i> , 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 grupo cadmio. 2. ....	87
<b>Gráfica 32.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg14</i> del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8 grupo cadmio.....	88
<b>Gráfica 33.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg1</i> y <i>atg7</i> del complejo de iniciación en los CLS2 y 8 grupo mercurio. ....	89
<b>Gráfica 34.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg5</i> , 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 grupo mercurio.. ....	90
<b>Gráfica 35 .</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg14</i> del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8, grupo mercurio. ....	90
<b>Gráfica 36.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg1</i> y <i>atg17</i> del complejo de iniciación en los CLS2 y 8, grupo zinc. 2.....	92
<b>Gráfica 37.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg5</i> , 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 grupo zinc. ....	93
<b>Gráfica 38.</b> Expresión relativa del ARNm de <i>atg14</i> del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8 grupo zinc.....	94

## ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido desoxirribonucleico complementario	ADNc
Ácido ribonucleico	ARN
Ácido ribonucleico mensajero	ARNm
Blanco de rapamicina	TOR
Búfer de fosfatos	PBS
Citocromo C	CitC
Cloroquina	CQ
Complejo de clase III fosfatidil inositol 3-cinasa	PtdIns3K
Densidad óptica	OD
Envejecimiento cronológico/ <i>chronological life span</i>	CLS
Envejecimiento replicativo/ <i>replicative life span</i>	RLS
Especies reactivas de nitrógeno	ERN
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Estrés del retículo endoplásmico	ERes
Factor de transcripción	TF
Fitoquelatina	FQ
Fosfatidil etanolamina	FE
Fosfatidil inositol 3- fosfato	PtdIns3P
Fosfatil inositol 3 cinasa	PI3K
Glutación	GSH
Medio de extracto de levadura	YE
Medio mínimo de Edimburgo	EMM
Metalotioneína	MT
N-(2-(Bis((piridin-2-il)metil)amino)etil)-7-nitro-N-((piridin-2-il)metil)benzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-amina	NBD-TPEA
Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico	OCDE
PCR en tiempo real	qPCR
Proteínas relacionadas a la autofagia	Atg
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Restricción calórica	CR
Sistema ubiquitin proteasoma	SUP
Sitio de ensamble del fagóforo	SEF
Solución salina isotónica	SSI
Superóxido dismutasa	SOD
Ultravioleta	UV
Unidades formadoras de colonias	CFUs

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 1. Introducción

En la célula se orquestan innumerables procesos celulares, moleculares y bioquímicos para el mantenimiento de la viabilidad celular, los cuales se encuentran finamente regulados en diferentes niveles de organización jerárquica; sin embargo, ya que todos los sistemas tienden a la entropía respecto al tiempo, la célula disminuye su eficiencia, resultando en la disminución de la viabilidad y finalmente en la muerte. Este fenómeno se denomina envejecimiento y es un proceso altamente conservado entre los eucariotas superiores como *Homo sapiens* (*H. sapiens*), *Macaca mulatta* (*M. mulatta*), *Mus musculus* (*M. musculus*) y *Rattus norvegicus* (*R. norvegicus*), pero también se encuentra en los eucariotas inferiores como las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (Rattan 2006, Holliday 2007, Campisi 2013).

En los seres humanos, el envejecimiento es clasificado como exitoso o patológico. En el primero se disminuye el volumen de tejido muscular, aumenta el tejido adiposo y conectivo. En el segundo, hay un cambio en la composición de los tejidos conectivos (presentan rigidez), la composición de la membrana celular cambia, disminuye la eficiencia de la eliminación de bióxido de carbono y disminuye el ingreso de oxígeno y nutrientes; también disminuyen los ritmos biológicos y capacidades funcionales, fenotípicamente se observa calvicie, disminución en tiempos de reacción, fluctuación de peso, pérdida de la capacidad visual, hipoacusia, alteración de los patrones de sueño, arrugas, entre otros. Además, se considera que los individuos tienen envejecimiento patológico cuando padecen enfermedades crónico degenerativas, como diabetes, arterioesclerosis, neurodegeneración, osteoporosis, cáncer, defectos cardiovasculares e inmunológicos, las cuales disminuyen la calidad de vida e incrementan la probabilidad de muerte (Bondy 2007, Holliday 2007, Campisi 2013, Rattan 2006)

Estudios demográficos del Consejo Nacional de Población (CONAPO) han determinado que la distribución demográfica de la población mexicana cambiará paulatinamente, ya que en el año 2005 las gráficas poblacionales mostraban una forma piramidal característica de una población joven, sin embargo para 2050 adquirirá un perfil rectangular voluminoso en la cúspide, propio de poblaciones seniles, predicho por la disminución en la natalidad y el aumento en la esperanza de vida (Águila et al. 2011, Partida 2008). El aumento en la incidencia de enfermedades crónico degenerativas supone un

aumento en el gasto público y el presupuesto de México en este sector es bajo en comparación con otros países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) además, más del cincuenta por ciento de la población no cuenta con seguridad social (Águila et al. 2011), por lo que es imperativo el estudio de las bases moleculares del envejecimiento y posibles terapéuticas.

### **1.1. Antecedentes generales**

El envejecimiento es un proceso altamente conservado entre eucariotas y es un declive gradual, acumulativo e irreversible de las funciones moleculares y bioquímicas celulares, influenciado por la carga genética, el medio ambiente y la edad, lo que deriva en la acumulación progresiva de daño molecular en ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, que involucra a los diferentes niveles de organización biológica y al organismo como una unidad funcional (Rattan 2006, Kirkwood 2005, Bondy 2007, Das 2011, Campisi 2013), se han propuesto biomarcadores característicos (López-Otín et al. 2013):

- i. *Inestabilidad genómica.* Agentes físicos (radiación ultravioleta, UV), químicos (como, metales pesados) y procesos endógenos provocan mutaciones, traslocaciones y pérdidas cromosomales, y disrupción genética, modificando la expresión génica y generando defectos en la arquitectura nuclear (Rattan 2006, López-Otín et al. 2013)
- ii. *Acortamiento telomérico.* Los telómeros cortos activan mecanismos que evitan posteriores divisiones celulares; en eucariotas superiores se traduce en la disfunción de órganos y sistemas (Das 2011); mientras que en eucariotas inferiores deriva en la muerte de la colonia (López-Otín et al. 2013).
- iii. *Alteraciones epigenéticas.* Al modificarse los sistemas de metilación del ADN, así como las modificaciones postraduccionales de las histonas, la arquitectura de la cromatina cambia, modificando la expresión génica, induciendo disfuncionalidad en el organismo (Nikoletopoulou 2014).
- iv. *Pérdida de la proteostasis.* La proteostásis tiene como función la estabilización y el correcto plegado de proteínas, estos procesos se orquestan por las proteínas de choque térmico y los mecanismos de degradación, a través del proteosoma y la autofagia. Sin embargo, su desregulación disminuye la eliminación de proteínas no plegadas o mal

plegadas, las cuales se agregan y generan disfunción celular (Friguet 2006, López-Otín et al. 2013, Fernández & López-Otín 2015) .

- v. *Desregulación del sentido de nutrientes.* Induce la disminución de factores de transcripción e incrementa las especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que deriva en daño genómico, proteómico y lipídico (Rattan 2006).
- vi. *Disfunción mitocondrial.* En el envejecimiento hay una alteración de los estados de óxido reducción en la cadena de transferencia de electrones, generando un desbalance en las ERO y modificando el potencial de membrana mitocondrial, activando el programa de muerte (López-Otín et al. 2013).
- vii. *Senescencia celular.* Es el arresto irreversible celular, que induce una inflamación crónica leve, conllevando a un estrés celular (Sikora, Bielak-Zmijewska, & Mosieniak 2014).

## **1.2. *Schizosacharomyces pombe* como modelo de envejecimiento**

La identificación de los mecanismos bioquímicos, genéticos y moleculares implicados en la regulación de la longevidad y la inducción del envejecimiento, se han basado en investigaciones de diferentes organismos modelo como las levaduras *S. cerevisiae* y *S. pombe*; el gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), la mosca *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) y los mamíferos *M. musculus* y *R. norvegicus*.

El estudio en levaduras brinda ciertas ventajas respecto a otros modelos, como fácil manipulación genética, mantenimiento de bajo costo, tiempo de vida corto y alta trazabilidad. Históricamente la levadura *S. cerevisiae* ha sido el modelo de estudio preferido; sin embargo, al caracterizar a *S. pombe* (**Tabla 1**) se ha encontrado que posee ventajas respecto al modelo de levadura clásico (Roux et al. 2009, Rosas-Murrieta 2015), por ejemplo puede realizar procesamiento alternativo del transcrito primario, posee ARN de interferencia, tiene baja redundancia de proteínas y realiza modificaciones postraduccionales de forma similar a eucariotas superiores, funciones que no puede realizar *S. cerevisiae*; por lo que su empleo brinda información equiparable a eucariotas superiores, razón por la cual es nuestro modelo de estudio.

**Tabla 1. Características de *S. pombe*.** Información recopilada de (Lin & Austriaco 2013, Roux et al. 2010, Rosas-Murrieta 2015)

Generales	Genómicas	Moleculares
Forma cilíndrica	Tamaño del genoma de 13.8 Mb	ARN de interferencia
Diámetro 3-4 $\mu\text{m}$ y 7-15 $\mu\text{m}$ de longitud	3 cromosomas con centrómeros	Procesamiento alternativo del transcrito primario
División por fisión		Baja redundancia de proteínas
Tiempo de generación: 2-4 h		Modificaciones postranscripcionales y postrasduccionales

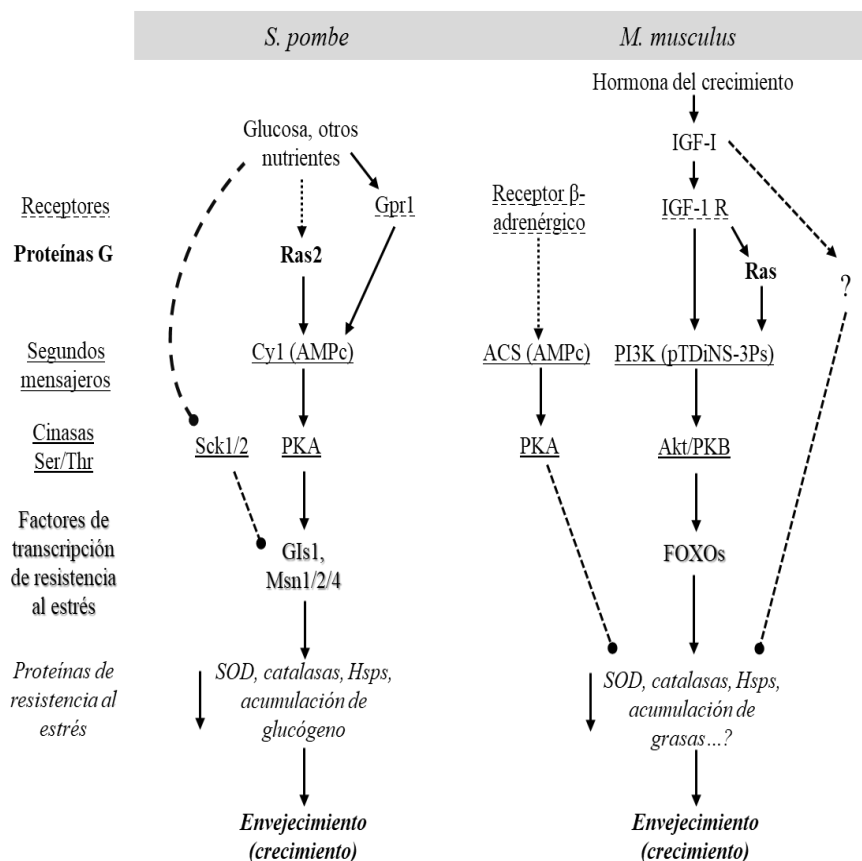
El envejecimiento en levaduras puede estudiarse a través de dos paradigmas, uno es el envejecimiento replicativo (RLS), en el que se cuantifica el número de generaciones de un organismo hasta antes de su muerte, su comportamiento es comparable al de las células germinales (Kaeberlein 2017). El segundo modelo es el envejecimiento cronológico (CLS), donde se cuantifica el tiempo en que la población sobrevive en fase estacionaria en un medio mínimo; los cambios bioquímicos y celulares bajo este paradigma son similares al fenotipo de envejecimiento de células somáticas de eucariotas superiores como arresto celular, tamaño celular aumentado o heterogéneo, alteraciones cromosómicas y disminución en la dinámica de la actina que se ve reflejada en la pérdida de la integridad de la pared celular (Kaeberlein 2017, Rosas-Murrieta 2015, Santos, Leão, & Sousa 2012); en este trabajo estudiamos el paradigma de envejecimiento cronológico.

### **1.2.1. Envejecimiento cronológico en *S. pombe***

El paradigma de envejecimiento cronológico o CLS constituye un modelo equiparable para células somáticas diferenciadas de eucariotas superiores. En el CLS se cuantifica la sobrevivencia de una población de billones de células en fase estacionaria, que se encuentran en un estado metabólico bajo precedido por un crecimiento exponencial (Roux et al. 2010), para ello se realiza el siguiente protocolo de trabajo: se cultiva a *S. pombe* en medio completo (YE, medio de extracto de levadura) hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento, el cultivo se lava con agua y se traslada a un medio mínimo (EMM) adicionado con glucosa al 2%, vitaminas y minerales; se monitorea la sobrevivencia celular a través del número de células que son capaces de formar colonias en medio YE con unidades formadoras de colonias (CFUs) y con tinciones vitales como la floxina B (Fabrizio & Longo 2008, Roux et al. 2010), ambos métodos son complementarios ya que el primero brinda información

sobre la capacidad de las células para entrar en el ciclo celular, pero el segundo notifica sobre la capacidad energética para impedir el ingreso al citoplasma de un fluoróforo.

A través del paradigma de CLS, se ha inducido la restricción calórica (CR), en la cual las células se crecen en el medio EMM con una concentración de glucosa inferior [0.05% - 0.5%] o son cultivadas en agua (Fabrizio & Longo 2008, Herker et al. 2004, Chen & Runge 2009), a través de esta intervención nutricional se ha extendido el tiempo de vida de la levadura, además se han hallado tres vías de sensado de nutrientes que prolongan el tiempo de vida y que se encuentran altamente conservadas entre eucariotas (**Figura 1**).



**Figura 1. Vías de señalización de sensado de nutrientes asociadas al envejecimiento.** La activación del sensado de nutrientes y crecimiento inhibe la actividad de los factores de transcripción de respuesta al estrés (Gls1, Msn1/2/4, FOXO), disminuyendo la protección celular (Tomado y modificado de (Longo & Fabrizio 2012)).

Se ha encontrado que las concentraciones altas de glucosa (iguales o mayores a 2%) sobreactivan la vía AMPc/PKA, la cual modula el crecimiento, la resistencia al estrés y la longevidad. Esta vía se inicia cuando la glucosa interacciona con su receptor Gpr1, el cual modula la activación del segundo mensajero Cry1/AMPC; de forma paralela se activa la vía

Ras, regulando río abajo a factores de transcripción como Msn2/4 que modifican la expresión de la superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la conversión del anión superóxido en oxígeno o peróxido de hidrógeno, por lo tanto, al disminuir su expresión aumentan las ERO. Las ERO modifican el potencial de la membrana mitocondrial activando el protocolo de muerte celular por apoptosis (Roux et al. 2009, Roux et al. 2006, Kaeberlein 2017); cabe destacar que al día 6 de cultivo, la mitad de la población se pierde, asociada a la generación exponencial de ERO.

Por otro lado, la vía Sck1/2, ortóloga a PKB, también regula la resistencia al estrés oxidante. Existe una tercera vía, el blanco de rapamicina (TOR), compuesta de dos complejos TOR1 y TOR2, el primero modula el crecimiento, la sobrevivencia celular y es un regulador negativo de la autofagia; TOR2 regula al citosqueleto a través de las GTPasas (Rho) (Kaeberlein 2017, Longo & Fabrizio 2012).

### **1.3. Pérdida de proteostasis en el envejecimiento**

Al igual que los ácidos nucleicos, las proteínas son susceptibles a las ERO (como superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo), las cuales se producen endógenamente por el metabolismo aeróbico, especialmente en la mitocondria y peroxisomas (Friguet 2006). Sin embargo, también hay factores externos que pueden desencadenar un incremento significativo, como radiación UV, metales pesados, inflamación e isquemia. Cuando la homeostasis entre las enzimas antioxidantes y las ERO se anula por un incremento exacerbado de las últimas, los componentes celulares se oxidan, en las proteínas los átomos de azufre y los aminoácidos aromáticos son los más susceptibles a la oxidación (Berlett & Stadtman 1997), por lo que, disminuyen su actividad biológica, pierden termoestabilidad y exponen sus aminoácidos hidrófobos en la superficie, induciendo su aglomeración (Friguet 2006).

Por otra parte, en condiciones fisiológicas los residuos aminoacídicos como asparagina y aspartato son puntos críticos de degradación proteica espontánea, en menor medida también lo son la glutamina y el ácido glutámico (Geiger & Clarke 1987), esta degradación genera cambios en la estructura tridimensional de las proteínas de tipo fibrilar, lo que induce la formación de fibrillas y agregación proteica (Fukuda 1999, Shimizu et al. 2000).

Cuando la célula sensa proteínas mal plegadas o aglomeradas, sus sistemas de respuesta al estrés (proteínas de choque térmico y los de respuesta a proteínas mal plegadas del retículo endoplásmico y de la mitocondria) son activados para promover el repliegamiento proteico; sin embargo, la actividad de ambos disminuye conforme la edad (Labbadia & Morimoto 2015). Las proteínas mal plegadas, aglomeradas o que han cumplido su tiempo de vida son eliminadas en forma coordinada por dos sistemas: el sistema ubiquitin proteasoma (SUP) y la autofagia; no obstante, su eficacia se altera por el envejecimiento y por el estrés ambiental (Labbadia & Morimoto 2015), lo que promueve la acumulación de más proteínas oxidadas. La disminución de la actividad del sistema SUP depende de tres mecanismos: inactivación directa del proteosoma por la modificación de sus subunidades por ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN), disminución de subunidades proteosomales y por el incremento de inhibidores endógenos (Friguet 2006). En cuanto a la autofagia, en organismos envejecidos, por sí sola es insuficiente para disminuir la citotoxicidad, sin embargo, manipulaciones nutricionales, farmacológicas y genéticas inducen la extensión de la longevidad debido al incremento de su actividad (Kroemer 2015), además, es un proceso que se encuentra íntimamente relacionado con la muerte y sobrevivencia celular, por lo que es de interés en nuestro grupo de trabajo.

### **1.3.1. La autofagia**

Estudios por Duve (Klionsky 2008) en los años 50's pusieron de manifiesto que en los riñones de *M. musculus* se encontraban mitocondrias en los lisosomas y Clark (Clark 1957) acuñó el término autofagia del griego *auto* (a sí mismo) y *fagia* (comer); sin embargo, no fue hasta los años 90's que el grupo de Ohsumi (Tsukada & Ohsumi 1993), utilizando la levadura *S. cerevisiae* encontraron los genes y proteínas relacionados a este proceso, el cual después se caracterizó en *H. sapiens* y otros organismos modelo, encontrándose que es un proceso altamente conservado entre las especies; en la **tabla 2** se observan los porcentajes de identidad de las proteínas de autofagia de *M. musculus* y *S. pombe* en comparación a *H. sapiens*, se aprecia que ambos modelos poseen porcentajes de identidad altos respecto al humano, lo que valida su uso para el estudio de la autofagia.

**Tabla 2. Clasificación y características de las proteínas Atg.** El porcentaje de identidad (en paréntesis) de las proteínas Atg de *M. musculus* y *S. pombe*, con respecto a *H. sapiens* se observa un alto grado de conservación entre ellas. Se obtuvieron las secuencias aminoacídicas del NCBI y se les realizó un BLAST.

	Proteínas Atg		Características
	<i>M. musculus</i> (% identidad)	<i>S. pombe</i> (% identidad)	
Complejo ULK1	<b>ULK1</b> (89%)	<b>Atg1</b> (38%)	Cinasa Ser/Thr induce la autofagia y el ensamble del fagóforo (PA) (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg13</b> (94%)	<b>Atg13</b> (23%)	Regula y se une al complejo ULK1 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>FIP200</b> (89%)	<b>Atg17</b> (47%)	Proteína de unión y regulación de ULK1, induce la biogenesis del PA (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg101</b> (99%)	<b>Atg101</b> (25%)	Se une a Atg13 en el complejo ULK-Atg13-FIP200, lo que es importante para la estabilidad y fosforilación basal de Atg13 y ULK1 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
Complejo PtdIns 3- cinasa	<b>Vps15</b> (96%)	<b>Vps15</b> (44%)	Subunidad regulatoria de la cinasa del complejo PtdIns 3-cinasa (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg14</b> (93%)	<b>Atg14</b> (32%)	Necesaria para el funcionamiento del complejo PtdIn3-cinasa (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Vps34</b> (97%)	<b>Vps34</b> (52%)	La PtdIns 3- cianasa produce PI3P y permite el reclutamiento de las proteínas de unión a PI3P, como WIPI1/2 y de los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Beclin1</b> (98%)	<b>Atg6</b> (29%)	Modula la biogénesis del AP a través de la unión a Vps34 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>UVRAG</b> (88%)	<b>Vps38</b> (25%)	Se une a Beclin1 y promueve la biogénesis del AP (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
Sistema de conjugación Atg12	<b>Atg12</b> (76%)	<b>Atg12</b>	Proteína tipo ubiquitina que se une covalentemente a Atg5 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg5</b> (97%)	<b>Atg5</b> (28%)	Proteína tipo ubiquitina enlazada covalentemente a Atg12 e interactúa con Atg16 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg7</b> (89%)	<b>Atg7</b> (38%)	Enzima tipo E1 para la formación del complejo Atg12-Atg5 y LC3-PE (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg10</b> (72%)	<b>SpAtg10</b> (21%)	Enzima tipo E2 requerida para la formación del complejo Atg12-Atg5. En <i>S. pombe</i> , SpAtg10 se requiere para la progresión normal del ciclo celular y en condiciones de estrés, pero no tiene rol en la autofagia (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg16</b> (82%)	<b>Atg16</b> (0%)	Necesaria para la ensamble del tetrámero Atg12-Atg5-Atg16. (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
Sistema de conjugación LC3	<b>LC3</b> (83%)	<b>Atg8</b> (37%)	Conjugada con PE forma parte de la membrana del AP (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg3</b> (91%)	<b>Atg3</b> (36%)	Enzima de tipo E2 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg4</b> (92%)	<b>Atg4</b> (28%)	Induce a LC3-II y promueve el reciclaje de LC3 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>Atg7</b> (89%)	<b>Atg7</b> (38%)	Enzima de tipo E1 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
Miscelánea	<b>Atg2</b> (85%)	<b>Atg2A</b> (27%)	Requerida para la localización del AP (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
	<b>WIPI</b> (94%)	<b>Atg2B</b>	Requerida para la localización del AP (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
		<b>SpAtg18a</b> (34%)	En <i>S. pombe</i> es una proteína requerida para la orientación del complejo Atg12-Atg5-Atg16 (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).
		<b>SpAtg18b</b> (29%)	
		<b>SpAtg18c</b> (25%)	
<b>Atg9</b> (98%)	<b>Atg9</b> (29%)	Proteína transmembrana que probablemente lleva a cabo la expansión del fagóforo (Klionsky et al. 2011, Sun 2013).	

La autofagia es un mecanismo catabólico que permite la degradación de proteínas aglomeradas y dañadas, así como lípidos y organelos (conocidos como cargos), a través de su secuestro en una doble membrana lipídica y su posterior entrega a los lisosomas para su degradación (Kroemer 2015, Takahara & Maeda 2012, Takeda et al. 2010). La desregulación

de la autofagia se ha relacionado con el envejecimiento porque la expresión de las proteínas relacionadas a la autofagia (Atg) y su actividad disminuye respecto al tiempo, por lo que las células senescentes y envejecidas se caracterizan por la acumulación de proteínas anormales como la  $\alpha$ -sinucleína, la tau y la poliglutamina expandida. Además, en las levaduras, la autofagia es una vía crítica para la sobrevivencia durante la carencia de nutrientes (Ravikumar et al. 2010).

### 1.3.2. Maquinaria molecular de la autofagia

La autofagia se orquesta a nivel molecular por aproximadamente más de treinta proteínas Atg, las cuales se clasifican de acuerdo a su participación jerárquica en el proceso (**Tabla 2, Figura 2**):

*i. Inducción de la autofagia.* La autofagia es un proceso basal en todas las células; sin embargo, este programa puede activarse bajo condiciones de estrés como inanición, disminución de glucosa, disminución de factores de crecimiento, estrés del retículo endoplásmico (ER<sub>es</sub>), hipoxia, estrés oxidativo, infecciones y agentes farmacológicos, siendo la vía maestra reguladora TOR, que se encuentra altamente conservada entre eucariotas. La regulación negativa de TOR desfosforila a Atg13 aumentando su afinidad con la cinasa Atg1, lo que induce su activación, además, esta cinasa forma el complejo Atg1-13-17, el cual sirve como andamio y reclutador del resto de las Atgs en el sitio de ensamble del fagóforo (SEF, membrana lipídica que comienza a aislar los cargos), como lo son el sistema de la proteína cinasa 3-PtdIns y Atg9 que es la proteína paso limitante en la formación del fagóforo; cabe destacar que este complejo de inducción es estabilizado por la proteína Atg101, la cual se encuentra conservada en *S. pombe*, pero no en *S. cerevisiae*. La Atg9 es una proteína transmembrana que actúa como reclutadora lipídica; los lípidos que conforman al fagóforo provienen del retículo endoplásmico, del trans Golgi, de endosomas y de la membrana lipídica, aunque la mayor parte se sintetiza *de novo*; otra función de Atg9 es el reclutamiento de los sistemas de conjugación para la expansión del fagóforo (Kamada et al. 2010, Nakatogawa et al. 2009, Bento et al. 2016).

*ii. Formación del autofagosoma.* Para la nucleación y el ensamblaje inicial de la membrana del fagóforo se necesita al complejo de clase III fosfatidil inositol 3-cinasa (PtdIns3K), el cual está compuesto por la PtdIns3K Vps34, la cinasa Ser/Thr Vps15, Atg14

y Atg6, interesadamente la proteína Atg6 se regula por la proteína antiapoptótica Bcl-2, por lo que en este nivel se vinculan íntimamente la autofagia con la muerte celular programada (He & Klionsky 2009). El complejo de la PtdIns3K sintetiza fosfatidil inositol 3- fosfato (PtdIns3P), el cual recluta a Atg18 al SEF, a su vez, la Atg18 orienta a los complejos tipo ubiquitina Atg12-5-16 y Atg8-fosfatidil etanolamina (FE) al fagóforo, donde regulan la elongación de la membrana. La proteína Atg12 se activa por la proteína de tipo E1 Atg7, después se transfiere a Atg10, la cual es una enzima conjugadora E2, y después se une de forma covalente e irreversible con Atg5, cabe destacar que al contrario de los complejos tipo ubiquitina este no necesita una ligasa sustrato específica (E3). Posteriormente, Atg12-5 tienen una interacción de tipo  $\alpha$ - $\alpha$  con Atg16, lo que induce su autooligomerización y anclaje al fagóforo. Respecto al segundo complejo, la proteína Atg8 es escindida por la proteasa Atg4, lo que induce la exposición de su residuo C-terminal Gly; la enzima E1 del primer complejo activa a Atg8 y la transfiere a Atg3 (E2), por último, el complejo Atg-12-5 induce la formación de un enlace de tipo amida entre Atg8 y FE. El complejo Atg8- FE se localiza en la membrana del autofagosoma y su presencia se vincula con el crecimiento y la maduración del autofagosoma (Kamada et al. 2010, Nakatogawa et al. 2009, Bento et al. 2016). Ya que la proteasa Atg4 tiene un rol fundamental en la formación de los complejos de elongación y en la maduración del autofagosoma, es de nuestro interés su estudio.

*iii. Maduración vesicular y fragmentación del autofagosoma.* Al terminar la formación del autofagosoma, Atg4 escinde nuevamente a Atg8, liberándola de la membrana externa del autofagosoma, esto actúa como señalizador para que el autofagosoma esté listo para la fusión. En las levaduras, la maquinaria encargada de la fusión pertenece a la familia Rab GTPasa Ypt7 (homóloga de Rab7) y las proteínas SNARE (Vam3, Vam7, Vti1), el complejo de clase C Vps/HOPS y las proteínas Ccz1 y Mon1 (He & Klionsky 2009); posteriormente, la membrana intracelular del autofagosoma se degrada por las proteinasas A y B, y la lipasa Atg15 (He & Klionsky 2009, Reggiori & Klionsky 2013).



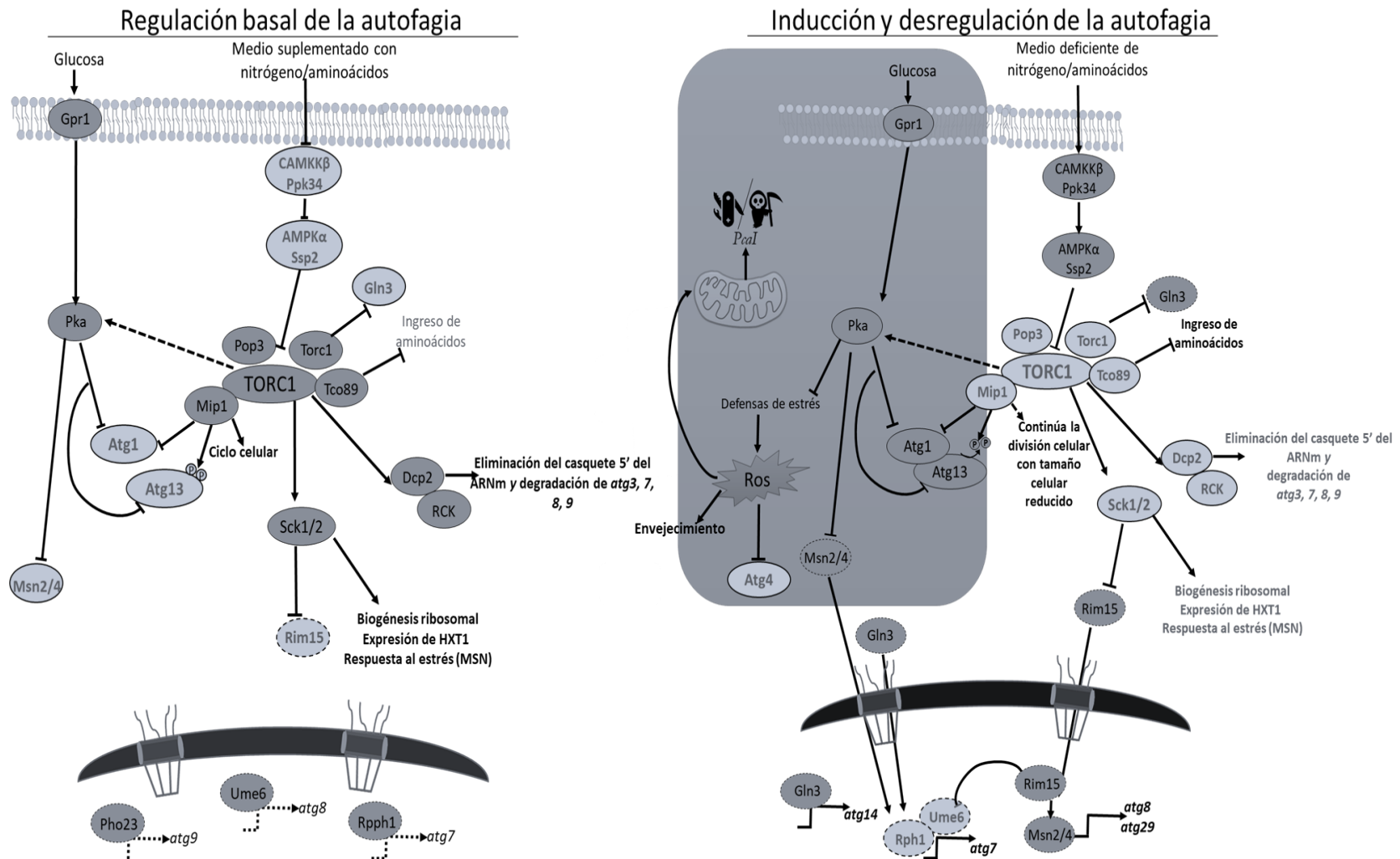
### 1.3.3. Regulación de la autofagia

Una diferencia de la autofagia en mamíferos y en levaduras es la inducción, en los primeros existe una vasta cantidad de señales que la activan (Füllgrabe et al. 2016, Ravikumar et al. 2010, Glick, Barth, & Macleod 2010), mientras que en las levaduras el principal estímulo es la disminución de nutrientes (Reggiori & Klionsky 2013, Cebollero & Reggiori 2009, Nakatogawa et al. 2009). En las levaduras, TOR es el principal sensor de nitrógeno y aminoácidos y por lo tanto es el regulador negativo principal de la autofagia (**Figura 3**). En condiciones basales con un medio rico en nutrientes, TOR regula de forma negativa la autofagia a través de su subunidad Mip1 fosforilando a Atg13, disminuyendo su afinidad por la Atg1, de esta forma el complejo de iniciación no se forma.

Bajo las condiciones antes descritas, Mip1 también regula el ciclo celular, por lo que las células pueden entrar al ciclo celular. De forma parcial, TOR, regula a Pka (**Figura 3**, línea punteada) (Roux et al. 2009, Hu et al. 2015), la cual inhibe de forma paralela a Atg1 y 13; por otra parte, la subunidad Torc1 regula de forma negativa, al factor de transcripción (TF) Gln3, que regula la transcripción de *atg14* (Hu et al. 2015). Bajo condiciones altas de nutrientes, Dcp2 se fosforila de forma dependiente de TOR y se asocia con los miembros de la familia RCK para formar un complejo con los transcritos de Atg, lo que deriva en la eliminación del casquete 5' del ARNm y degradación de los transcritos *atg7*, *8* y *9* (Hu et al. 2015). Los homólogos de Akt, Sck1/2 inducen la biogénesis ribosomal, aumentan la respuesta al estrés y regulan la expresión de *hxt1* (Hu et al. 2015).

En condiciones de inanición o de nitrógeno la proteína cinasa-AMP (AMPK) se activa con la fosforilación de la Thr172 en su subunidad catalítica  $\alpha$ , la cual puede ser activada por la cinasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina  $\beta$  (CAMKK $\beta$ )<sup>Ppk34</sup>, esta cinasa sensa y promueve la reducción de la actividad de TORC1, y no se disminuye la entrada al ciclo celular, pero las células muestran tamaño reducido (Bento et al. 2016, Davie, Forte, & Petersen 2015); ya que la subunidad Tco89 se encuentra inhibida, se regulan positivamente los importadores de aminoácidos para tratar de compensar la deficiencia de nitrógeno. Los transcritos *atg3*, *7*, *8* y *9*, aumentan su tiempo de vida en el citoplasma debido a que su degradación se ve inhibida, aunado a esto, los factores de transcripción Gln3, Rim15 y Msn2/4 son activados, se traslocan al núcleo y promueven la transcripción de *atg14*, *7*, *8* y *29* (Hu et al. 2015).

La vía de sensado de nutrientes Glucosa/Gpr1/Pka se desregula en el envejecimiento, lo que incide en la regulación negativa de Msn2/4, por lo que la respuesta a estrés y la autofagia disminuyen, induciendo un aumento de las ERO. Las ERO oxidan a las proteínas, lo que induce su aglomeración y disminuyendo su degradación, provocando citotoxicidad. Además, la proteasa Atg4 al tener residuos de cisteína es susceptible a ser inactivada por la oxidación, por lo que el flujo autofágico disminuye (Pérez-Pérez et al. 2014); por otra parte, las ERO modifican el potencial de membrana de la mitocondria, induciendo la liberación de la metacaspasa PcaI, que podría promover la muerte celular (Jazwinski & Kriete 2012, Hill & Nyström 2017, Lee et al. 2010b, Lim et al. 2007, Mazzoni et al. 2005); ya que la autofagia y la apoptosis son procesos íntimamente relacionados, es de nuestro interés el estudio de ambos.



**Figura 3. Regulación molecular de la autofagia.** Las vías activas se encuentran en color gris oscuro y letras negras, las inactivas en gris claro y letras grises, las flechas punteadas denotan transcripción disminuida, las vías en el rectángulo gris son las desreguladas durante el envejecimiento. Los factores de transcripción poseen un contorno discontinuo.

#### 1.4. Apoptosis

El mantenimiento de la homeostasis en organismos pluricelulares y unicelulares se realiza a través de múltiples mecanismos, uno de los más importantes es la muerte celular, en el que se regula el número de células disfuncionales o no viables en un tejido o en una colonia (Lin & Austriaco 2013). La apoptosis es un programa de suicidio celular orquestado por zimógenos (caspasas y metacaspasas), proteínas de la familia Bcl-2 y la mitocondria, sus marcadores son: formación de cuerpos apoptóticos, contracción celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del ADN (cariorraxis), disminución del potencial de la membrana mitocondrial y la translocación de fosfatidilserina de la membrana intracelular hacia la membrana extracelular (Lamkanfi & Dixit 2010, Elmore 2007, Kerr, Wyllie, & Currie 1972).

En mamíferos se han descrito dos vías de apoptosis (**Figura 4**), la intrínseca y la extrínseca. En la primera, los estímulos que la inician son daño al ADN, radiación, disminución de factores de crecimiento, disminución de nutrientes, envejecimiento, y ERO, induciendo la liberación de proteínas mitocondriales apoptóticas como citocromo C (CitC), SMAC/DIABLO y Htr2A/Omi; su liberación se lleva a cabo por la formación de poros en la membrana mitocondrial, los cuales se forman por la interacción de las proteínas apoptóticas Bax/Bak, las cuales forma parte de la familia proapoptótica conformada por Bok, Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma y Hrk. En forma basal la interacción Bax/Bak se inhibe a través de la interacción proteína- proteína con la proteína antiapoptótica Bcl-2; cabe destacar la existencia de otras proteínas antiapoptóticas como Bclx<sub>XL</sub>, Bcl-W, Mcl1, Bcl2A1 y Bcl-B. La liberación de CitC es esencial para el inicio irreversible de la vía intrínseca, esta proteína al ser liberada al citoplasma se oligomeriza con su proteína adaptadora Apaf-1, formando un complejo conocido como apoptosoma, el cual activa a través de una reacción proteolítica a la caspasa 9 (caspasa iniciadora), que es una proteasa tipo Cys-Asp, la cual corta y libera al dominio autoinhibitorio de la caspasa; cabe resaltar que la caspasa 9 es inhibida por una proteína inhibidora de apoptosis (XIAP), pero esta a su vez es inhibida por las proteínas SMAC/DIABLO, que son liberadas paralelamente con CitC. La caspasa 9 corta a las procaspasas 3 y 7 (caspasas ejecutoras), las cuales escinden a sustratos específicos para el desmantelamiento celular (Alberts et al. 2002, Elmore 2007, Lamkanfi & Dixit 2010, Rosas-Murrieta 2015).

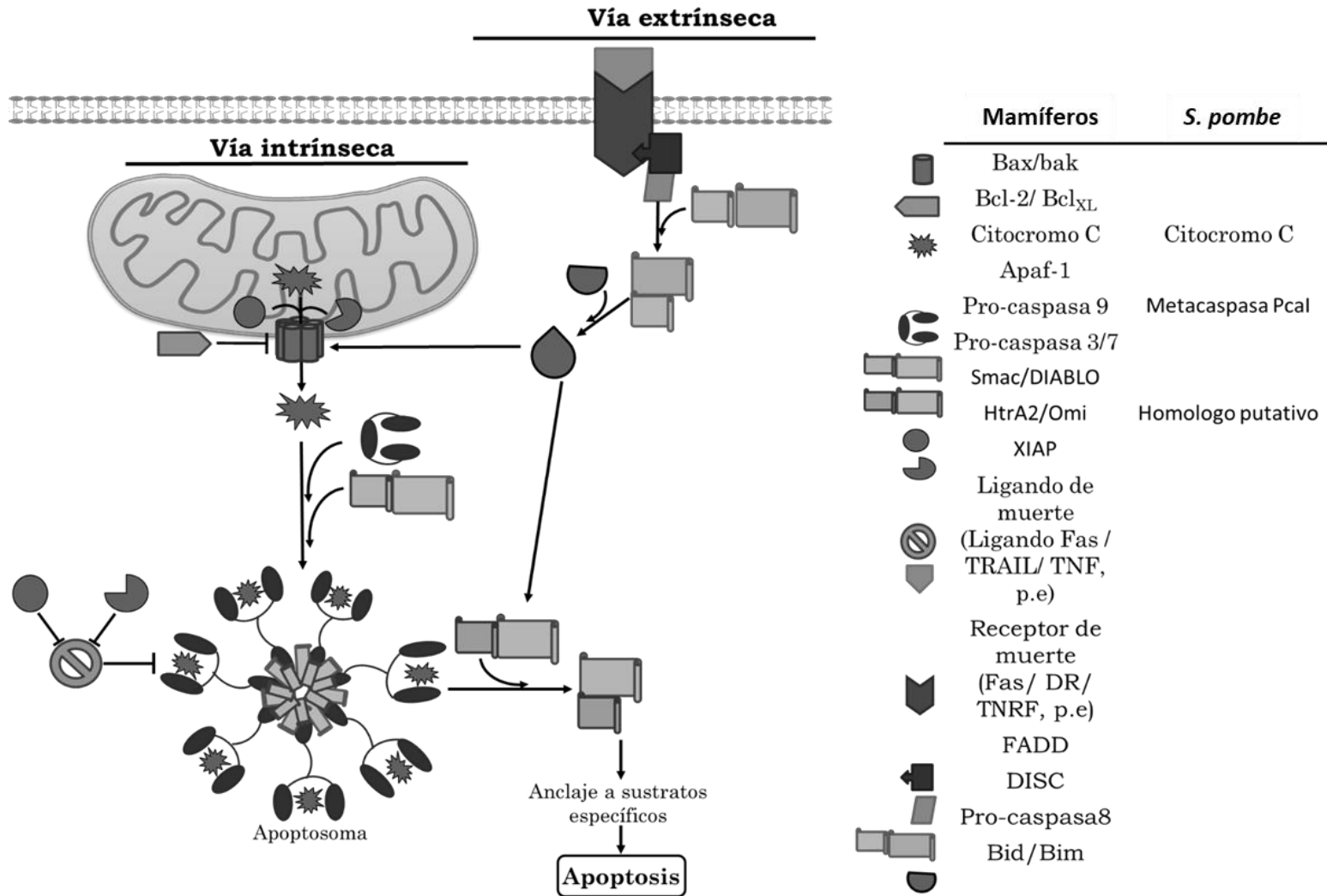


Figura 4. Vías de activación de la apoptosis en mamíferos y *S. pombe*. Tomado y modificado de (Rosas-Murrieta 2015).

#### **1.4.1. Apoptosis en *S. pombe***

Hasta hace dos décadas se pensaba que las levaduras no podían orquestrar la apoptosis porque eso significaría el suicidio celular, razón por la cual se utilizó a *S. pombe* para un estudio de doble híbrido de las proteínas Bax/Bak de *H. sapiens* (Ink et al. 1997). Contrario a lo que se pensaba, se encontró que estas proteínas inducían la condensación de la cromatina, así como el anclaje al ADN. A pesar de que las levaduras muestran las características de apoptosis, la maquinaria celular que modula este proceso no se encuentra, sin embargo, sí se ha encontrado un ortólogo de las caspasas, la metacaspasa PcaI.

Las metacaspasas tienen grandes similitudes con las caspasas como un dominio de caspasa en su sitio activo con residuos Cys y conformado por dos subunidades (P20 y P10); son sintetizadas como zimógenos inactivos con un prodominio N-terminal autoinhibitorio (Hill & Nyström 2015), sin embargo, el porcentaje de similitud entre la caspasa iniciadora con la PcaI es bajo (10%).

La evidencia muestra que la PcaI se regula positivamente cuando se expone a las células a bajas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.12-180 mM), ácido acético, amiodarona, aspirina, NaCl, ácido linolénico (0.05-0.2 mM) y glucosa (>2%) en el medio, así como radiación UV, envejecimiento, alta concentración de feromonas, estrés hiperosmótico (60% glucosa, 30% sorbitol) y aumento de temperatura (Hill & Nyström 2015). Como en los mamíferos, así como en las levaduras (**Figura 4**), la disminución del potencial de la membrana interna de la mitocondria deriva en la liberación de citocromo C, el cual se ha correlacionado con la inducción de PcaI y con el aumento de ERO, pero en levaduras la vía intrínseca no se encuentra caracterizada, aunque se ha demostrado que el nivel de proteínas oxidadas incrementa de forma proporcional con la presencia de la metacaspasa. Interesantemente, se ha descrito que la sobreexpresión de la PcaI se asocia a la sobrevivencia celular (Minina et al. 2017, Hill & Nyström 2015) además, su expresión también permite la eliminación de agregados proteicos (Lee et al. 2010a), por lo que juega un papel dual en la muerte y sobrevivencia celular; razón por la cual es de nuestro interés su estudio.

#### **1.5. Metales pesados y envejecimiento**

Como se mencionó en la definición de envejecimiento, uno de los factores involucrados en su avance es el medio ambiente, siendo de nuestro interés la exposición a

metales pesados. Los metales pesados son un grupo de elementos que incluyen a los metales de transición y a otros metaloides, los cuales afectan a los organismos en diferentes formas. Algunos de estos metales (hierro, zinc, cobre y manganeso) tienen funciones esenciales en los organismos y son tóxicos a concentraciones elevadas; sin embargo, otros xenobióticos como el arsénico, el cadmio, el plomo, el mercurio y el cromo son altamente tóxicos a cualquier concentración. De forma general se ha encontrado que los metales pesados ejercen cinco mecanismos generales de toxicidad: generación de ERO, daño al ADN y a sus mecanismos de reparación, interferencia de la función de la membrana y la asimilación de nutrientes, perturbación de la homeostasis proteica y modificaciones epigenéticas (Tamás et al. 2014, Lemire, Harrison, & Turner 2013, Beyersmann & Hartwig 2008, Wysocki & Tamás 2010, Singh et al. 2011). A nivel molecular, los metales pesados desplazan a los metales con funciones esenciales de sus sitios activos, disminuyendo la actividad catalítica, las cadenas aminoacídicas son oxidadas por las ERO, siendo más susceptibles los grupos tiol (Tamás et al. 2014, Beyersmann & Hartwig 2008).

En esta investigación se estudiaron los efectos tóxicos del cadmio, el mercurio y dosis altas de zinc en el envejecimiento, los cuales al igual que el zinc pertenecen al grupo 12 de la tabla periódica, mostrando patrones similares en su configuración electrónica (específicamente en los orbitales más externos) y al ser divalentes, su comportamiento químico puede ser similar.

### **1.5.1. Zinc**

El zinc es un metal divalente que es esencial para la homeostasis celular tanto de eucariotas superiores como inferiores, participando en la regulación de la síntesis de ADN, en la mitosis, en la trasducción de señales, modula el metabolismo de segundos mensajeros, la actividad de cinasas y fosfatasa, también es un componente estructural de proteínas, enzimas y TFs. Debido a su importancia, la célula mantiene una fina regulación en su homeostasis, controlando sus niveles de captura y eliminación, y su secuestro en vesículas de resguardo (zincosomas), así como su distribución nuclear, citoplasmática y en los organelos (Beyersmann & Hartwig 2008, Beyersmann & Haase 2001).

Aproximadamente el 30-40% de zinc presente en una célula se localiza en el núcleo y el 50% en el citosol y los organelos donde la mayor parte se encuentra asociado a proteínas

o forma complejos con aniones, el restante se encuentra asociado a las membranas; esta regulación se encuentra mediada por transportadores de zinc, los cuales pueden ser importadores y exportadores, así como de proteínas de unión a zinc que son las metalotioneínas, las cuales donan el  $Zn^{2+}$  a enzimas y TFs con dominios dedos de zinc, además también funcionan como centros de resguardo cuando la concentración citosólica del zinc libre aumenta (Beyersmann and Haase 2001).

Los transportadores de zinc pertenecen a una familia de proteínas transmembrana. Esta familia se divide en proteínas ZnT y ZIP, las primeras transportan al metal fuera de la membrana plasmática o de organelos cuando las concentraciones son altas, mientras que los transportadores ZIP permiten su ingreso cuando las concentraciones son bajas. Ambos transportadores son expresados en una amplia gama de células y tejidos (Beyersmann & Haase 2001, Myers 2015).

Otra familia de proteínas que regulan las concentraciones del zinc son las metalotioneínas, en *H. sapiens* se distribuyen en todo el organismo, en mayor cantidad en el hígado y riñones. Su síntesis es dependiente del zinc disponible en la dieta, así como de la cantidad de His y Cys presente en el organismo. Además, funcionan como proteínas desintoxicadoras ante la exposición a metales pesados como el mercurio y el cadmio (Thirumoorthy et al. 2011).

### **1.5.2. La homeostasis de zinc en *S. pombe***

A pesar de que *S. pombe* es un modelo excepcional para el estudio de procesos celulares, el sistema de regulación de iones se encuentra poco estudiado, hasta ahora se han descrito dos genes requeridos para la adquisición de zinc; los *zrt1* y *2* y para su conservación el *adh4*. Se ha encontrado que el transportador Zrt1 es esencial para la proliferación celular cuando la levadura de fisión se encuentra en medio con depleción de zinc, además, su delección disminuye el zinc citoplasmático, lo que sugiere que éste, es un sistema de transporte de alta afinidad; mientras que el transportador Zrt2 es de baja afinidad (Boch et al. 2008, Dainty et al. 2008); cabe resaltar que se encuentran anotados en la base de datos los siguientes homólogos para transportadores como SPCC126.09, SPAP8A3.03 y SPAC17D4.03c. También se encuentra un exportador de zinc, *Zhf1*, que se localiza en el retículo

endoplásmico, se ha demostrado que contribuye a la compartimentalización celular y a la desintoxicación de cadmio (Borrelly et al. 2002).

Otra proteína reguladora de la homeostasis de zinc presente en *S. pombe* es la metalotioneína Zym, que se regula positivamente en presencia de altas concentraciones de zinc en el medio así como el cadmio (Borrelly et al. 2002).

Debido a la falta de estudios sobre los sistemas de homeostasis del zinc, decidimos estudiar los transcritos de *zrtI*, *zhfI* y de la metalotioneína *zymI*, determinar si sus niveles se modificaban en el CLS de la levadura bajo la exposición a cadmio y mercurio, además, decidimos comparar los cambios inducidos por estos metales con una concentración tóxica de zinc y determinar si al pertenecer al mismo grupo pudiesen tener patrones similares de toxicidad.

### **1.5.3. Cadmio**

El cadmio tiene la capacidad de unirse a los aminoácidos Cys, Glu, His y Asp, además al ser un catión divalente puede desplazar al zinc de sus sitios activos, también disminuye al zinc lo que induce su deficiencia y por ende la disminución en la proliferación celular (Jaishankar et al. 2014). La toxicidad del cadmio depende de la concentración, así como del tiempo de exposición, sin embargo, su toxicidad a bajas concentraciones se amplifica como consecuencia del elevado tiempo de vida media del metal, 20- 30 años, además, se ha asociado al bloqueo de la fosforilación oxidativa, a la depleción de glutatión, a la inhibición de actividad enzimática, a la producción de ERO, daño al ADN, así como a la disminución de la síntesis y agregación de proteínas, y a la muerte celular (Chatterjee, et. al. 2014)

El cadmio también puede inducir la muerte por apoptosis y la autofagia, en mamíferos la autofagia se ha implicado como respuesta de las células madre a diferentes concentraciones del metal (Di Gioacchino et al. 2008). En células MES-13 los niveles citosólicos elevados de cadmio aumentan las concentraciones de calcio, activando la vía de las ERK, que en mamíferos induce la autofagia, por otro lado también se activó el programa de muerte celular por apoptosis (Son et al. 2011).

Los mecanismos de toxicidad del cadmio como daño al ADN y pérdida de la proteostasis (desregulación de la autofagia y agregación proteica), son también los biomarcadores del envejecimiento, por lo que es de interés saber cómo la exposición a este metal modula el CLS de *S. pombe*.

#### **1.5.4. Mercurio**

El mercurio existe principalmente en tres formas: como elemento metálico, sal inorgánica y compuestos orgánicos, y cada una posee diferente toxicidad y capacidad de bioacumulación, sin embargo, todas las formas se encuentran en medios acuosos. A temperatura ambiente, el mercurio ( $\text{Hg}^0$ ) es un metal líquido debido a su alta presión de vapor y puede ser liberado al ambiente en forma de vapor de mercurio. También, existe como un catión con un estado de oxidación  $+1$  y el ión  $\text{Hg}^{+2}$  no es estable en condiciones ambientales, razón por la cual forma con facilidad compuestos estables de solubilidad baja, por ejemplo, con cloro ( $\text{HgCl}_2$ ) (Esteban 2015).

Este metal puede alterar la función celular a través de la unión a grupos sulfidrilo y selenohidrilo de proteínas, modificando su estructura nativa y por lo tanto su función, aunque también se une a grupos fosforil, carbonil, amida y amina, afectando procesos celulares como inhibición de la síntesis de ADN y ARN, daño al ADN, producción de ERO y muerte celular.

Al igual que el cadmio, el mercurio se ha asociado a la muerte celular y a la modulación de la autofagia en líneas celulares: dosis bajas de mercurio [ $5 \mu\text{M}$ ] en la línea celular U-937 induce muerte a través de una vía no apoptótica (Ben-Ozer et al. 2000), además, esa misma concentración induce la muerte por apoptosis en hepatocitos de ratas induciendo conjugación del complejo Atg5-Atg12-Atg8 a través de la activación de la vía de las ERK (S. et al. 2012).

## **2. Justificación**

Las predicciones poblacionales de la CONAPO muestran que para el año 2050 la mayor parte de la población se encontrará envejecida, lo que se asociará a un aumento en la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas, las cuales disminuyen la calidad de vida de los pacientes, esto implicará un aumento del gasto público, mismo que la sociedad mexicana no está preparada para afrontar, por lo que es imperativo el estudio de las bases moleculares del envejecimiento, así como de posibles terapéuticas.

El estudio del envejecimiento es complejo en eucariotas superiores, por lo que eucariotas inferiores como la levadura *S. pombe* han permitido la elucidación de vías de sensado de nutrientes relacionadas con la longevidad, así como de procesos como la autofagia, la muerte celular y la regulación de iones como el zinc. Por ello el estudio de los procesos celulares en

la levadura permite obtener resultados con alta trazabilidad, equiparables y a menor costo que otros modelos, haciéndolo un modelo válido.

### **3. Planteamiento del problema**

Uno de los factores asociados al envejecimiento es el medio ambiente, como la exposición a metales pesados como el cadmio y el mercurio, los cuales pertenecen al mismo grupo de la tabla periódica que el zinc, poseen una configuración electrónica similar y son divalentes, por lo que su comportamiento químico puede ser similar. Además, se ha encontrado que su exposición induce la muerte y modula la autofagia. Razones por las cuales el cadmio y el mercurio pudiesen modificar los patrones de expresión génica de proteínas atg, la sobrevivencia celular, así como de proteínas relacionadas a la homeostasis de zinc como *zrt1*, *zhf1* y *zym*.

Se han propuesto modelos de exposición aguda en la levadura *S. cerevisiae*, pero dicho modelo posee varias desventajas ya que no realiza modificaciones postranscripcionales y postrasduccionales complejas como los eucariotas superiores, no así *S. pombe*.

### **4. Hipótesis**

La exposición de  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$  en el envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe* modifica su morfología, expresión génica y la autofagia.

### **5. Objetivos**

#### **5.1. Objetivo general**

Determinar el efecto de la exposición a  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$  en el envejecimiento cronológico de *S. pombe*

#### **5.2. Objetivos particulares**

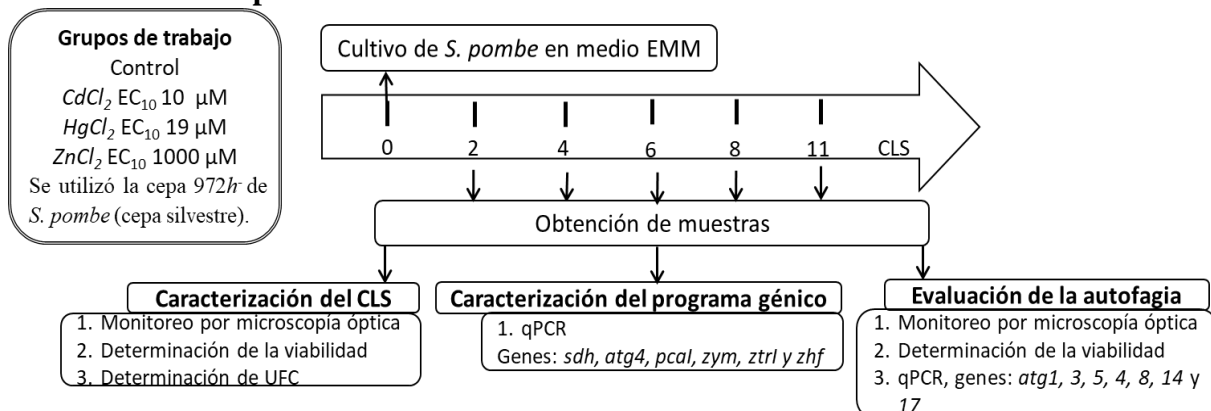
- Caracterizar el CLS de *S. pombe* después de la exposición a  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ .
- Determinar los niveles de los transcritos *sdh*, *atg4*, *pca1*, *zym*, *zrt1* y *zhf* en el CLS de *S. pombe* después de la exposición a  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ .
- Determinar el estado de la autofagia en el CLS de *S. pombe* después de la exposición a  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ .

## **CAPÍTULO II**

### **METODOLOGÍA**

## 6. Metodología

### 6.1. Diseño Experimental



\*Se envejecieron a las células durante 2, 4, 6, 8 y 11 días.

### 6.2. Caracterización del CLS de *S. pombe* en presencia de $CdCl_2$ , $HgCl_2$ y $ZnCl_2$

#### 6.2.1. Cultivo de *S. pombe* en CLS, UFCs y evaluación de la viabilidad celular

A partir de una placa de medio YE se tomó una colonia de *S. pombe* y se dejó crecer en 50 mL de medio YE durante 48 h en agitación constante a 29 °C, después se observó la morfología celular en el microscopio de contraste de fases y se tomó una alícuota de 100  $\mu L$  de cultivo, a la que se le adicionaron 900  $\mu L$  de agua para medir su absorbancia en el espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 600 nm. Utilizando la **ecuación 1**, se tomó el volumen necesario para hacer 4 cultivos de 100 mL (cada uno) de medio EMM (con glucosa, vitaminas y minerales) y se cultivaron durante 2, 4, 6, 8 y 11 días a 29 °C.

$$\frac{[(100 \text{ mL})(0.4)]/2^n}{(A)(fd)}$$

**Ecuación 1.** Para la obtención del volumen necesario de un cultivo de 20 mL. Donde: A es la absorbancia, fd el factor de dilución y n es el número de generaciones que se espera en el cultivo.

Para el caso de los grupos expuestos a los metales pesados se cultivó a *S. pombe* bajo las condiciones anteriormente descritas y al cultivar las células en medio EMM con glucosa, vitaminas y minerales, se agregó la  $EC_{10}$  de  $CdCl_2$  [10  $\mu M$ ] (Wu et al. 2016),  $HgCl_2$  [19  $\mu M$ ] (Jin et al. 2008) y  $ZnCl_2$  [1000  $\mu M$ ] (Jin et al. 2008). Ya que la exposición a metales pesados en humanos no es a concentraciones letales decidimos utilizar la  $EC_{10}$ , que es la concentración que produce un efecto en el 10% población de estudio en un tiempo dado, cabe destacar que esta concentración ya ha sido determinada para *S. cerevisiae* (Jin et al. 2008).

El tiempo de exposición a los metales fue de 2 h (tiempo que se ha expuesto a la levadura *S. cerevisiae* en otros estudios) (Wu et al. 2016, Jin et al. 2008), se centrifugaron las células a 6000 rpm 5 min, luego se lavaron con SSI estéril y se adicionó medio fresco EMM con vitaminas y minerales, se obtuvieron las células en CLS2, 4, 6, 8 y 11, en los que se observó la morfología en el microscopio de contraste de fases. En los días de CLS antes mencionados se realizó el ensayo de unidades formadoras de colonias (UFCs), para lo cual se realizaron 6 diluciones seriales ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-12}$ ) y con un asa calibrada de 1  $\mu$ L se realizó un plaqueo por triplicado en placas de medio YE, se incubaron a 29 °C durante 48 h, se fotografiaron y se cuantificaron las UFCs en el programa *ImageJ NHI*. Los resultados se graficaron y analizaron en el programa *GraphPad Prism5*, se realizó un análisis estadístico de tipo ANOVA de 2 vías con un post-test *Bonferroni*. Para evaluar la viabilidad celular se lavaron las células con SSI, se les agregaron 5 mg L<sup>-1</sup> de Floxina B, se incubaron 20 minutos a 29 °C, después se centrifugaron 5 min a 6000 rpm, se lavaron 2 veces con PBS estéril, y se resuspendieron en 70  $\mu$ L de SSI, se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L y se colocó en un portaobjetos, se dejó secar, se agregaron 2  $\mu$ L de NaOH al 10% y 2  $\mu$ L de calcoflúor, se colocó un cubreobjetos y después se observaron en un microscopio de fluorescencia, se tomaron fotografías a 40 con un filtro azul y rojo, las fotografías se procesaron y analizaron en el programa *FIJI NHI*.

### **6.3. Modificación del programa génico de *S. pombe* en presencia de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>**

#### **6.3.1. Extracción de ARN**

Se empaquetaron 10 mL de los grupos experimentales, el paquete celular se lavó 1 vez con agua estéril, luego se hizo una disrupción enzimática de la pared celular con 0.2 mg de zimoliasa 20 T solubilizada en 60  $\mu$ L de buffer de zimoliasa a 37 °C durante 45 min, antes de proceder a la extracción se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L y se observó al microscopio para verificar la morfología. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 300  $\mu$ L de TRIzol y se resuspendió el paquete celular de forma cuidadosa hasta obtener una solución homogénea y viscosa, se incubó a temperatura ambiente 5 min, se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y estéril, se agregaron 80  $\mu$ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 30 seg, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 12000 g durante 15

min a 4 °C. Después de la centrifugación se aprecian tres fases: en la fase orgánica (color rosa) se encuentran las proteínas, en la interfase (color blanco) se encuentra el ADN y lípidos, y en la fase acuosa (transparente) se encuentra el ARN total, se tomó la fase acuosa teniendo cuidado de no tomar residuos de las otras fases, se pasó a un tubo limpio y estéril, se agregó 1 volumen de isopropanol frío, se incubó a -20 °C durante 1 h. Se centrifugó 10 min a 12000 g a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 350 µL de etanol frío al 75%, se centrifugó 10 min a 7000 g a 4 °C, se eliminó el etanol y se permitió la evaporación de residuos del mismo para después resuspender en 50 µL de agua libre de nucleasas, la muestra se incubó 10 min a 55 °C para eliminar las estructuras secundarias del ARN, inmediatamente después se colocó en hielo y se hicieron alícuotas de 5 µL, las cuales se guardaron a -80 °C.

Para determinar la integridad del ARN, se sometieron 2 µL de muestra a un corrimiento electroforético a 100 V durante 30 min, utilizando buffer TBE al 0.5X, en un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio; el gel se observó en un transiluminador UV (U1001) y se fotografió, se observaron las bandas de ARN ribosomales íntegras. Por otra parte, se cuantificó y evaluó por espectrometría utilizando un NanoDrop 2000c *Thermo SCIENTIFIC*, se recabaron los valores de las absorbancias a  $A_{230\text{nm}}$ ,  $A_{260\text{nm}}$  y  $A_{280\text{nm}}$  y se determinó la pureza mediante las relaciones  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  y  $A_{230\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$ ; la primera relación debe tener un valor arriba de 1.8-2.1 y la segunda entre 2.0 a 2.2, cada una de las muestras contaba con dichos valores.

### 6.3.2. qPCR

#### 6.3.2.1. Generación de curvas estándar de los genes *sdh*, *atg4*, *pcaI*, *zym*, *zrtI* y *zhf*

Los genes de estudio son: *atg4* (gen relacionado a la autofagia), *pcaI* (gen de metacaspasa, relacionada con la cascada apoptótica y de sobrevivencia), *zym* (metalotioneína de unión a zinc), *zrtI* (gen del importador de alta afinidad de zinc) y *zhf* (gen del importador de zinc en el retículo endoplásmico o factor de homeostasis de zinc) y el gen endógeno *sdh* (gen de baja expresión). Los oligonucleótidos utilizados para los genes *sdh*, *atg4* y *pcaI* fueron diseñados por (Segundo 2015), para los genes *zym*, *zrtI* y *zhf* se diseñaron dos pares de primers utilizando el programa *OligoAnalyzer 3.1*. Se determinó que los oligonucleótidos amplificaran un solo producto de PCR por lo que se generaron curvas disociación en el termociclador de tiempo real.

Existen varios métodos de cuantificación en PCR en tiempo real (qPCR), entre los que destacan el método  $\Delta\Delta C_t$  y el relativo a la curva estándar. Para determinar cuál era el método apropiado se generó una curva estándar para cada gen. Para ello se realizó lo siguiente: se trataron 500 ng de ARN total de un día de cultivo con DNasa (**Tabla 3**) utilizando el kit DNase I, RNase free (*Thermo Scientific*); después, se realizó la síntesis del ADNc (**Tabla 4**) utilizando el kit ReverAid First Strand cDNA Synthesis (*Thermo Scientific*), finalizada la reacción se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas (dilución 1:5) para obtener una concentración final de 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de ADNc, las reacciones de qPCR se llevaron a cabo empleando la mezcla de reacción y condiciones del termociclador (**Tabla 5 y 6**, respectivamente); se cargó cada pozo con 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción, se incluyó un control negativo por cada gen; la curva estándar se construyó con 5 puntos (por triplicado). Concluidas las reacciones de qPCR se graficó el promedio de los  $C_t$  obtenidos contra el logaritmo (base 10) de la concentración de ARN y se hizo una regresión lineal en el programa *GraphPad Prism5*, después se calculó el porcentaje de eficiencia de cada gen, al ser mayor que 1 la diferencia de eficiencias de los genes de interés con el de referencia se optó por utilizar el método de la curva estándar.

**Tabla 3. Tratamiento con DNasa.** Se utilizó el kit DNase I, RNase free (*Thermo Scientific*).

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Temperatura de incubación ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo de incubación (min)
ARN (500 ng)	1	37	30
DNasa	0.5		
Buffer de DNasa	0.5		
$\text{H}_2\text{O}$ (cbp 5 $\mu\text{L}$ )	2		
EDTA	1	65	10
Volumen final	5		

**Tabla 4. Condiciones de reacción para la síntesis de ADNc.** Se utilizó ARN tratado con DNasa (Tabla 1) y el kit ReverAid First Strand cDNA Synthesis (*Thermo Scientific*).

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Temperatura de incubación ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo de incubación (min)		
ARN (500 ng tratado con DNasa)	5	42	60		
Primer Oligo (dT)	0.2				
Buffer de reacción 5X	2				
Mezcla de dNTP 10 mM	1				
Ribolock RNase Inhibitor	0.2			70	5
RevertAid M-MulV Reverse Transcriptase	0.2				
$\text{H}_2\text{O}$ libre de nucleasas (cbp 10 $\mu\text{L}$ )	1.4				
Volumen final	10				

**Tabla 5. Condiciones de reacción para la construcción de curvas estándar por qPCR.** Cada mezcla se dividió en tres para obtener el triplicado de la reacción.

ADNc (ng)	Maxima SYBER Green/Rox qPCR Master Mix (2x) (μL)	Primer sentido (10 pmol/μL) (μL)	Primer antisentido (10 pmol/μL) (μL)	ADNc (10 ng/μL) (μL)	H <sub>2</sub> O (μL) (cbp 10 μL)/Rx
20	15	1.5	1.5	6	6
10	15	1.5	1.5	3	9
5	15	1.5	1.5	1.5	10.5
2.5	15	1.5	1.5	0.75	11.25
1.25	15	1.5	1.5	0.37	11.62

**Tabla 6. Condiciones del termociclador para la amplificación del ADNc para las curvas estándar más la curva de disociación.** \*Temperatura donde se lleva a cabo la lectura.

	Temperatura (°C)	Tiempo	No. De ciclos
Pre desnaturalización	95	10 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	
Alineamiento	60	30 seg	40
Polimerización	72*	30 seg	
Curva de disociación	95	15 seg	
	60	60 seg	1
	95*	15 seg	

### 6.3.2.2. Ensayos de qPCR con cuantificación relativa por el método de la curva estándar para los genes *sdh*, *atg4*, *pcaI*, *zym*, *zrtI* y *zhf*

Para la obtención de los niveles de transcripción de cada gen en los días de cultivo 2, 4, 6, 8 y 11, en los grupos control, CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>, se realizaron reacciones de qPCR para cada gen y día por triplicado, en cada ensayo se realizó lo siguiente: se realizó el tratamiento con DNasa (**Tabla 3**) a 300 ng de ARN, se hizo la retrotranscripción (**Tabla 4**), después se agregaron 40 μL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (dilución 1:5) para obtener una concentración final de 6 ng/μL de ADNc, la reacción de qPCR (por triplicado) se realizó empleando 1.25 ng de ADNc (**Tabla 7**) y se usaron las condiciones del termociclador antes descritas (**Tabla 5**). Finalizados los ensayos los resultados fueron exportados al programa *GraphPad Prism 5*, donde fueron extrapolados para obtener la concentración de cada gen a partir del Ct obtenido con su correspondiente curva estándar; después en el programa *Excel* se calculó la relación entre la concentración del gen de interés y el gen de referencia del mismo día. Los resultados se analizaron en el programa *GraphPad Prism 5*, se utilizó una ANOVA de 2 vías con post test *Bonferroni*.

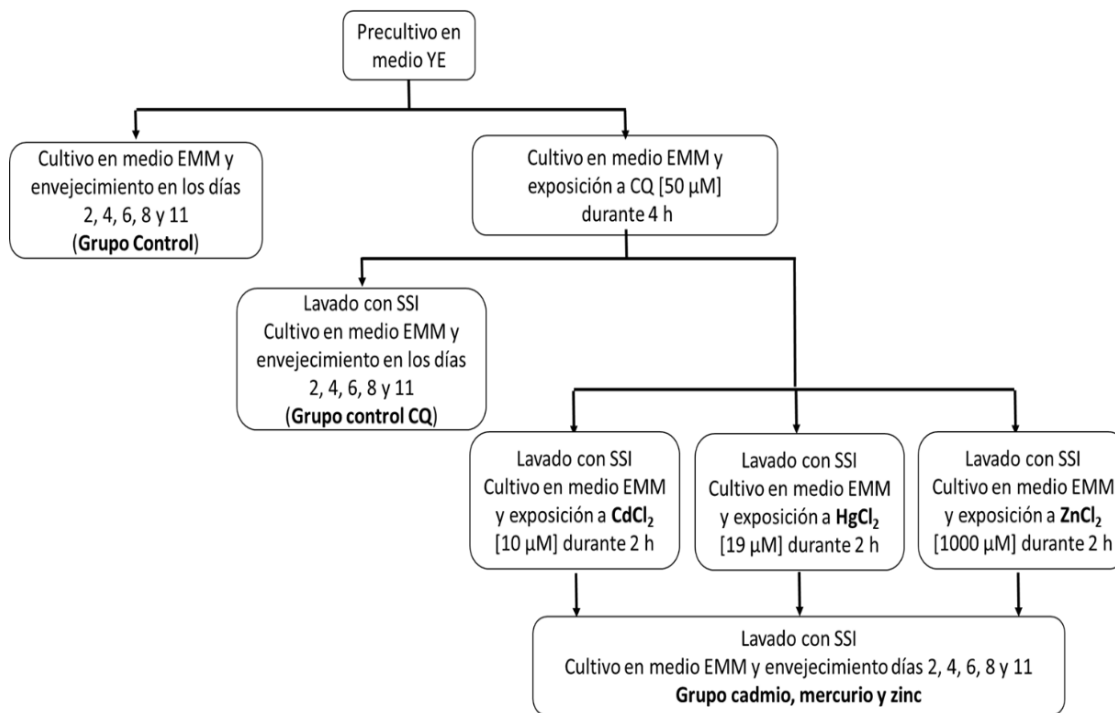
**Tabla 7. Mezcla de reacción para la amplificación del ADNc por qPCR.** La mezcla contiene el volumen necesario de cada reactivo para un triplicado de cada gen.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Maxima SYBER Green/Rox qPCR Master Mix (2x)	15
Primer sentido (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1.5
Primer antisentido (10 pmol/ $\mu\text{L}$ )	1.5
ADNc (6 ng/ $\mu\text{L}$ )	0.625
H <sub>2</sub> O	11.375

#### 6.4. Evaluación de la autofagia en el CLS de *S. pombe* después de la exposición a CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>

##### 6.4.1. Ensayo de inhibición de la autofagia

Se cultivó a *S. pombe* en 50 mL de medio YE durante 48 h a 29 °C, se hizo un cultivo de 375 mL de medio EMM (adicionado con glucosa, vitaminas y minerales), se dividió en 2 partes (una de 75 mL y la otra de 300 mL), al medio con el volumen menor se fotografió después de 4 h de cultivo y se envejeció durante 2, 4, 6, 8 y 11 días. Al medio con volumen mayor se le agregó CQ [50  $\mu\text{M}$ ] y se incubó durante 4 h, después de este tiempo la morfología se observó y se fotografió; se dividió el cultivo en 4 partes iguales (75 mL cada una), se lavaron con SSI y se agregó medio EMM (adicionado con glucosa, vitaminas y minerales), una muestra denominada a partir de este momento control CQ se envejeció durante 2, 4, 6, 8 y 11 días. A las tres muestras restantes se les agregó la EC<sub>10</sub> de los metales CdCl<sub>2</sub> [10  $\mu\text{M}$ ] (Wu et al. 2016) ó HgCl<sub>2</sub> [19  $\mu\text{M}$ ] (Jin et al. 2008) ó ZnCl<sub>2</sub> [1000  $\mu\text{M}$ ] (Jin et al. 2008), se incubaron las muestras durante 2 h, posteriormente se fotografiaron y lavaron con SSI, se les agregó medio EMM (adicionado con glucosa, vitaminas y minerales) y se envejecieron durante 2, 4, 6, 8 y 11 días. A todos los grupos experimentales (control, control CQ, cadmio, mercurio y zinc) en todos los días de estudio se les observó en el microscopio de contraste de fases y se realizaron ensayos de viabilidad celular con los fluoróforos calcoflúor y floxina B, siguiendo la metodología de la **sección 6.2.1**. A continuación, se muestra el diagrama experimental.



#### 6.4.2. Ensayo de inducción de la autofagia

Se cultivó a *S. pombe* en medio YE durante 24 h a 48 °C, se cambió a medio EMM, vitaminas, minerales y se expuso a la EC<sub>10</sub> durante 2 h a CdCl<sub>2</sub> [10 µM] (Wu et al. 2016), HgCl<sub>2</sub> [19 µM] (Jin et al. 2008) y ZnCl<sub>2</sub> [1000 µM] (Jin et al. 2008), luego las células se lavaron y adicionó medio EMM con glucosa, vitaminas y minerales, los minerales utilizados para este ensayo no contenían ZnSO<sub>4</sub> para que la inanición del metal indujera autofagia, se obtuvieron las células en CLS2, 4, 6, 8 y 11, en los que se monitorizó la morfología en el microscopio de contraste de fases, la viabilidad celular con calcoflúor y floxina B, así como la capacidad para reingresar al ciclo celular a través del ensayo de UFCs.

#### 6.4.3. Evaluación de la autofagia

Bajo las condiciones antes descritas de inducción de autofagia y la exposición a metales pesados de 2 h del objetivo particular uno, se evaluaron los transcritos de las proteínas relacionadas a la autofagia *atg1*, *3*, *4*, *5*, *8*, *14* y *17* a través de qPCR, utilizando las condiciones descritas en las **tablas 3-7**.

También se utilizó microscopía de fluorescencia para naranja de acridina. Las células se lavaron con PBS estéril, se les agregaron 500 µL de SSI y 50 µL de naranja de acridina [5 µg/ mL], se incubaron 15 min a 29 °C en agitación, después se centrifugaron 5 min a 6000

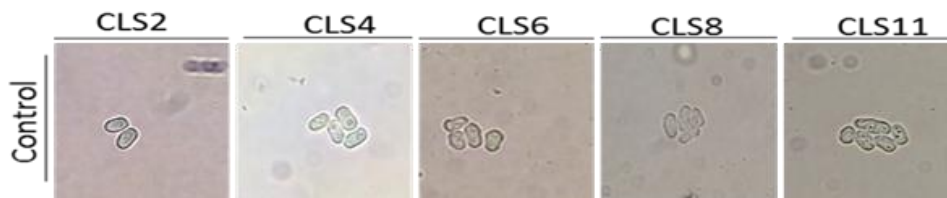
rpm, se lavaron con PBS, nuevamente se centrifugaron bajo las mismas condiciones, se resuspendieron en 70  $\mu$ L de SSI estéril, se tomó una alícuota de 5  $\mu$ L y se montaron, inmediatamente antes de que se secan por completo se les colocó un cubreobjetos, posteriormente se observaron en un microscopio de fluorescencia.

**CAPÍTULO III**  
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Grupo control

Ya que el envejecimiento cronológico de *S. pombe* ya se ha caracterizado (Lin & Austriaco 2013, Fabrizio & Longo 2008, Roux et al. 2010, Roux et al. 2009, Roux et al. 2006, Rosas-Murrieta 2015) se decidió reproducirlo en nuestras condiciones experimentales. Se obtuvieron células jóvenes en los días 2 y 4 de cultivo, las células envejecidas se recuperaron los días 6, 8 y 11. El CLS se caracterizó utilizando microscopía óptica (**Figura 5**) y de fluorescencia (**Figura 6**), las cuales permiten observar diferencias en la morfología celular brindando información complementaria, además, se realizó el ensayo de UFCs (**Gráfica 1**) para determinar su capacidad de entrar en el ciclo celular. En la microscopía de contraste de fases (**Figura 5**) se observaron células bacilares con extremos hemisféricos, con pared celular bien definida y población homogénea, características propias de células jóvenes, en el CLS6 las células comienzan a mostrar un fenotipo de envejecimiento celular, como tamaño heterogéneo, engrosamiento de la pared celular, aglomeración, inducción de gránulos de estrés y disminución del volumen celular, este fenotipo se enfatiza en los CLS8 y 11.

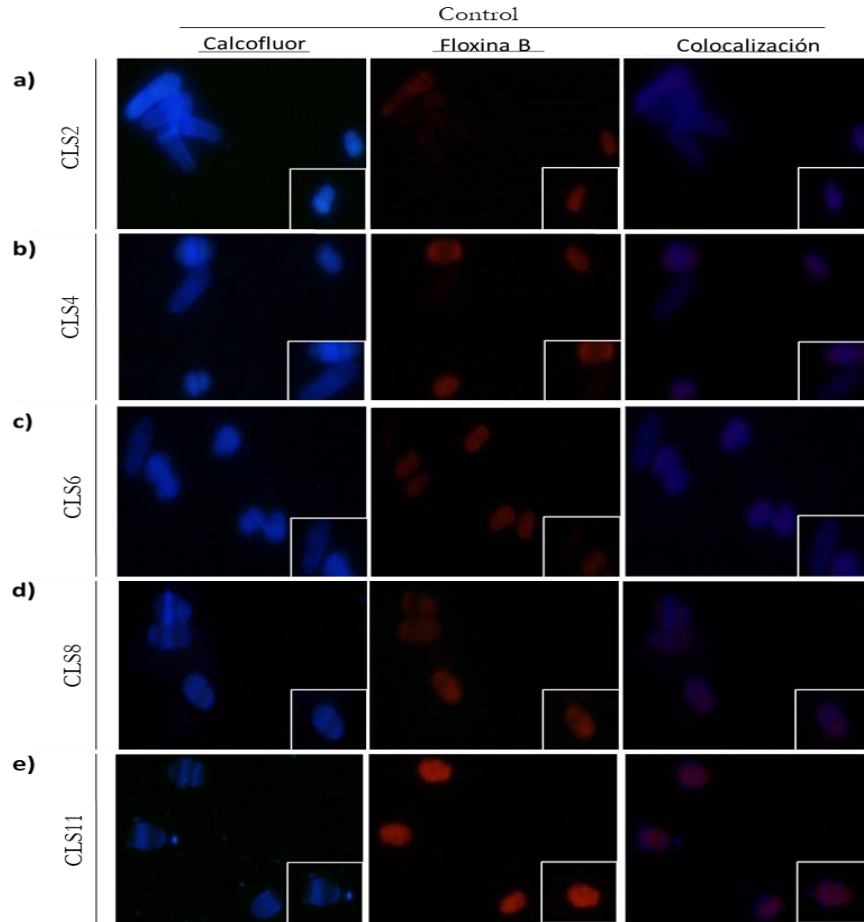


**Figura 5. Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de *S. pombe*.** Se hizo un precultivo de *S. pombe* en medio YE y al alcanzar la fase estacionaria se cambió a medio EMM con glucosa, vitaminas y minerales, se observaron los cambios morfológicos en CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.

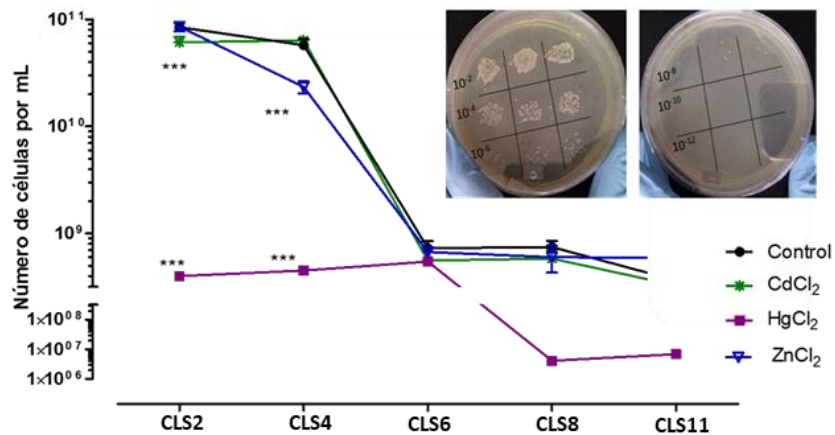
Para las microscopías de fluorescencia se utilizaron los fluoróforos: floxina B y calcoflúor. La floxina B ingresa al citoplasma de las células muertas o con compromiso energético, mientras que el calcoflúor es un fluoróforo que se une a quitina y permite observar la integridad de la pared celular de la levadura. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia utilizando los filtros rojo y azul (floxina B y calcoflúor, respectivamente), las fotografías obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI* para realizar la colocación de la señal correspondiente, el resultado esperado es un color morado dado que, si una célula se tiñe de rojo con floxina B, al empalmarse con la señal de su pared celular (azul) el color obtenido será morado, las células que sólo se encuentran teñidas de azul son las células vivas o energéticamente viables.

En la microscopía de fluorescencia se observa que mediante la tinción de calcoflúor hay un número mayor de células septadas en los CLS2 y 4 (**Figura 6 a-b**), indicando que se encuentran en división celular, pero se observan menos células por campo con esta característica en los CLS6, 8 y 11 (**Figura 6 c-e**), lo que sugiere senescencia celular; en la tinción de floxina B se observa que en los CLS2 y 4 la señal es menor y difusa, lo que es indicativo de un buen estado energético celular, sin embargo en los CLS6, 8 y 11 la intensidad de la fluorescencia aumenta, con lo que se concluye que mientras mayor es el grado de envejecimiento la capacidad energética disminuye ya que hay un aumento de células muertas; los resultados de las dos tinciones se confirmaron al realizar la colocalización, así, en las muestras jóvenes hay un mayor número de células que no colocalizan (vivas) y este número disminuye en los CLS6, 8 y 11.

Por otra parte, en la **gráfica 1** (línea negra) se aprecia que en el grupo control disminuye la capacidad de entrar al ciclo celular respecto a los días de envejecimiento, lo que se correlaciona con la morfología, es decir, hay células en división celular que disminuyen su capacidad de entrar al ciclo celular a partir del CLS6. Estos resultados concuerdan con las características ya reportadas, en donde se ha determinado que en el CLS6 la mitad de la población celular muere y a partir de este día se presenta el fenotipo de envejecimiento, evidenciando que nuestro modelo de estudio es reproducible (Roux et al. 2006, Roux et al. 2009, Roux et al. 2010).



**Figura 6.** Determinación de la viabilidad celular en el envejecimiento cronológico de *S. pombe*. Las células se expusieron a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de floxiina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa FIJI NHI. Vista a 40X.

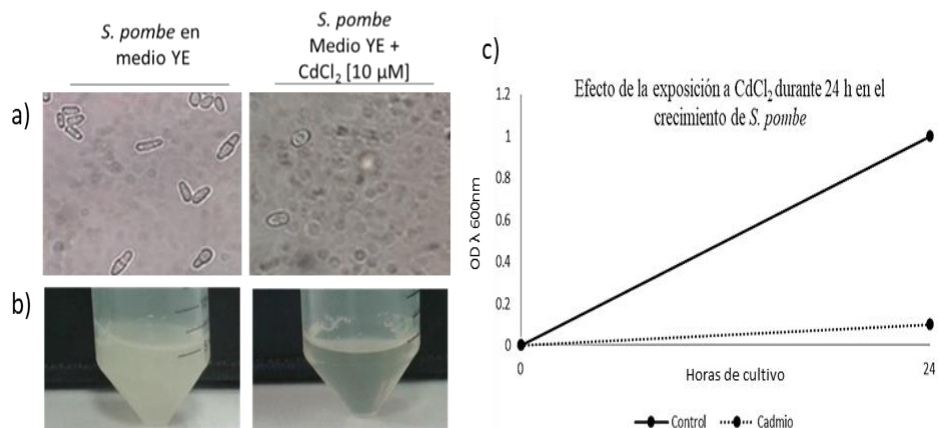


**Gráfica 1.** Unidades formadoras de colonias de *S. pombe* después la exposición de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> en el envejecimiento cronológico. En los CLS 2, 4, 6, 8 y 11 a los grupos control, CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> se les hicieron diluciones seriales y se realizó el método de unidades formadoras de colonias, las placas se incubaron 48 h a 29 °C. Los resultados se analizaron en el programa ImageJ, se graficó en el programa GraphPad Prism5 y se realizó una ANOVA de 2 vías con post test Bonferroni, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el CLS2 en el grupo CdCl<sub>2</sub> vs control

\*\*\*P<0.001, en el grupo HgCl<sub>2</sub> vs control se encontraron diferencias en los CLS2 y 4 con \*\*\*P<0.001 y en el grupo ZnCl<sub>2</sub> vs control se encontraron diferencias en el CLS4 con \*\*\*P<0.001.

## 7.2. Caracterización del envejecimiento cronológico de *S. pombe* después de la exposición a la EC<sub>10</sub> de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>

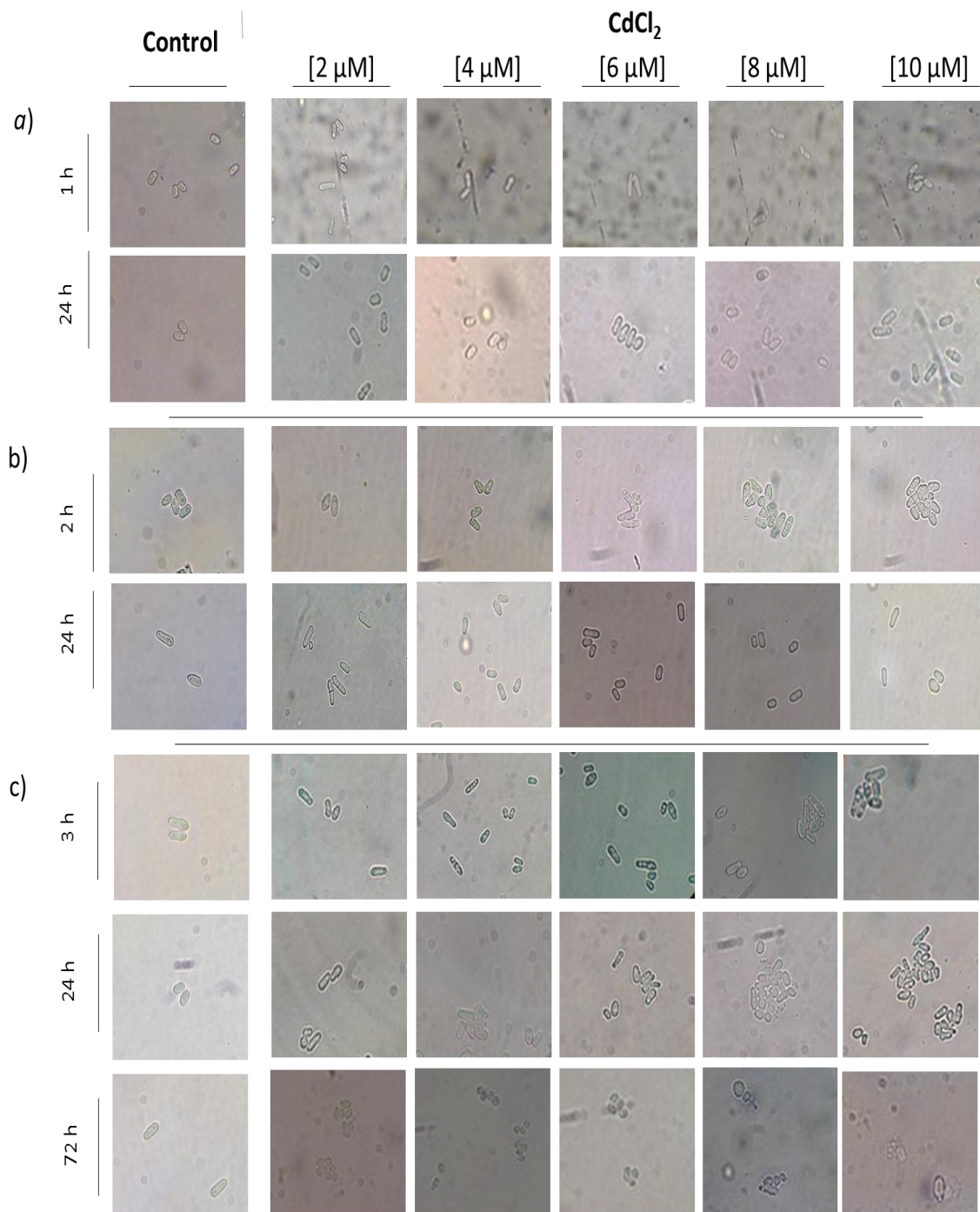
Ya que se debe cultivar a la levadura de fisión en dos medios de cultivo diferentes se estandarizaron las condiciones de exposición a los metales pesados, la primera fue la adición de la EC<sub>10</sub> de CdCl<sub>2</sub> [10 µM] en medio YE durante 24 h (**Figura 7**); se encontró que en el grupo control las células eran cilíndricas, con extremos hemiesféricos, tenían tamaños similares, había células alargadas y con un septo lo que indicaba que se encontraban en división celular; en cambio las células expuestas a CdCl<sub>2</sub> tenían una morfología circular respecto al control y se podía apreciar una estructura redonda dentro de las células (**Figura 7a**), la cual podría ser una vacuola y que podría asociarse a la activación de la autofagia debido a daño proteico y de organelos, así como al proceso de desintoxicación del metal a través de la vacuola. Aunado a esto se observó que a nivel macroscópico la densidad del cultivo celular era pequeña (**Figura 7b**) lo que se evidencia en la cuantificación de la densidad óptica (**Figura 7c**), donde se observa que hay una disminución en la población del grupo cadmio, lo que podría indicar que las células no pueden entrar al ciclo celular y se activa el programa de muerte celular, por lo que se decidieron probar otras condiciones.



**Figura 7. Estandarización de la exposición de *S. pombe* a CdCl<sub>2</sub>.** Se cultivó en medio YE a *S. pombe* sin y con CdCl<sub>2</sub> [10 µM] durante 24 h. En el panel a, el grupo control tiene morfología bacilar, así como células alargadas y con septo, propias de la división celular; en el grupo problema el número de células por campo es menor respecto al problema, la morfología de la levadura es redonda respecto al control, vista a 40X. En b, en el grupo control (medio YE) se observó una mayor densidad en el medio de cultivo, en el grupo problema (medio YE + CdCl<sub>2</sub> [10 µM]) hay una densidad baja respecto al control, este comportamiento se confirma en c, donde se grafica la densidad óptica (OD) respecto a las horas de cultivo en el medio, se encuentra que las células expuestas a cadmio tienen una población menor en comparación al grupo control.

En el siguiente experimento se estandarizaron las concentraciones de CdCl<sub>2</sub>, el tiempo de incubación y la inducción del CLS. Para lo cual, se realizó un precultivo en medio YE durante 24 h, se lavaron las células con SSI y se cultivaron en medio EMM con glucosa, vitaminas y minerales, en el grupo problema se agregó CdCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones [2, 4, 6, 8 y 10 µM], ya que en el experimento anterior la concentración de 10 µM indujo muerte celular se decidieron disminuir las concentraciones del metal incubando durante 1, 2 y 3 h a 29 °C en agitación constante, los intervalos de tiempo se tomaron de reportes con *S. cerevisiae* a los que se obtuvo la EC<sub>10</sub> (10 µM) (Wu et al. 2016, Chen et al. 2003), inmediatamente después de la exposición se fotografiaron los cambios morfológicos (**Figura 8**). Posteriormente, las células se lavaron con SSI, se cultivaron bajo las condiciones antes descritas (sin adicionar CdCl<sub>2</sub>) y se incubaron durante 24 y 72 h, se monitorearon los cambios morfológicos.

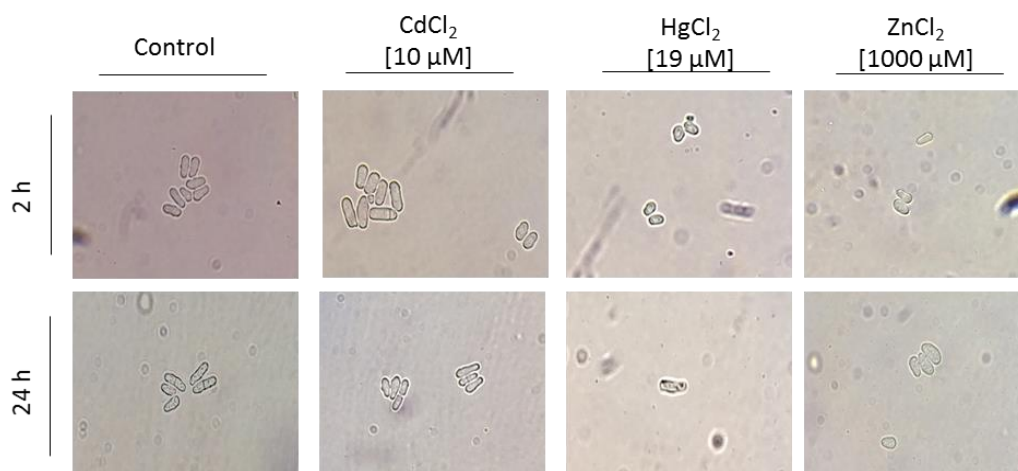
En la **figura 8a** en todas las concentraciones del metal se observaron a las células con una morfología típica, es decir, cilíndricas y con extremos hemisféricos, también se encontró la presencia de células alargadas y con un septo, correspondientes a células en división celular; 24 h después de la exposición se aprecia que conservan una morfología similar al control, por lo que se descartó esta condición. En la **figura 8b** hay aglomeración e inducción de gránulos de estrés en las concentraciones 6, 8 y 10 µM después de la exposición de dos horas, a las 24 h el fenotipo de estrés se mitigó en todas las concentraciones, excepto a la concentración 10 µM (EC<sub>10</sub>) donde se aprecian cambios como reducción de diámetro, vacuolarización y disminución/aumento de volumen celular. Se decidió exponer a las células 3 h a las diferentes concentraciones de cadmio, en la **figura 8c** se aprecia que se mantiene la morfología bacilar, hay inducción de gránulos de estrés y aglomeración celular a 8 y 10 µM, 24 h después hay aglomeración celular y no se apreció crecimiento celular por lo que las células se monitorizaron hasta 72 h después de la exposición, se observa que en todos los grupos hay pérdida de la morfología, aglomeración y disminución de la densidad celular, por lo que este tiempo también se descartó. Por ello se optó por exponer a las células durante 2 h, a la EC<sub>10</sub> reportada (10 µM) ya que a esta concentración se encontraron cambios en la morfología y las células aún eran capaces de entrar al ciclo celular.



**Figura 8. Estandarización de la concentración y tiempo de exposición a CdCl<sub>2</sub> en *S. pombe* y la inducción de envejecimiento cronológico.** Se cultivó a *S. pombe* en medio YE durante 24 horas, después se cambió al medio mínimo EMM con glucosa, minerales y vitaminas, se agregó CdCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones [2, 4, 6, 8 y 10 μM], el tiempo de exposición al metal fue de 1, 2 y 3 h, se lavaron las células y se agregó medio fresco EMM con glucosa, vitaminas y minerales. Se monitorearon los cambios morfológicos de las células inmediatamente después de la exposición y 24 h después. En *a* no se observan cambios significativos morfológicos respecto al control; en *b* hay aglomeración en las concentraciones 6, 8 y 10 μM tras la exposición de dos horas, a las 24 h no hay aglomeración sin embargo, su tamaño y forma es heterogéneo, especialmente en la concentración 10 μM; en *c* después de la exposición y a las 24 h a 6, 8 y 10 μM hay agregación celular y modificaciones en el tamaño y forma de la levadura, a nivel macroscópico no se observó crecimiento celular en el medio de cultivo

se monitorizaron las células hasta 72 h sin embargo, no aumentaron su número y todos los grupos ya habían perdido su forma y tamaño bacilar. Vista a 40X.

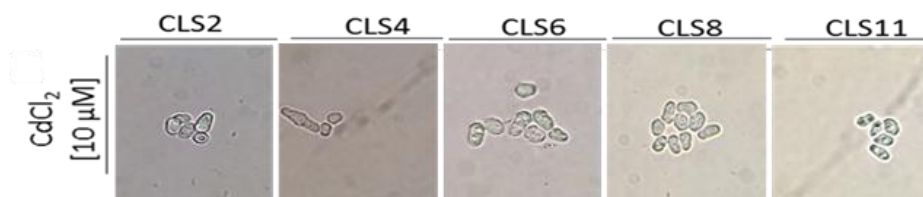
Tomando como referencia las  $EC_{10}$  de  $HgCl_2$  y  $ZnCl_2$  ya reportadas (Wu et al. 2016, Jin et al. 2008) y utilizando el protocolo ya establecido en cadmio, se expuso a las células 2 h a dichos metales (**Figura 9**). Se observa que para los tres metales las células muestran cambios morfológicos después de las 2 h de la exposición y a las 24 h se observa que las células pierden su forma bacilar respecto a las células control, debido a que se encontraron cambios a nivel morfológico después de la exposición a las  $EC_{10}$  de los metales, por lo que se decidió utilizar estas concentraciones para los siguientes experimentos. Para caracterizar el envejecimiento cronológico de la levadura de fisión después de la exposición a las  $EC_{10}$  de  $CdCl_2$ ,  $HgCl_2$  y  $ZnCl_2$  se observó por microscopía de contraste de fases el fenotipo celular y se fotografió en los CLS2, 4, 6, 8 y 11, el cual se comparó con el grupo control sin exposición a algún metal, como complementación se evaluó la viabilidad celular, utilizando tinciones vitales con floxina B y calcoflúor. Por último, para determinar si las células podrían entrar nuevamente al ciclo celular en los días de estudio se realizó la técnica de unidades formadoras de colonias (UFCs) (**Gráfica 1**).



**Figura 9. Estandarización de la concentración y tiempo de exposición a  $CdCl_2$ ,  $HgCl_2$  y  $ZnCl_2$  en *S. pombe* y la inducción de envejecimiento cronológico.** Se cultivó a *S. pombe* en medio YE durante 24 horas, se cambió al medio mínimo EMM con glucosa, vitaminas, minerales y se agregó la  $EC_{10}$  reportada para  $CdCl_2$  [10 μM] (Wu et al. 2016, Yin & Chen 2005),  $HgCl_2$  [19 μM] (Jin et al. 2008) y  $ZnCl_2$  [1000 μM] (Jin et al. 2008), el tiempo de exposición al metal fue de 2 h [26, 27], se lavaron las células y se agregó medio EMM con glucosa, vitaminas y minerales. Se observaron los cambios morfológicos inmediatamente después de la exposición y a las 24 h. En los grupos  $CdCl_2$  y  $HgCl_2$  después de la exposición a 24 h las células experimentan modificación del tamaño celular y pierden la morfología bacilar, para el caso del grupo  $ZnCl_2$  había células bacilares y otras con aumento de volumen celular. Vista a 40X.

### 7.2.1. Grupo cadmio

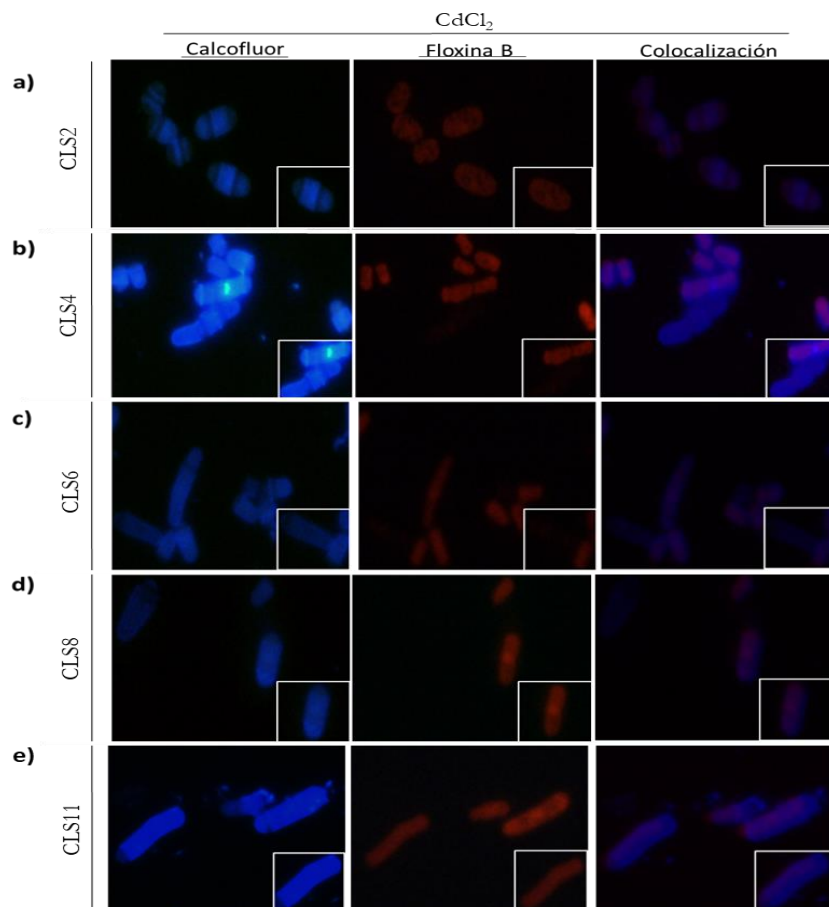
Las células expuestas a  $\text{CdCl}_2$  [ $10 \mu\text{M}$ ] muestran vacuolización, aglomeración y gránulos desde el CLS2, es decir presentan más rápido las características del fenotipo de envejecimiento respecto al control (**Figura 10**), lo que concuerda con experimentos en *S. cerevisiae* donde se observó a través de microscopía electrónica de transmisión y de barrido que la exposición a  $\text{CdCl}_2$  induce pérdida de la integridad y morfología de la pared celular, también se demostró que hay una disminución de la concentración de potasio citoplasmático y un aumento del sodio citoplasmático (Costa et al. 2009), lo que podría deberse a que el cadmio modifica la actividad de las bombas sodio-potasio, las cuales ayudan a mantener la presión osmótica dentro de las células, lo que a su vez influye en el flujo de otros iones y moléculas en la célula, como el calcio y la glucosa (Goodsell 2009), este desbalance iónico es lo que podría modificar la morfología bacilar de la levadura de fisión; por lo que sería importante cuantificar el cadmio en el citosol así como en diferentes compartimientos, así como otros iones como zinc y calcio.



**Figura 10. Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de *S. pombe* expuesto a  $\text{CdCl}_2$  2 h.** En medio EMM y se agregó la  $\text{EC}_{10}$  de  $\text{CdCl}_2$  [ $10 \mu\text{M}$ ] (Wu et al. 2016) exponiendo a las células 2 h (Wu et al. 2016, Jin et al. 2008), se observó la morfología en los CLS 2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X

En la microscopía de fluorescencia en el CLS2 y 4 (**Figuras 11 a-b**) hay varias células en septación, la intensidad de fluorescencia de floxina disminuye en el CLS4, mientras que en la colocalización las células tienen marca morada difusa, indicando una buena capacidad energética, correlacionándose con la **gráfica1** (línea verde), donde en el CLS2 respecto al control se observa un menor número de células, sin embargo a partir del CLS4 no se encuentran diferencias entre el grupo control y el grupo cadmio; este comportamiento se compara con estudios en *S. cerevisiae* (Harrison et al. 2005) donde se muestra un aumento de células con septos después de la exposición a  $\text{CdSO}_4$ , ya que el cadmio modula el incremento de los niveles de la proteína Zip1 y su actividad transcripcional e incrementa la producción del glutatión (GSH), lo que ayuda a amortiguar el estrés oxidativo producido, aunado a que el cadmio puede activar la transcripción de genes relacionados con la reparación

del ADN, así como modular dichos productos génicos a nivel postranscripcional y postrasduccional para evitar el arresto celular (Baek et al. 2012). Cabe destacar que este comportamiento se observa a corto plazo ya que este balance se rompe debido a que hay un incremento de ERO respecto al tiempo, lo que induce que Zip active genes relacionados al arresto celular (Harrison et al. 2005); también se ha relacionado la generación de ERO con un aumento en el calcio intracelular, lo que modifica el potencial de membrana y la muerte celular por apoptosis (Chatterjee, et al 2014). En los CLS6, 8 y 11 en la microscopía con calcoflúor (**Figuras 11 c-e**) se muestra que hay un menor número de células septadas; respecto a la floxina se observa que la intensidad de la fluorescencia disminuye en el CLS8 y en la colocalización la señal morada es difusa, por lo que probablemente se activan mecanismos de sobrevivencia en las células remanentes, lo cual se correlaciona con las UFCs (**Gráfica 1**) donde no existen diferencias estadísticamente significativas respecto al control; sin embargo, en el CLS11 la intensidad de la fluorescencia tanto de floxina y de la colocalización aumentan, indicativo que las células no pueden seguir mitigando el daño producido por el metal. Se ha encontrado que en la línea celular HepG2 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  se alcanza la expresión máxima del TF c-myc y que concentraciones superiores la disminuyen, cabe destacar que este TF regula la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la transformación hacia células cancerígenas, este TF es modulado por cadmio a través de la activación de las vías PI3K, JNK y TOR2 las cuales de manera conjunta activan la vía Akt, incidiendo en la estabilidad del mensajero de c-myc (Tsai 2016) . Por lo que se concluye que bajo la exposición a  $\text{CdCl}_2$  [10  $\mu\text{M}$ ] durante 2 h en el envejecimiento cronológico sólo modifica la morfología de *S. pombe*, pero no se afecta la entrada al ciclo celular.

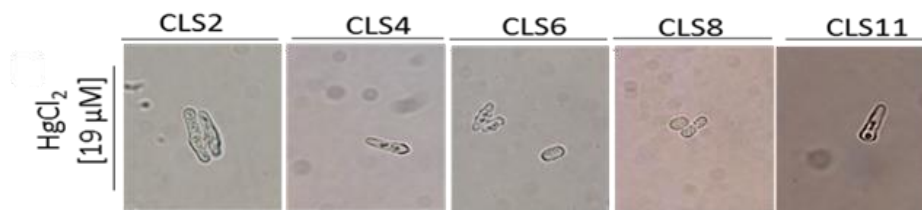


**Figura 11. Determinación de la viabilidad celular en el CLS tras la exposición a CdCl<sub>2</sub>.** Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxina B, se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia, las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

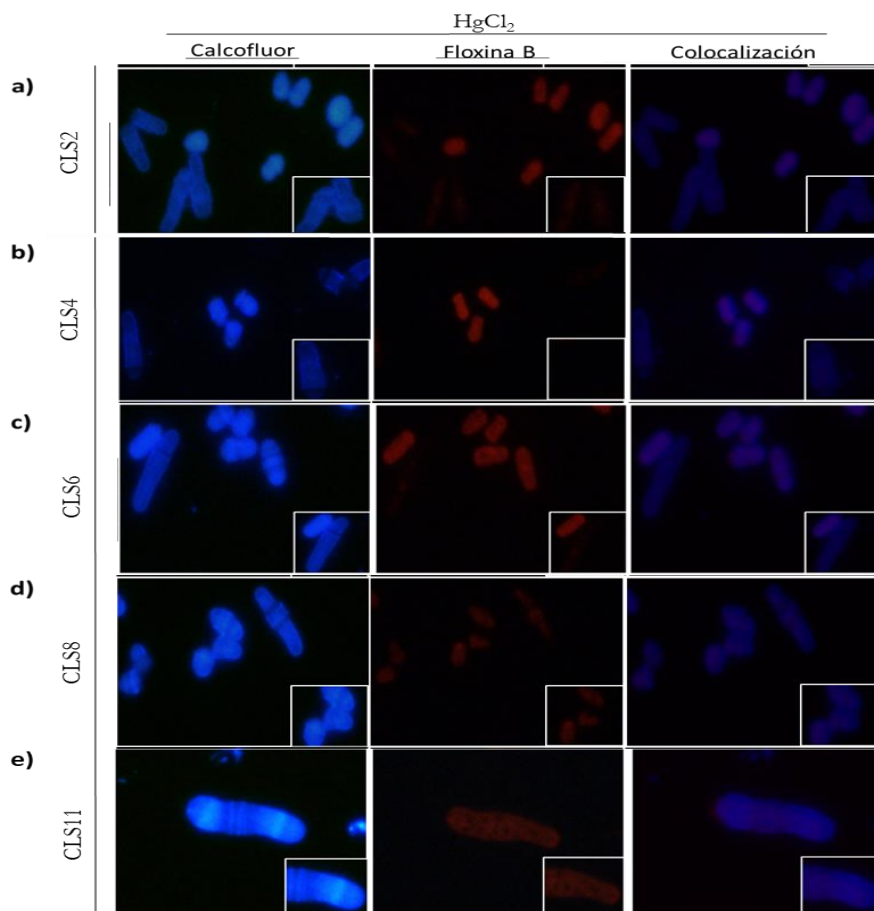
### 7.2.2. Grupo mercurio

El grupo expuesto a HgCl<sub>2</sub> [19 μM] desde el CLS2 muestra cambios en la morfología (**Figura 12**), las células se observan alargadas y con gránulos de estrés, también se observa que envejecen más rápido respecto al control; el alargamiento celular se ha observado en la línea celular K562, donde también se observó alargamiento nuclear (Farkas et al. 2010) además, también se ha puesto de manifiesto en el modelo *Danio rerio* (*Danio r.*) la presencia de vacuolarización, fragmentación de la cromatina y desorganización de organelos, lo que origina que parezca que el citoplasma se encuentre vacío, tal característica la encontramos a partir del CLS4 y es persistente en los subsecuentes días de estudio, ésta última observación refuerza la hipótesis existente que el HgCl<sub>2</sub> afecta a la membrana y a la pared celular, mientras que el [CH<sub>3</sub>Hg]<sup>+</sup> aparentemente no ejerce un efecto en la membrana citoplasmática (Macirella et al. 2016, Ung et al. 2010). En las microscopías de fluorescencia en todos los

días de estudio (**Figuras 13 a-e**) las células presentaron una morfología heterogénea, prevaleciendo las de forma alargada y sin septo, sin embargo, al igual que el grupo cadmio se encuentra que en los CLS8 y 11 la intensidad de la fluorescencia para floxina disminuye, comportamiento que también se observa en la colocalización, donde la intensidad de la señal morada disminuye; lo que indica que los sistemas de sobrevivencia se encienden para mantener viables a las células remanentes, sería importante determinar si el mercurio al igual que el cadmio puede modular al TF c-myc a través de las vías PI3K, JNK y TOR2. Los resultados de las microscopías se correlacionan con el ensayo de UFCs (**Gráfica 1**, línea morada), donde hay un número muy bajo de células que pueden entrar al ciclo celular respecto al control en los CLS2 y 4, a partir del CLS6 no hay diferencias, este comportamiento inicial se relaciona con estudios en líneas celulares de hámster donde la exposición a  $\text{HgCl}_2$  produce daño al ADN, así como un aumento abrupto en los radicales superóxido, lo que provoca muerte celular (Cantoni et al. 1984). Con esta evidencia se concluye que el  $\text{HgCl}_2$  modifica la morfología de la levadura de fisión de una forma exacerbada, además, las células pierden la capacidad de entrar al ciclo celular.



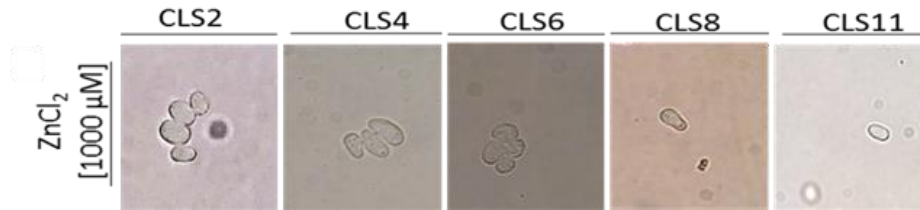
**Figura 12. Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de *S. pombe* expuesto a  $\text{HgCl}_2$  2 h.** En medio EMM y se agregó la  $\text{EC}_{10}$  de  $\text{HgCl}_2$  [19  $\mu\text{M}$ ] (Wu et al. 2016) exponiendo a las células 2 h (Wu et al. 2016, Jin et al. 2008), se monitorizó la morfología en los CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.



**Figura 13. Determinación de la viabilidad celular en el CLS2 tras la exposición a HgCl<sub>2</sub>.** Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxina B, se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia, las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

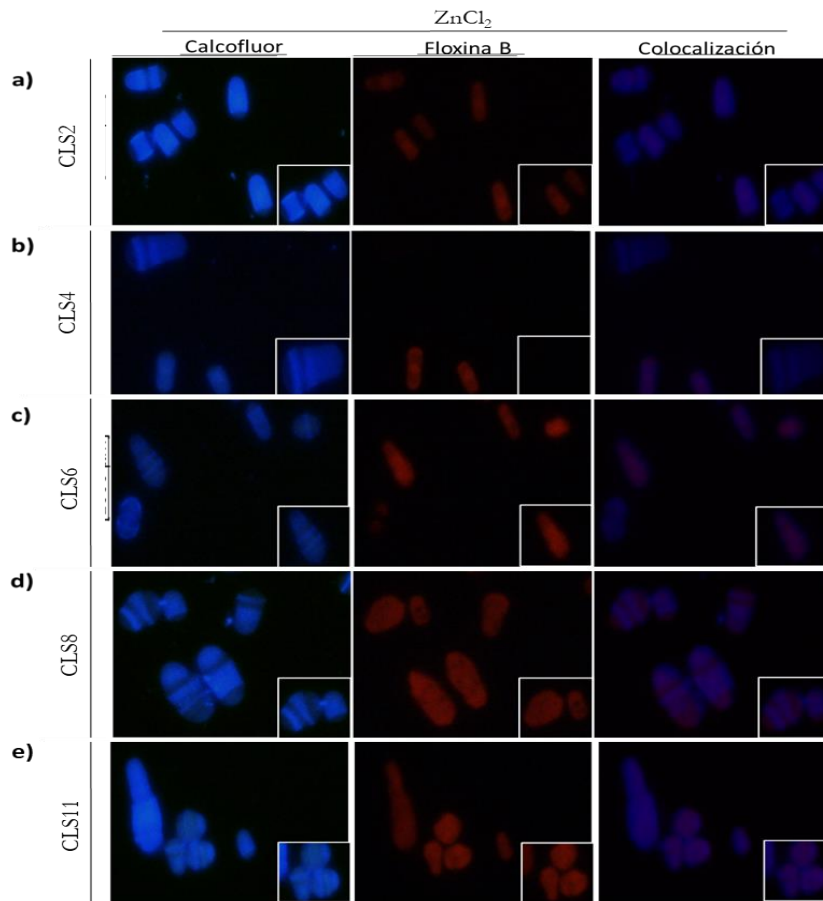
### 7.2.3. Grupo zinc

Las células expuestas a ZnCl<sub>2</sub> [1000 μM] se observan aglomeradas y tienen un volumen celular mayor respecto al control (**Figura 14**), dicha característica se hace presente en todos los días de estudio, esto se asemeja con la evidencia encontrada en *Danio r.* donde la exposición a ZnSO<sub>4</sub> induce inflamación celular así como cambios morfológicos severos que disminuyen respecto al tiempo (Hentig & Byrd-Jacobs 2016), lo que podría deberse a que el metal induce necrosis, cabe destacar que al contrario del CdCl<sub>2</sub>, las evidencias sugieren que esto no se debe a cambios en la presión osmótica, ya que se han comparado los efectos de la sal de zinc con sulfato de sodio, cloruro de sodio, buffer de fosfatos, soluciones de sacarosa y no causan tales grados de degeneración (Cancalon 1982, Iqbal et al. 2010).



**Figura 14.** Caracterización morfológica del envejecimiento cronológico de *S. pombe* expuesto a  $ZnCl_2$  2 h. En medio EMM y se agregó la  $EC_{10}$  de  $ZnCl_2$  [ $1000 \mu M$ ] (Wu et al. 2016) exponiendo a las células 2 h (Wu et al. 2016, Jin et al. 2008), se observó la morfología en los CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.

En las microscopías de fluorescencia (**Figura 15**) se aprecian células redondeadas en todos los días de estudio, también hay células con septos lo cual se relaciona con la **gráfica 1** (línea verde), donde en el CLS2 no hay diferencias respecto al control, excepto en el CLS 4 donde sí hay diferencias, pero en los siguientes días (CLS6-11) no hay diferencias respecto al control, en las señales de floxina y en la colocalización se observa que la intensidad de la fluorescencia aumenta como el grupo control, lo que sugiere que la exposición a una alta concentración de zinc causa toxicidad, pero las células son capaces de entrar al ciclo celular.



**Figura 15.** Determinación de la viabilidad celular en el CLS2 tras la exposición a  $ZnCl_2$ . Las células se expusieron a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de floxina B, se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se

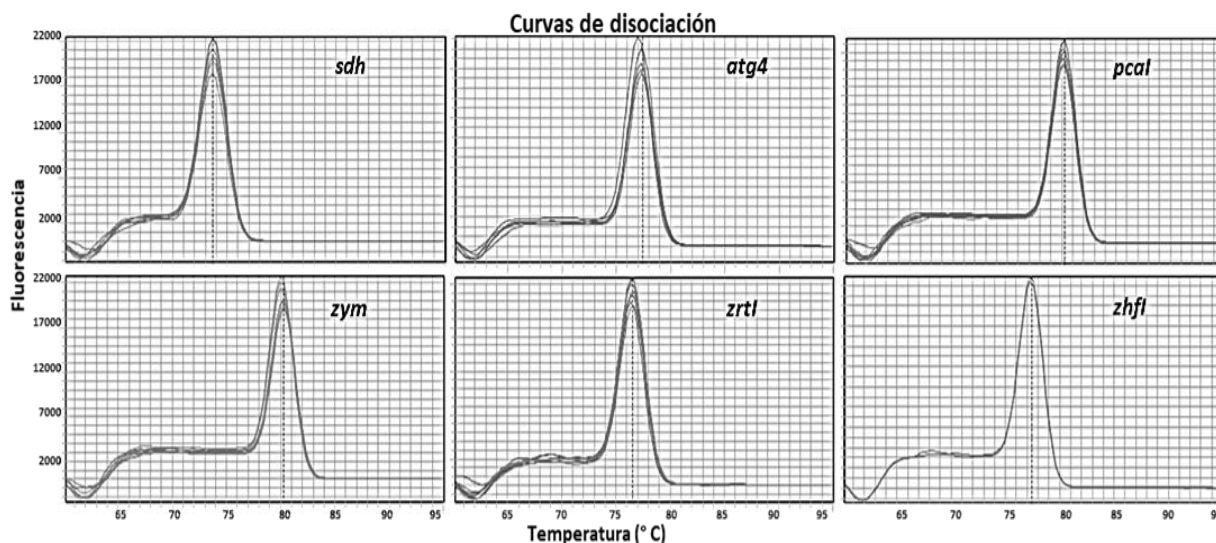
observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia, las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

### **7.3. Modificación del programa génico de *S. pombe* en presencia de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>**

Los genes de estudio fueron: *atg4* (gen relacionado a la autofagia), *pcaI* (gen de metacaspasa, relacionada con la cascada apoptótica y de sobrevivencia), *zym* (gen de la metalotioneína de unión a zinc), *zrtI* (gen del importador de alta afinidad a zinc) y *zhf* (gen del importador de zinc en el retículo endoplásmico o factor de homeostasis de zinc) y el gen endógeno *sdh* (gen de baja expresión). Los oligonucleótidos utilizados para los genes *sdh*, *atg4* y *pcaI* fueron diseñados en trabajos previos del laboratorio (Segundo 2015) (**Tabla 8**), y para los genes *zym*, *zrtI* y *zhf* se diseñaron un par de primers (**Tabla 8**, en negritas). Se observa que los oligonucleótidos para *zym*, *zrtI* y *zhf* presentan temperaturas de fusión casi idénticas entre ellos, su contenido de GC es de 50%, se evitó que no hubiera tándems, las longitudes de los amplicones son de entre 100 a 115 pb, aunado a esto se comprobó con el programa *BLAST* que las secuencias fueran únicas contra todo el genoma de la levadura, dichas características aseguraron una buena eficiencia de la amplificación del ADNc de cada gen. Para determinar que los oligonucleótidos sólo amplificaran un solo producto de PCR se generaron curvas de disociación en el termociclador de tiempo real (**Gráfica 2**), en que el producto de qPCR se somete a incrementos de temperatura y el equipo mide la fluorescencia emitida por el SYBERGreen/Rox; al incrementar la temperatura el ADNc se desnaturaliza y se convierte a ADNcs, por lo que el fluoróforo se disocia y la fluorescencia disminuye, se grafica la fluorescencia como función de la temperatura; al existir un solo pico en cada curva se concluye que el amplicón generado es un producto único, ya que estas curvas son una propiedad única dependiente de la longitud y la secuencia nucleotídica de cada producto.

**Tabla 8. Diseños de oligonucleótidos para qPCR de los genes *zym*, *zrtI* y *zhf*.** Los oligos *sdh*, *atg4* y *pcaI* se diseñaron en nuestro equipo de trabajo (Segundo 2015), en este estudio se elaboraron primers para los genes *zym*, *zrtI* y *zhfI*

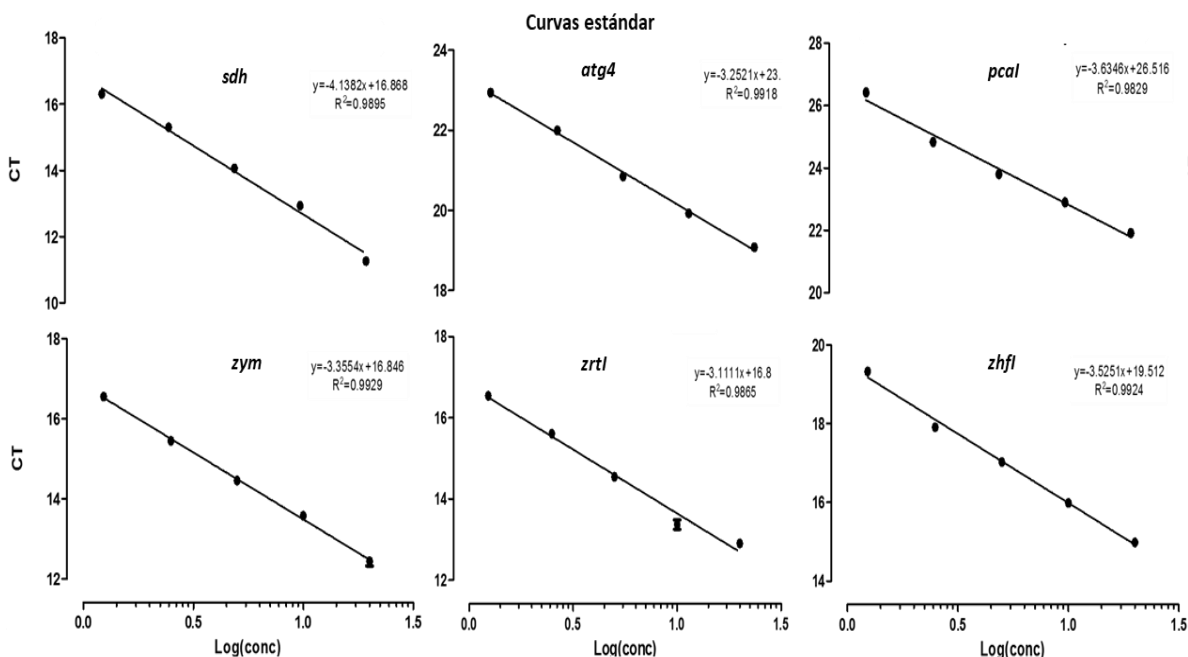
Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	GC (%)	PM (g/mol)	Tamaño del amplicon (pb)
<i>sdh</i> -sentido	TCTTGCACACTCTTTACGGGCAATCTC	60.7	48.1	8161.3	114
<i>sdh</i> -antisentido	CCACACATTCACCACCTTCCATGAT	59.3	48	7465.9	
<i>atg4</i> -sentido	AGGTCGTCCAAGGTCTGTCAT	60.3	55.4	6726.4	119
<i>atg4</i> -antisentido	AAGTTTCCTCGGAAGCAGGCT	59	52.4	6446.2	
<i>pcaI</i> -sentido	TGAGCTCTGCAAACCTCCACGCT	61.1	52.2	6,959.6	115
<i>pcaI</i> -antisentido	AGTCTGAGTGTTTGGCAGCTGAGG	61.1	54.2	7,479.9	
<i>zym</i> -sentido	CAACGATGGAACACACTACC	60	50	6064	106
<i>zym</i> -antisentido	CTCTTGCAACCACAAGACTC	61	50	6006	
<i>zrtI</i> -sentido	CTTGGTGCCAAACAACAC	60	50	5452.6	113
<i>zrtI</i> -antisentido	TCATGCTCAACACCATCG	60	50	5403.6	
<i>zhf</i> -sentido	CAGCCATACACACTCAAG	61	50	6024	100
<i>zhf</i> -antisentido	GACTGGCTTTGAAGTACCAG	60	50	6157	



**Gráfica 2. Curvas de disociación de los genes *sdh*, *atg4*, *pcaI*, *zym*, *zrtI* y *zhf*.** Se observa la generación de un solo amplicón representado por un solo pico en la curva.

Existen varios métodos de cuantificación en PCR en tiempo real (qPCR), entre ellos destacan el método del  $\Delta\Delta C_t$  y el de la curva estándar, para determinar el método apropiado se generó una curva estándar para cada gen. Las curvas contaron de 5 puntos utilizando 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ng de ADNc, se graficaron los valores de  $C_t$  en función del  $\log_{10}$  de la concentración de ADNc (**Gráfica 3**), se realizó una regresión lineal donde se observa un coeficiente de correlación cercano a  $R \geq 0.99$ , lo que indica una buena reproducibilidad y precisión, se tomó en cuenta que el valor de la pendiente fuese cercano a -3.3 que indica una eficiencia de reacción del 100%, cuanto más lejano es el valor a este número las reacciones son menos eficientes. Debido a que la eficiencia de cada uno de los genes fue diferente se optó por utilizar el método de cuantificación relativa a la curva estándar. Después de realizar

los ensayos de qPCR y los cálculos correspondientes, se realizó para cada gen por grupo una ANOVA de una vía con post test de *Dunnett*, donde se compararon los CLS4, 6, 8 y 11 contra el CLS2.

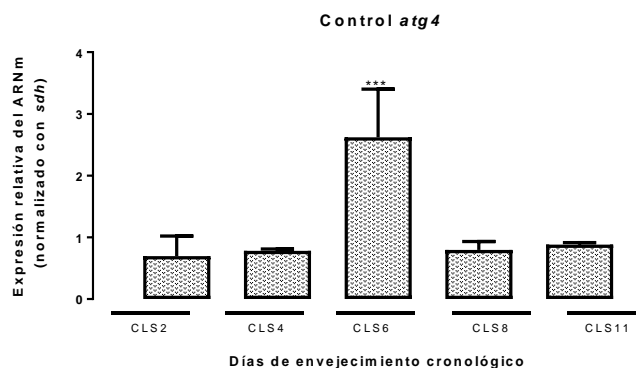


**Gráfica 3. Curvas estándar de los genes *sdh*, *atg4*, *pcal*, *zym*, *zrt1* y *zhf*.** Se realizó una curva estándar de 5 puntos con 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ng de ADNc, se graficaron los CTs obtenidos contra el logaritmo de la concentración del ADNc en el programa GraphPad Prism5. Las gráficas cuentan con un coeficiente de correlación cercano a  $R \geq 0.99$ .

### 7.3.1. Grupo control

El transcrito del gen *atg4* (**Gráfica 4**) en los CLS2 y 4 mantuvo un nivel basal, en el CLS6 su nivel se incrementó, sin embargo, en los CLS8 y 11 regresó al nivel basal; cabe destacar que el gen *atg4* codifica para una proteasa que tiene una función esencial en la formación de los autofagosomas y es regulado a nivel transcripcional y postraduccional; en el primero se ha descrito que el factor de transcripción FOXO modula la transcripción de *atg4*, se ha observado que las isoformas FoxO1, FoxO3 y FoxO4 en muestras de pacientes con atrofia muscular en individuos jóvenes y envejecidos mantienen un nivel de expresión basal en los días 1, 2 y 4 de estudio, mientras que en el día 14 aumenta sólo el transcrito de FoxO1 (Suetta et al. 2012), este comportamiento podría asemejarse a los niveles de *atg4* a lo largo del envejecimiento cronológico de la levadura; a nivel postraduccional en *S. cerevisiae* la proteasa es regulada por ERO (Pérez-Pérez et al. 2014), en *S. pombe* se ha determinado que la producción de ERO inicia de forma abrupta en el CLS6 (Roux et al. 2006), por lo que la

regulación postraduccional negativa de la Atg4 podría inducir una regulación positiva a nivel del mensajero y el regresó a los niveles basales en los CLS8 y 11 podría ser una respuesta adaptativa a las ERO. En el modelo *C. elegans* se encontró que la vía Insulina/Factor de crecimiento tipo insulina media la resistencia al estrés inducida por las ERO, además, los mecanismos de antioxidación (GSH y SOD) y las MTs son reguladas de forma positiva después de un incremento de estas especies (Zhao & Wang 2012). Además, en la levadura *S. cerevisiae* se encontró que el estrés oxidativo disminuye la concentración de PKA, por lo que la inactivación de la vía Ras/PKA regula de forma positiva al TF Yap1p, el cual modula la respuesta adaptativa ante condiciones de estrés oxidativo a través de su unión a las secuencias consenso TTACTAA o TGACTAA, las cuales se encuentran en el promotor de genes de resistencia al estrés como *gsh1*, *sod1/2* y *trx2* (Moradas-Ferreira & Costa 2013); también la vía Ras/PKA regula de forma negativa a los factores de resistencia al estrés Msn2/4, por lo que al incrementarse las ERO se induce la transcripción del gen *ccp1*, que codifica para una peroxidasa que reduce el peróxido de hidrógeno (Moradas-Ferreira & Costa 2013)

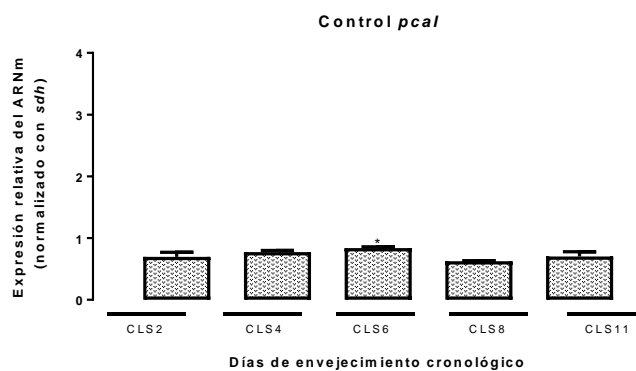


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.001.

**Gráfica 4.** Expresión relativa del ARNm de *atg4* en el CLS de *S. pombe*.

Para el gen de *pca1* o de la metacaspasa en la **gráfica 5**, los niveles del transcrito en los CLS2 y 4 son constantes, en el CLS6 aumentan de forma ligera y en los CLS8 y 11 retornan al nivel basal, se ha determinado que este gen relacionado a la apoptosis tiene roles duales: prosobrevivencia y de muerte (Hill & Nyström 2017). Para el primer caso se ha determinado que es necesaria la expresión de este gen para que en conjunto con la desagregasa Hsp104 se eliminen agregados proteicos (Lee et al. 2010b) aunado a que se ha observado que su sobreexpresión estimula el crecimiento celular y la respuesta al estrés (Lim et al. 2007). En segunda instancia, se ha observado que la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de

cultivo induce un aumento en su actividad catalítica (Lim et al. 2007), se ha observado que dependiendo del estímulo que tengan las células puede actuar de una u otra forma (Hill & Nyström 2017), es por ello que al observar niveles constantes en los CLS2 y 4 pudiese estar actuando de forma prosobrevivencia, después en el CLS6 donde hay un aumento abrupto de ERO esto podría inducir la regulación positiva del gen *pcaI* que podría relacionarse al aumento de muerte celular, luego regresaría a los niveles basales como una respuesta adaptativa de las células remanentes.

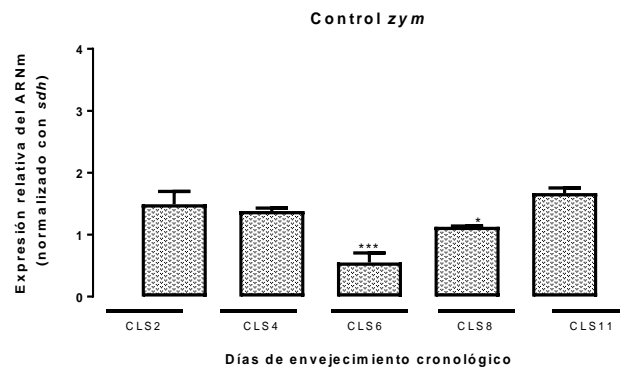


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \* P<0.05.

**Gráfica 5.** Expresión relativa del ARNm de *pcaI* en el CLS de *S. pombe*.

El gen de la metalotioneína *zym*, **gráfica 6**, en los CLS2 y 4 se expresa de forma basal, en el CLS6 y 8 disminuye y en el último día de estudio vuelve a sus niveles normales, este comportamiento del nivel del transcrito es similar al encontrado en el área hipocámpal y cortical de ratas de la MT1 y 2, donde en ratas jóvenes en dichas áreas los transcritos se expresan de forma basal, luego disminuyen para después aumentar hasta regresar a sus niveles basales (Scudiero, Cigliano, & Verderame 2017), tomando en cuenta lo reportado por Scudiero y colaboradores, nuestra hipótesis para las células jóvenes con niveles basales de *zym* es que antes de pasarlas al medio EMM eran células en un medio rico en nutrientes que habían alcanzado la fase estacionaria y que posteriormente se cambiaron a un medio mínimo adicionado con vitaminas y minerales, así al tener el suficiente zinc del primer medio (YE) y luego de EMM adicionado con ZnSO<sub>4</sub> no necesitaban el metal para la resistencia al estrés, por lo que se necesitó un nivel mayor de la MT para su resguardo, en el CLS6 y 8 al aumentar las ERO (Roux et al. 2006) y existir una muerte masiva de células probablemente se necesite liberar al zinc de la MT para mantener la viabilidad celular; por último, en el CLS11 el

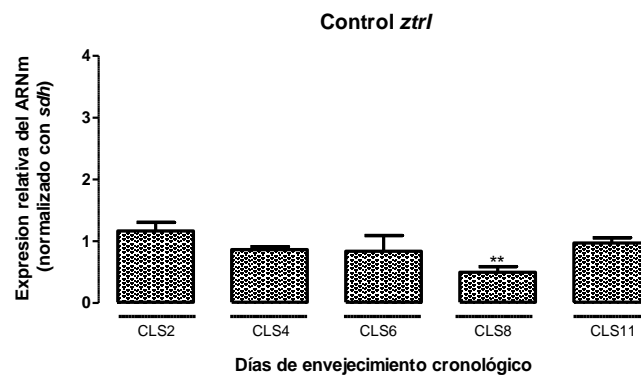
transcrito pudiese aumentar debido a que las células que ya han muerto liberan material que puede ser re utilizado por las células que restan, teniendo de ahí el zinc que necesitan.



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.0001, \*P<0.05.

**Gráfica 6. Expresión relativa del ARNm de *zym* en el CLS de *S. pombe*.**

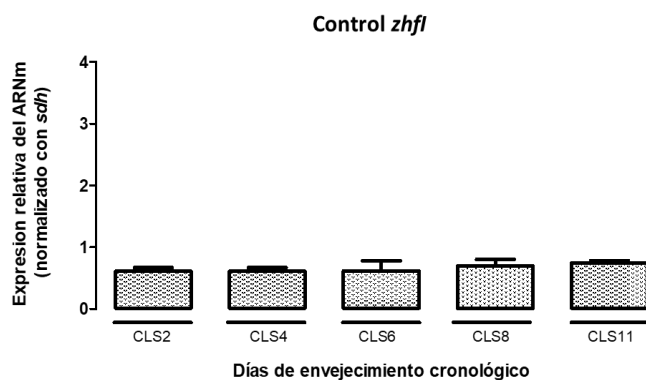
En cuanto al importador citoplasmático *zrtI*, **gráfica 7**, mantiene un nivel basal durante los CLS2, 4 y 6, en el CLS8 disminuye, pero se normaliza en el CLS11, se ha observado que es necesaria su expresión tanto para condiciones con bajo y alto zinc, se sugiere que los primeros días al encontrarse el zinc secuestrado por la MT, se encuentra en condiciones basales; sin embargo, como se ha observado que para el CLS8 hay un número significativo de células muertas (Roux et al. 2006) y al existir zinc en el medio, el transcrito *zrtI* se regule negativamente y otro transportador de baja afinidad de zinc se regule positivamente (Boch et al. 2008), se ha observado que el cultivo de células en medio EMM mantiene el nivel basal del transcrito *zrtI*, pero cuando se adiciona medio EMM sin zinc la expresión del transportador aumenta diez veces más (Boch et al. 2008).



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\* P<0.0028.

**Gráfica 7. Expresión relativa del ARNm de *zrtI* en el CLS de *S. pombe*.**

Respecto al factor de la homeostasis de zinc, *zhf1*, se aprecia en la **gráfica 8** que en todos los días de estudio tiene un comportamiento basal y que no se modifica su expresión, se ha encontrado que la ausencia de *Zhf* provoca que *S. pombe* sea sensible tanto a bajas como a altas concentraciones de zinc en medio mínimo (Borrelly et al. 2002), lo que explicaría por qué las células a lo largo de su envejecimiento cronológico mantienen los mismos niveles del mensajero.

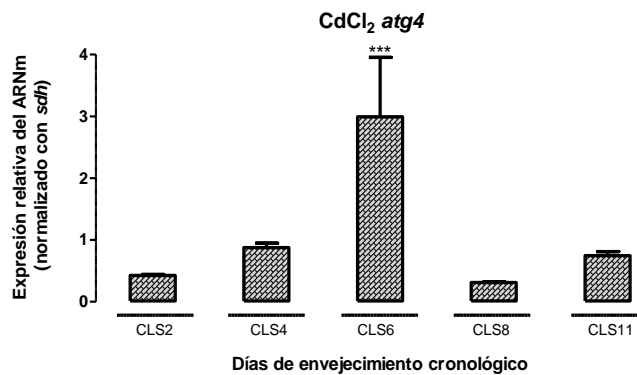


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11, ns.

**Gráfica 8.** Expresión relativa del ARNm de *zhf1* en el CLS de *S. pombe*.

### 7.3.2. Grupo cadmio

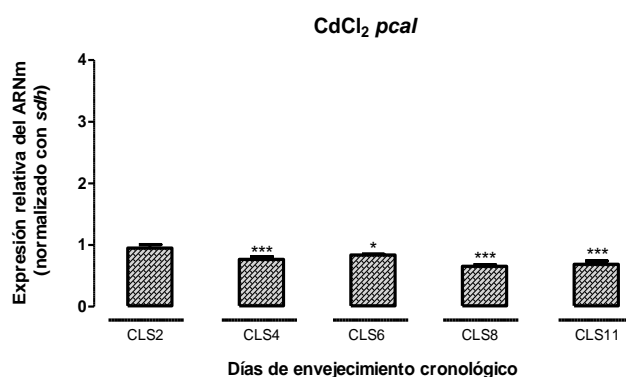
El gen *atg4*, **gráfica 9**, en los CLS2 y 4 el transcrito se expresa de forma basal, en el CLS6 aumenta su expresión 3 veces y en los CLS8 y 11 vuelven a sus niveles normales, se ha reportado que tras la exposición de cadmio se induce la autofagia (Liu et al. 2016) por el aumento de ERO (Xinghua et al. 2017) y disminución de zinc (Kawamata et al. 2017); sin embargo, en nuestro modelo de trabajo no es posible mantener a las células con una exposición continua a cadmio durante todo el tiempo de vida cronológico, y ya que en los ensayos de estandarización se optó por exponer a la levadura 2 h con el metal, después lavar las células y añadir medio EMM fresco con vitaminas y minerales, una parte del cadmio es eliminado del medio y al adicionar  $ZnSO_4$  en el medio nuevo, las células no necesitan activar de forma inicial la autofagia, razón por la cual podrían comportarse como el grupo control.



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.001.

**Gráfica 9.** Expresión relativa del ARNm de *atg4* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $CdCl_2$ .

En la **gráfica 10**, gen *pca1*, en el CLS2 hay un nivel basal del transcrito, pero en los siguientes días disminuye, como se mencionó con anterioridad, al tener un papel dual la metacaspasa (Hill & Nyström 2017), la regulación negativa podría deberse bajo a una disminución en la viabilidad celular. En *D. melanogaster* se estudió y comparó la actividad de sus dos caspasas ejecutoras, Drice y Dcp-1, cada una puede inducir la apoptosis, aunque una con mayor rapidez que la otra (Florentin and Arama 2012), lo que podría deberse a su actividad catalítica, por lo que sería pertinente evaluar los parámetros cinéticos de la metacaspasa y determinar si los cambios sutiles en los niveles de su transcrito son suficientes para propiciar la disminución de la viabilidad celular.

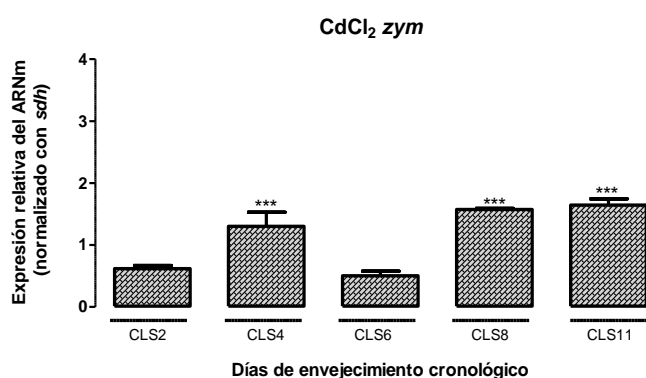


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.0001, \*P<0.05.

**Gráfica 10.** Expresión relativa del ARNm de *pca1* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $CdCl_2$ .

Respecto al mensajero de la metalotioneína *zym*, **gráfica 11**, en el CLS4 aumenta su expresión, pero disminuye en el CLS6, sin embargo, vuelve a aumentar en el CLS8 y 11, se ha caracterizado que cuando la levadura de fisión es expuesta a cadmio, éste es secuestrado principalmente por el sistema de fitoquelatina y de forma secundaria es captado por la MT

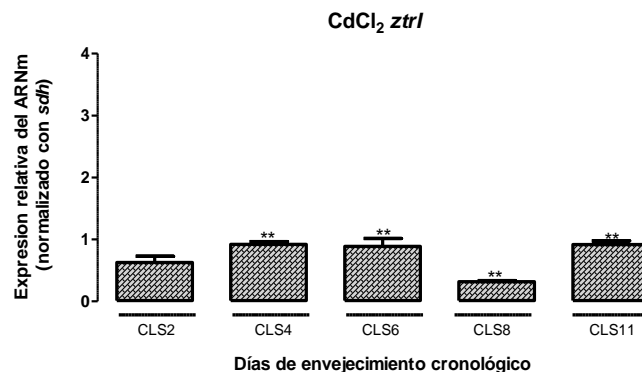
(Clemens et al. 1999, Clemens & Simm 2003), probablemente este comportamiento en el transcrito se debe a una expresión diferencial de la fitoquelatina (FQ) y la respuesta compensatoria de la MT. Las fitoquelatinas son péptidos derivados del glutatión y tienen una estructura general de  $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  donde n pueden ser 2-11 unidades (Ow 1993), estos péptidos se unen con eficacia a cadmio, cobre y  $\text{AsO}_4^{3-}$  y  $\text{AsO}_2^-$  (Clemens & Simm 2003); los complejos FQ-Cd son transportados a la vacuola por un transportador de la familia ABC para desintoxicar al organismo (Clemens & Simm 2003, Clemens et al. 1999). Por todo esto es necesario evaluar al sistema de FQ así como la cuantificación de cadmio por espectrometría de masas en la vacuola y citoplasma.



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.0001.

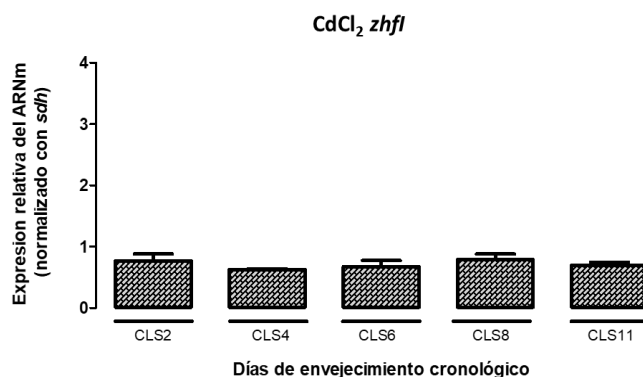
**Gráfica 11.** Expresión relativa del ARNm de zym en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $\text{CdCl}_2$ .

La **gráfica 12** corresponde a la expresión del importador *zrtI* el cual tiene un nivel menor al del endógeno, en los CLS4 y 6 aumenta su expresión, la cual disminuye en el CLS8 y vuelve a aumentar en el CLS11. Lo que observamos tal vez se pueda atribuir a que el cambio de medio después de las 2 h de exposición compensa el zinc desplazado por el cadmio y por lo tanto, no se requiere su importe en el CLS2, debido a que a partir del CLS4 y 6 el comportamiento de las UFCs de las células expuestas a cadmio son equiparables al control, por lo que se necesita aumentar el nivel de zinc citosólico y por lo tanto, el *zrtI*, ya que las células muertas han liberado al zinc, las células remanentes sensan este metal y disminuyen el nivel del transcrito, en el CLS11 regresa a sus niveles basales donde las células envejecidas probablemente necesitan al zinc para ser viables. Para el caso del transcrito de *zhfI*, **gráfica 13**, no se observan cambios en su grado de expresión.



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\* P<0.001.

Gráfica 12. Expresión relativa del ARNm de *zrf1* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $CdCl_2$ .

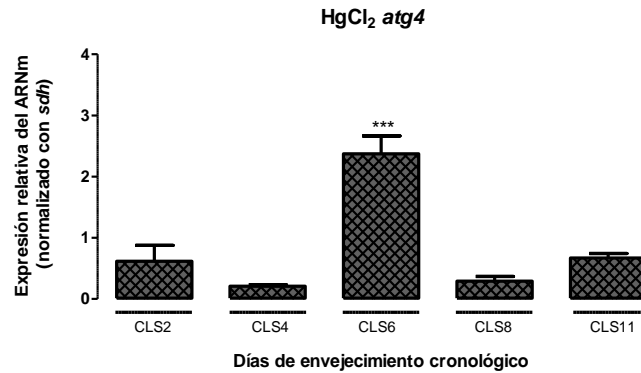


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11, ns.

Gráfica 13. Expresión relativa del ARNm de *zhf1* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $CdCl_2$ .

### 7.3.3. Grupo mercurio

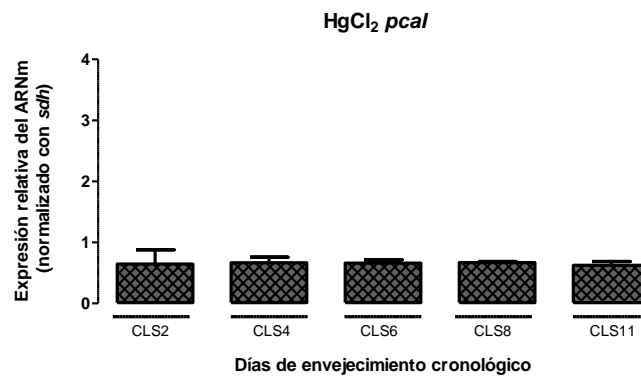
El gen *atg4*, **gráfica 14**, en el CLS2 tiene un nivel basal, que disminuye en el CLS4, después en el CLS6 incrementa, en el CLS8 vuelve a disminuir y en el CLS11 se normaliza su expresión. Cultivos primarios de astrocitos de rata se expusieron a concentraciones de 5 y 10  $\mu M$  de  $HgCl_2$  e interesantemente se observó que la mayor inducción de autofagia se da en la concentración menor, no así con la de 10  $\mu M$  (Yuntao et al. 2016), por lo que para el caso de este grupo sería muy importante observar cómo se encuentra el flujo autofágico con una construcción Atg8-GFP o Atg8-GFP-mCherry, donde se observaría si se está llevando a cabo la escisión de Atg8 por Atg4 así como el proceso de maduración de los autofagosomas.



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.001.

**Gráfica 14.** Expresión relativa del ARNm de *atg4* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $HgCl_2$ .

El transcrito de la metacaspasa permanece en niveles basales en todos los días de estudio, **gráfica 15**, ya que el mercurio es un agente muy tóxico y de acuerdo a lo observado en la **gráfica 1** estas células son las que menos pueden entrar al ciclo celular, por lo que probablemente este gen este activo de forma basal para activar el programa de muerte.

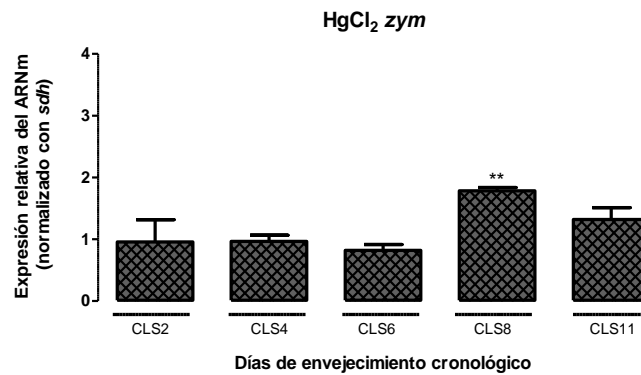


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11, ns.

**Gráfica 15.** Expresión relativa del ARNm de *pca1* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $HgCl_2$ .

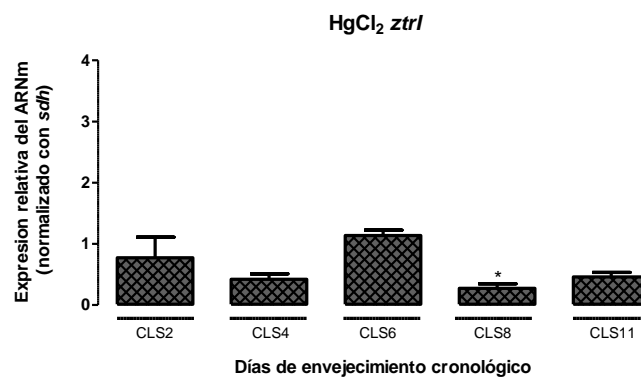
El gen *zym*, **gráfica 16**, permanece constante de forma basal durante los CLS2, 4 y 6, aumenta en el CLS8, pero vuelve a su estado inicial, este comportamiento podría deberse a que muchas células han muerto para el CLS8 y hay niveles altos de zinc en el citosol por lo que la célula secuestre al metal, cabe destacar que estos resultados se asemejan a los niveles del transcrito de la MT1 y 2 en ratas, a las que se les administró  $HgCl_2$  en forma subcutánea (Zalups & Koropatnick 2000); además, este comportamiento se relaciona con el gen de *zrtI*, **gráfica 17**, en los CLS2, 4 y 6 se mantiene en un nivel constante, después en el CLS8 disminuye y el CLS11 no tiene diferencias con el CLS2, es decir en el CLS8 disminuye el

transcrito porque no es necesario ingresar más zinc a la célula. En la **gráfica 18** se observa que el comportamiento del mensajero de *zhfI* no se modifica en los días de estudio.



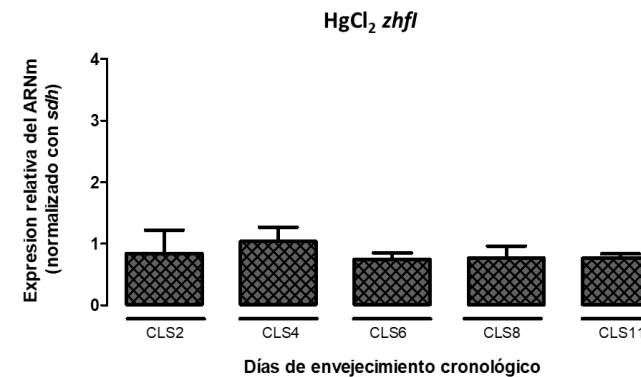
ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\* P<0.0008.

**Gráfica 16.** Expresión relativa del ARNm de *zym* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $HgCl_2$ .



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\* P<0.05.

**Gráfica 17.** Expresión relativa del ARNm de *zrtI* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $HgCl_2$ .

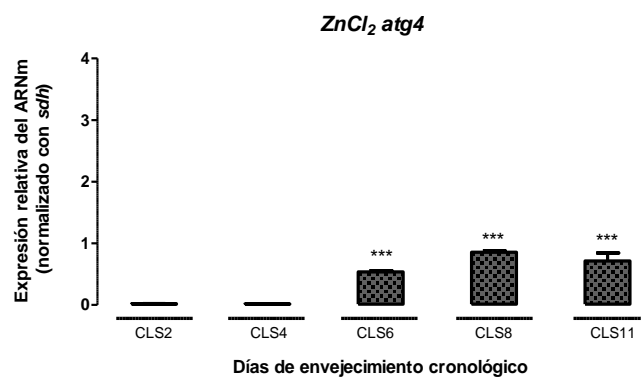


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11, ns.

**Gráfica 18.** Expresión relativa del ARNm de *zhfI* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $HgCl_2$ .

### 7.3.4. Grupo zinc

En el grupo  $ZnCl_2$  el gen *atg4*, **gráfica 19**, los niveles del transcrito en el CLS2 y 4 son muy bajos (cerca de cero), en el CLS6 aumenta su expresión 4 veces, en los CLS8 y 11 tienen niveles basales respecto al grupo control sin metales (**Gráfica 4**). Se ha observado que la deficiencia de zinc induce autofagia (Kawamata et al. 2017, Liuzzi et al. 2014) por lo que al haber estado en condiciones contrarias a la deficiencia en los primeros días se disminuyó el proceso autofágico, ya que a partir del CLS6 las células se comportan como el control, puede que la producción de ERO inicie de forma abrupta en el CLS6 (Roux et al. 2006), induciendo una regulación positiva, hasta llegar a los niveles basales en los CLS8 y 11 como respuesta adaptativa.

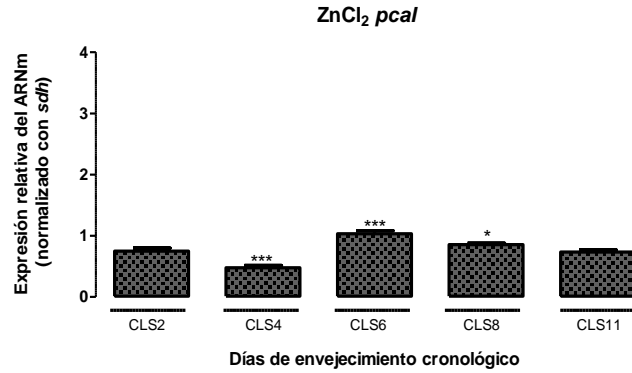


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.001.

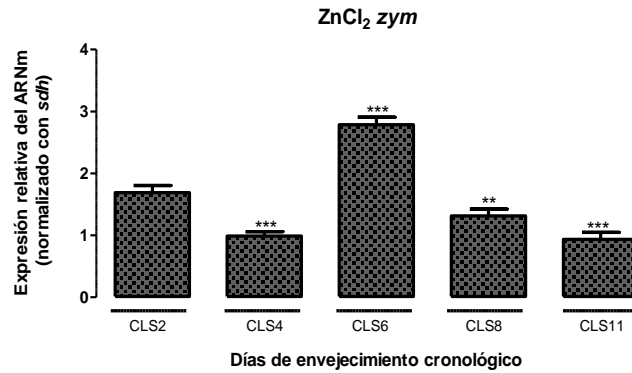
**Gráfica 19.** Expresión relativa del ARNm de *atg4* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $ZnCl_2$ .

El gen de *pca1*, **gráfica 20**, tiene un comportamiento basal en el CLS2, en el CLS4 disminuye, en el CLS6 aumenta su expresión, en el CLS8 disminuye y en el CLS11 vuelve a sus niveles basales, estos aumentos y disminuciones en la *pca1* podrían deberse al rol dual de la metacaspasa (Hill & Nyström 2017).

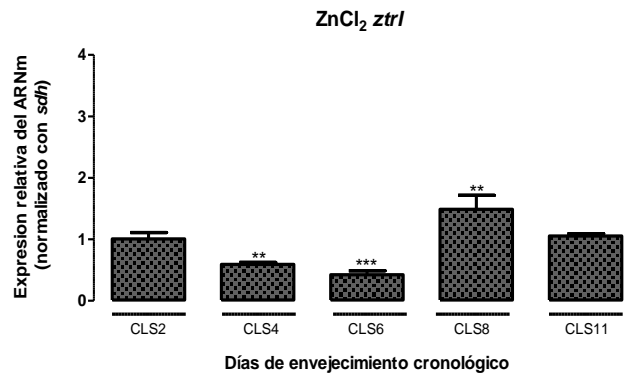
Para el gen *zym*, **gráfica 21**, se observa un pico mayor de expresión en el CLS6, como se ha observado por otros investigadores (Roux et al. 2006), en la **gráfica 1** (línea verde) se observa que la población disminuye en un 55% puesto que las células estuvieron expuestas a altas concentraciones de zinc. Las células vivas requieren secuestrar el exceso de zinc para evitar toxicidad y esto se podría relacionar al perfil de la **gráfica 22**, donde se aprecia el comportamiento del importador *zrt1*, donde en el CLS2 tiene un comportamiento basal que disminuye en los CLS4 y 6, luego aumenta en el CLS8 y se normaliza en el CLS11.



**Gráfica 20.** Expresión relativa del ARNm de *pcaI* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a ZnCl<sub>2</sub>



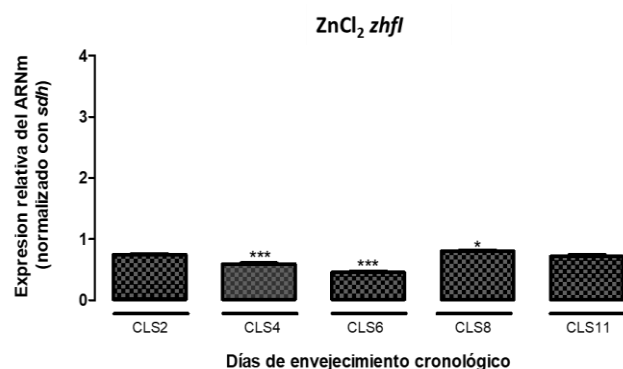
**Gráfica 21.** Expresión relativa del ARNm de *zym* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a ZnCl<sub>2</sub>.



**Gráfica 22.** Expresión relativa del ARNm de *ztrI* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a ZnCl<sub>2</sub>.

El transcrito *zhfI*, **gráfica 23**, presenta un valor basal en el CLS2, y disminuye en los CLS4 y 6, se normaliza su nivel en el CLS8 y se mantiene en el CLS11. En *S. cerevisiae* se observó que el nivel del transcrito de *zhfI* se modifica en condiciones de concentraciones

altas y bajas de zinc, en el primer caso para evitar toxicidad y en el segundo, para importar el zinc necesario para la síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático (Boch et al. 2008).



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS4, 6, 8 y 11. \*\*\* P<0.0001, \*\*P<0.010.

**Gráfica 23.** Expresión relativa del ARNm de *zhfl* en el CLS de *S. pombe* expuesta 2 h a  $ZnCl_2$ .

Como resumen de los resultados anteriores en la **tabla 9**, se recopiló la información de la modificación de los patrones génicos de las **gráficas 4-23** de *S. pombe* bajo el paradigma de envejecimiento cronológico de los grupos control, cadmio, mercurio y zinc. Cabe destacar que las células expuestas a zinc modificaron el comportamiento de los 5 transcritos de estudio, los grupos control y cadmio modificaron los niveles de 4 transcritos, mientras que en el grupo mercurio sólo hubo cambio en 3 genes.

**Tabla 9.** Resumen de la modificación de los patrones génicos de *S. pombe* de los grupos control, cadmio, mercurio y zinc de: *atg4*, *pcaI*, *zym*, *zrtI* y *zhfl*. Se recopiló la información de las gráficas 4-23 y se registró el comportamiento de los grupos de estudio para los genes *atg4*, *pcaI*, *zym*, *zrtI* y *zhfl* en los días de envejecimiento 2, 4, 6, 8 y 11. El ‘-’ indica nivel basal o mantenimiento del nivel, la flecha hacia arriba ‘↑’ indica regulación positiva y la flecha hacia abajo ‘↓’ indica regulación negativa del transcrito.

	Grupo	Control					Cadmio					Mercurio					Zinc				
		2	4	6	8	11	2	4	6	8	11	2	4	6	8	11	2	4	6	8	11
Genes	<i>atg4</i>	-	-	↑	↓	-	-	-	↑	↓	-	-	-	↑	↓	-	0	0	↑	-	-
	<i>pcaI</i>	-	-	↑	↓	-	-	↓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↑	-	↓
	<i>zym</i>	-	-	↓	↑	-	-	↑	↓	↑	-	-	-	-	↑	↓	-	↓	↑	↓	↓
	<i>zrtI</i>	-	-	-	↓	↑	-	↑	-	↓	↑	-	-	-	↓	↑	-	↓	↑	↓	↓
	<i>zhfl</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	-	↑	↓

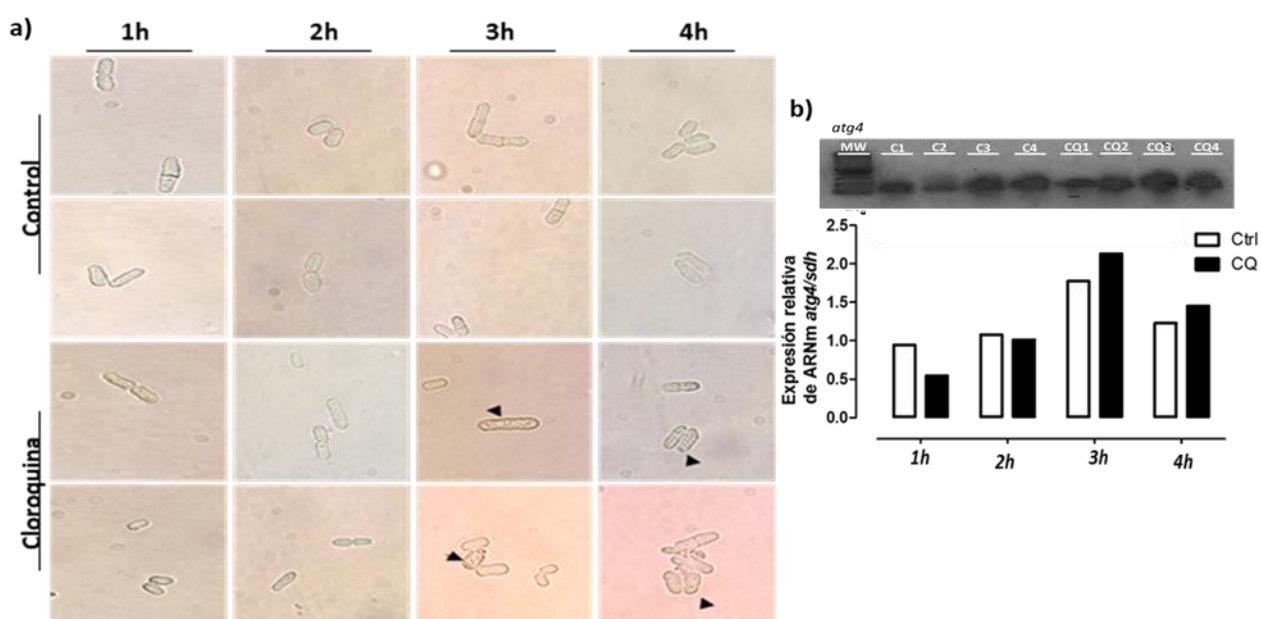
#### 7.4. Determinación del estado de la autofagia en el CLS de *S. pombe* después de la exposición a CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>

La autofagia es un proceso que ha sido estudiado a detalle en los últimos años, debido a la importancia que tiene en el balance de la homeostasis celular Klionsky y otros investigadores han desarrollado un manual para su monitoreo y análisis (Klionsky et al. 2016). Un aspecto importante en el estudio de la autofagia es su inhibición ya que provee información sobre la vía; es decir, si el proceso se encontrara activo bajo nuestras condiciones experimentales se observaría un aumento de autofagosomas pero, si se encontrara inactivo no se encontrarían autofagosomas. La autofagia puede bloquearse con diferentes clases de agentes, uno de ellos son las aminas acidotrópicas como el cloruro de amonio, la metilamina, propilamina y cloroquina (CQ), las cuales modifican la función lisosomal aumentando el pH del lisosoma y la actividad de las hidrolasas, aunado a esto, el pH ácido es esencial para la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Debido a que la CQ es un fármaco antimalárico aprobado por la *Federal Drug and Food Administration* (FDA) y por la Comisión Nacional de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) es de nuestro interés su empleo en la levadura de fisión. En el manual para el seguimiento de la autofagia se proponen concentraciones desde 10 hasta 50  $\mu\text{M}$ , con tiempos de incubación de 1 hasta 4 horas, motivo por el cual se realizó una cinética de exposición al compuesto

Se cultivó a *S. pombe* en medio YE durante 24 h, después se cambió a medio EMM y se agregó el fármaco a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y se realizó una cinética de exposición durante 1, 2, 3 y 4 h (**Figura 16a**). Se observa que las células control a los diferentes tiempos poseen una morfología bacilar, hay algunas que tienen un septo lo que indica que son capaces de entrar al ciclo celular y dividirse. Las células con CQ en los tiempos de 1 y 2 h se observan con una morfología similar respecto al control, sin embargo, a partir de la 3era hora de exposición se observa una célula por campo con gránulos en todo el citoplasma, lo cual podría sugerir que son autofagosomas; en el tiempo de 4 h de exposición se observan a todas las células por campo con los gránulos antes descritos.

A todos los grupos de la estandarización se les extrajo el ARN por el método de TRIzol y se realizó una RT-PCR de punto final de un paso utilizando oligonucleótidos para la amplificación del gen constitutivo *sdh* y de autofagia *atg4*, lo cual se realizó con la finalidad si además de la modificación morfológica había un cambio en el programa génico.

Los amplicones se corrieron en un gel de agarosa y se muestran en la **figura 16b**, los amplicones se analizaron por densitometría y se graficaron, se observa que en el grupo control cultivado 1 h (C1) en medio EMM tiene un nivel basal del transcrito *atg4*, el cual se mantiene a las 2 h de cultivo (C2), en la muestra C3 el nivel del transcrito se modula positivamente y tiende a disminuir en la muestra C4; éste mismo comportamiento se observa en las células expuestas a CQ, por lo que al no encontrar una diferencia en la tendencia de los niveles del transcrito se decidió tomar en cuenta la inducción de gránulos encontrados a las 4 h de exposición, ya que esto podría sugerir que la célula se encuentra bajo estrés por inhibición de la autofagia.



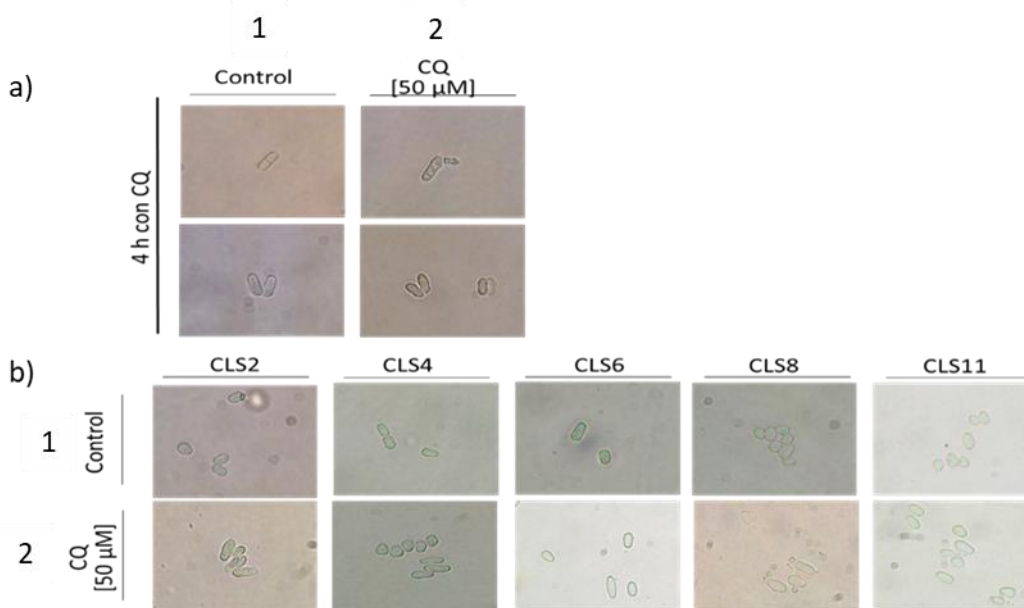
**Figura 16. Cinética de la estandarización de la exposición de *S. pombe* a cloroquina.** a) Se cultivó a *S. pombe* en medio EMM (grupo control) y a otro grupo experimental se le agregó CQ (50  $\mu$ M), se cultivó durante 1, 2, 3 y 4 h, vista a 40X. b) RT-PCR de punto final de genes *sdh* y *atg4*, grupo control C1 (1 h de cultivo en medio EMM), C2 (2 h), C3 (3 h) y C4 (4 h), grupo CQ1 (1 h), CQ2 (2 h), CQ3 (3 h) y CQ4 (4 h), la intensidad de las bandas se analizó por densitometría en el programa *ImageJ NHI* y se graficó con el programa *GraphPad5 Prism5*, este ensayo se realizó en una sola ocasión.

Para determinar el efecto en el envejecimiento cronológico de *S. pombe* de la inhibición de la autofagia con CQ seguido de la exposición a metales pesados se siguió el diagrama experimental de la **sección 6.4.1**.

#### 7.4.1. Control y CQ

En la **figura 17, a1** se observa que las células control después de estar 4 h en el medio EMM tienen una morfología bacilar y un septo indicador de división celular, en los CLS2-4

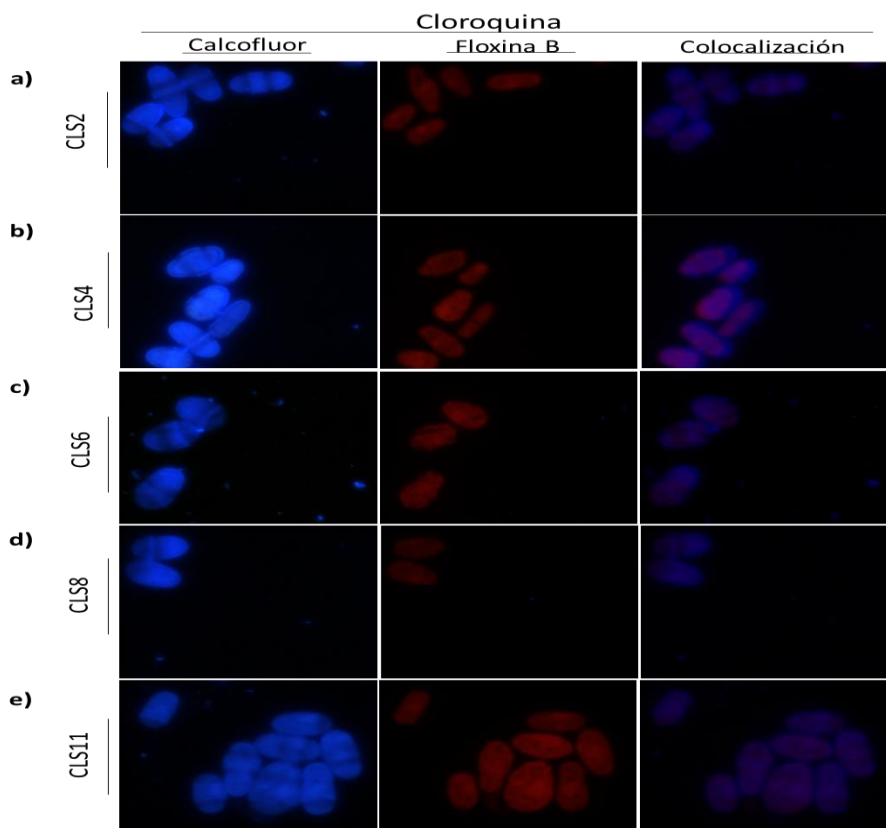
se observan células jóvenes y en los CLS6, 8 y 11 células envejecidas (**Figura 17, b1**). Para el caso del grupo CQ, se demuestra que 4 h después de la exposición a este compuesto (**Figura 17, a2**) se encuentra la presencia de gránulos en todo el citoplasma. Se sabe que la CQ se acumula en el lisosoma y previene su acidificación, siendo esencial el pH para la fusión de los autofagosomas (Klionsky et al. 2016), por lo que la existencia de estructuras redondas como gránulos podría ser el resultado de la acumulación de autofagosomas inmaduros en el citoplasma. En los días de envejecimiento cronológico, en la microscopía de contraste de fases (**Figura 17, 2b**), en el grupo CQ, se observa que la exposición a CQ no modifica la morfología en el CLS2, hay células bacilares; en la fluorescencia de calcoflúor (**Figura 18a**) este comportamiento se reforzó con la tinción de floxina B, donde se muestra que las células tienen un buen estatus energético, ya que pueden excluir al fluoróforo, en la señal de colocalización se observa que la señal es de color azul (células viables), por lo que en células jóvenes la inhibición de la autofagia no modifica su morfología ni su viabilidad.



**Figura 17. Efecto de la inhibición de la autofagia en el CLS de *S. pombe*.** La levadura se cultivó durante 48 h en YE, se cambió a medio EMM y se dividió en dos cultivos, al primero sólo se le observó después de 4 h y se envejeció 2, 4, 6, 8 y 11 días; al segundo se le agregó CQ [50 μM], se incubó y observó después de 4 horas, se dividió en 4, se realizó un lavado y se agregó medio nuevo EMM, una parte se envejeció durante 2, 4, 6, 8 y 11 días y se nombró grupo control CQ, las 3 muestras restantes se utilizaron para la exposición a los metales pesados. Vista a 40X.

A partir del CLS4, se encuentra una población heterogénea con células bacilares y otras redondeadas, este comportamiento también es notorio en la microscopía de fluorescencia con calcoflúor (**Figura 18b**), además la intensidad de la señal para floxina

aumenta a partir del CLS4 y se mantiene constante hasta el CLS11; la heterogeneidad prevalece en los CLS6, 8 y 11 (**Figura 18c, d y e**), pero no se agudiza; por lo que se concluye que la inhibición de la autofagia sólo induce de forma temprana el fenotipo de envejecimiento (CLS4); esto concuerda con estudios en células de mamíferos sin tratamiento alguno, donde se ha inhibido tanto genética como farmacológicamente la autofagia a diferentes niveles; se han observado citotoxicidad y cambios morfológicos que se parecen a aquellos asociados con el envejecimiento (Rubinsztein, Marino, & Kroemer 2011, Kroemer 2015).

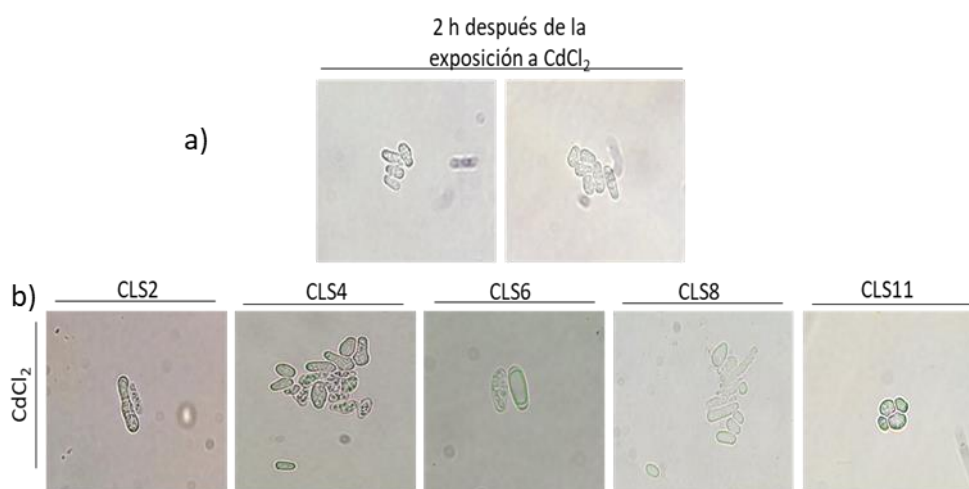


**Figura 18. Efecto de la inhibición de la autofagia en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*.** Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxacina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

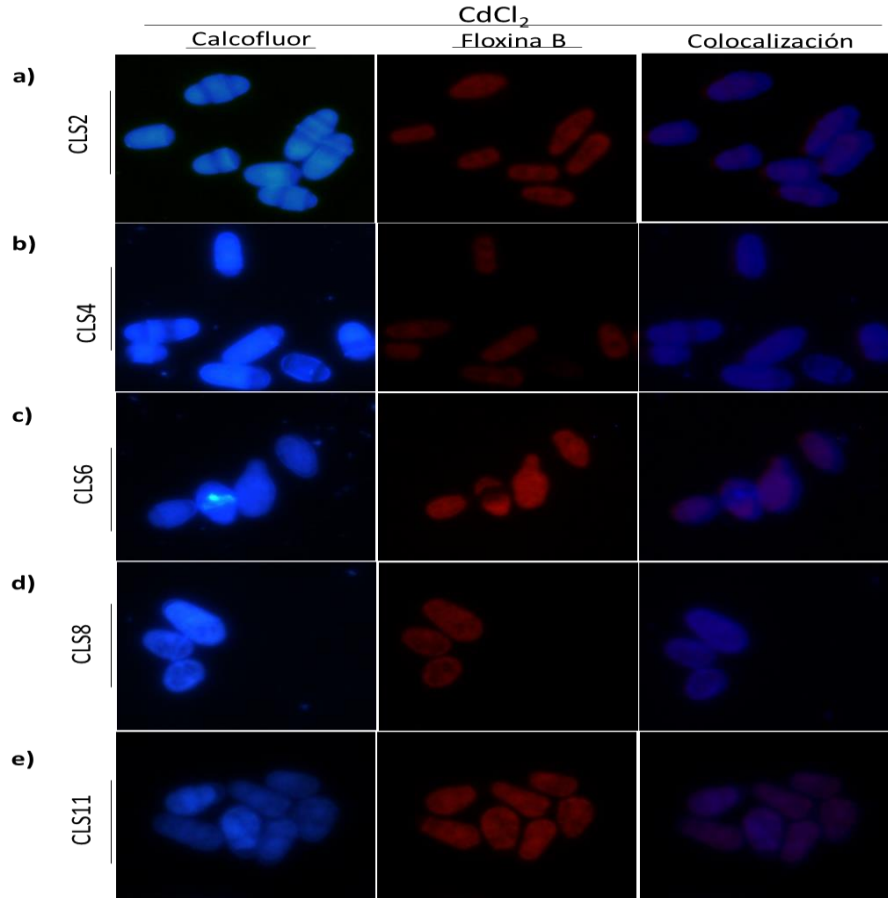
#### 7.4.2. Cadmio

En la microscopía de contraste de fases (**Figura 19a**) se observan dos fotomicrografías de diferentes campos después de la exposición a cadmio de 2h, las células muestran gránulos y se encuentran aglomeradas; en la **figura 19b** se observa una fotografía por cada día de envejecimiento, en todos los CLS las células tienen gránulos de estrés y muestran una pérdida de la forma bacilar, la heterogeneidad de la población también se

observa en las microscopías de fluorescencia en la tinción con calcoflúor (**Figura 20**), hasta el CLS6 en la tinción de floxina B, se observa un aumento en la intensidad de la señal, lo que sugeriría que a pesar de que las células presentan un fenotipo de envejecimiento temprano no pierden su capacidad energética hasta ese día; esto es similar a lo encontrado en cultivos primarios de osteoblastos de rata, donde el pretratamiento con CQ más la exposición a  $\text{CdCl}_2$ , disminuye la viabilidad celular en comparación a las células sólo tratadas con cadmio (Liu et al. 2016), también se ha observado en las células PC-12 que el cotratamiento con CQ y cadmio, reduce la autofagia y la actividad celular (Wanga et al. 2013). Posteriormente, en el CLS8 vuelve a disminuir la intensidad de la señal de este fluoróforo, esto también se relaciona con los resultados obtenidos en el objetivo particular uno (**gráfica 1 y figuras 10 y 11**), donde en el día 8 se sugiere que las células encienden mecanismos de sobrevivencia, ya que la intensidad de floxina B disminuye, sin embargo, en el CLS11 la intensidad de la fluorescencia de floxina B aumenta, indicando un estado energético deficiente; en la colocalización se observan células azules y en menor cantidad moradas, lo que es indicativo de que a pesar de que se inhibió la autofagia hay células viables.



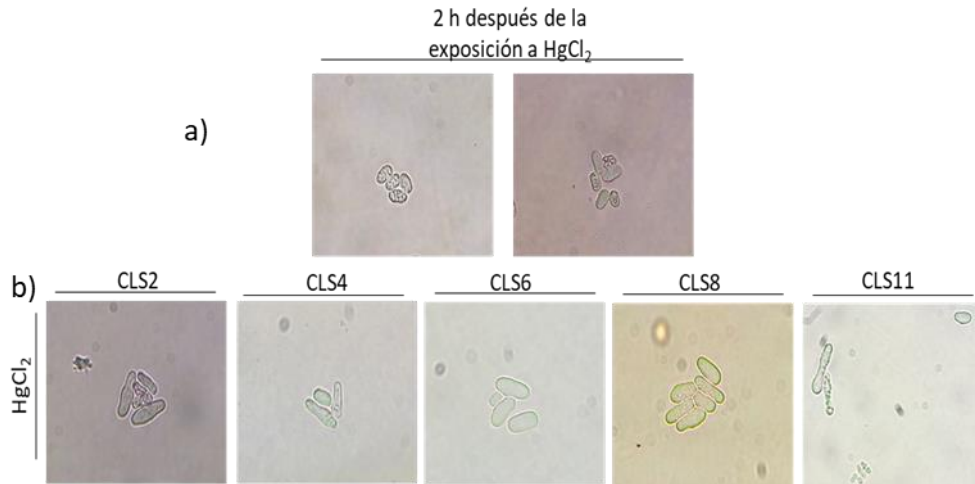
**Figura 19. Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a  $\text{CdCl}_2$  en el CLS de *S. pombe*.** Después de la exposición a CQ, las células se lavaron y se agregó medio EMM, se incubaron con  $\text{CdCl}_2$  [10  $\mu\text{M}$ ] durante 2 h (a), posteriormente se lavaron y se adicionó medio EMM, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11 (b). Vista a 40X.



**Figura 20.** Efecto de la inhibición de autofagia y la exposición a  $CdCl_2$  en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*. Las células se expusieron a  $5\text{ mg L}^{-1}$  de floxi~~n~~a B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

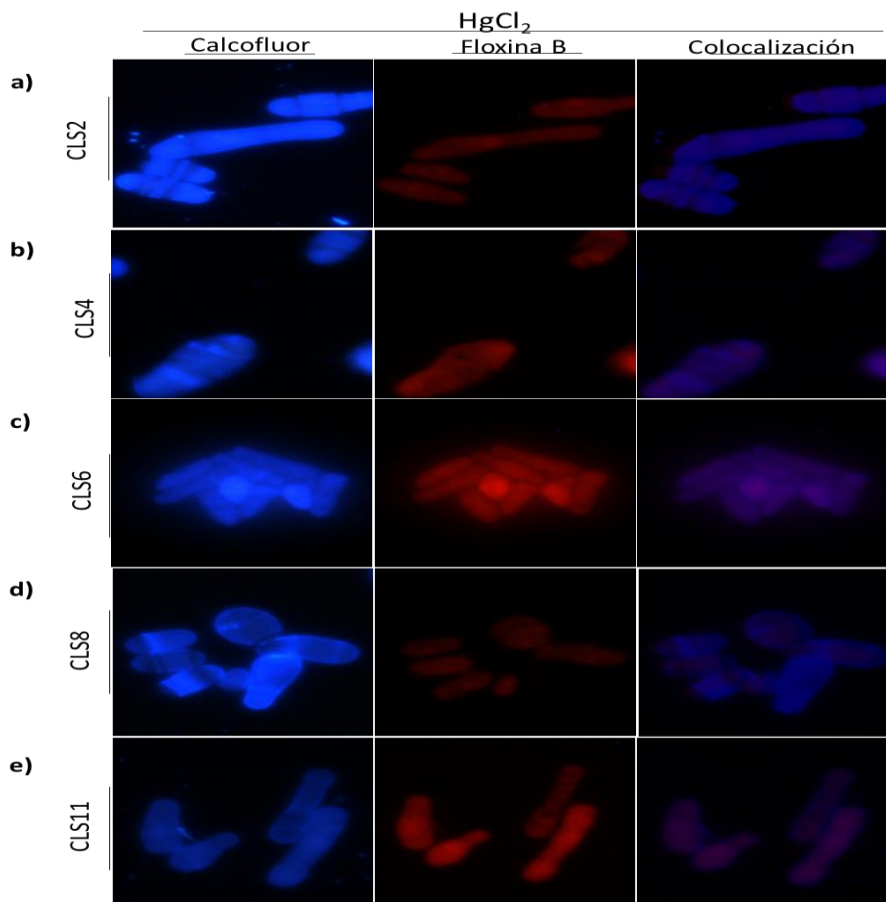
### 7.4.3. Mercurio

A través de la microscopía de contraste de fases se observa que inmediatamente después de la exposición a mercurio (**Figura 21a**, dos microfotografías de campos diferentes) las células tienen gránulos de estrés, en todos los días de envejecimiento cronológico se observa que tienen una morfología heterogénea (**Figura 21b**); en un modelo de eucariota superior, el  $HgCl_2$  en un cultivo primario de astrocitos de ratas, el pretratamiento con CQ y 3-metiladenina (3-MA) incrementa la citotoxicidad y el número de células apoptóticas (Yuntao et al. 2016).



**Figura 21. Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a  $HgCl_2$  en el CLS de *S. pombe*.** Después de la exposición a CQ, las células se lavaron y se agregó medio EMM, se incubaron con  $HgCl_2$  [19  $\mu M$ ] durante 2 h (a), posteriormente se lavaron y se adicionó medio EMM, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11 (b). Vista a 40X.

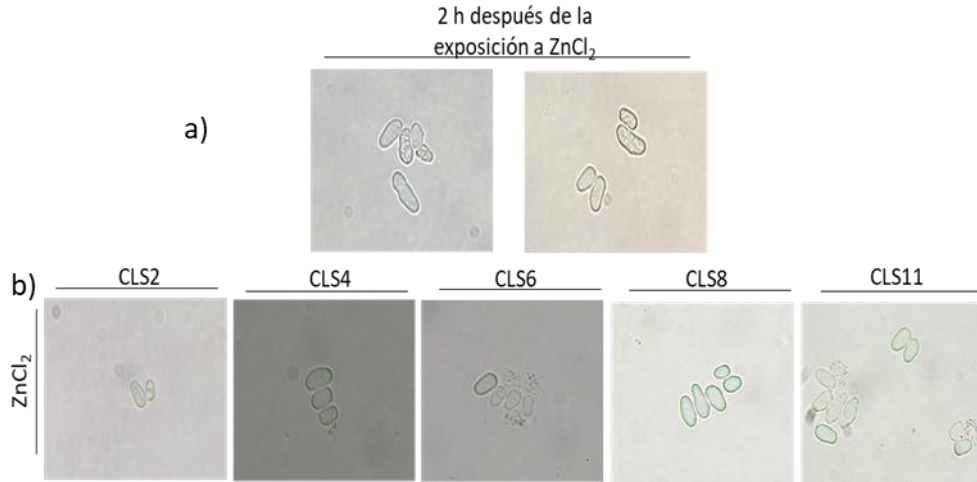
Al complementar la información con la fluorescencia a calcoflúor (**Figura 22**) se observó que en los CLS4, 6 y 11 la intensidad de fluorescencia es mayor que en los CLS2 y 8 como lo encontrado en el grupo cadmio, lo que indica que a pesar de ser metales diferentes las células encienden mecanismos de sobrevivencia similares en células jóvenes (CLS2) y en células envejecidas (CLS8), por lo que sería conveniente estudiar la vía Ras/PKA y determinar si los TF de respuesta a estrés como Msn2/4 y Yap1p se encuentran activos.



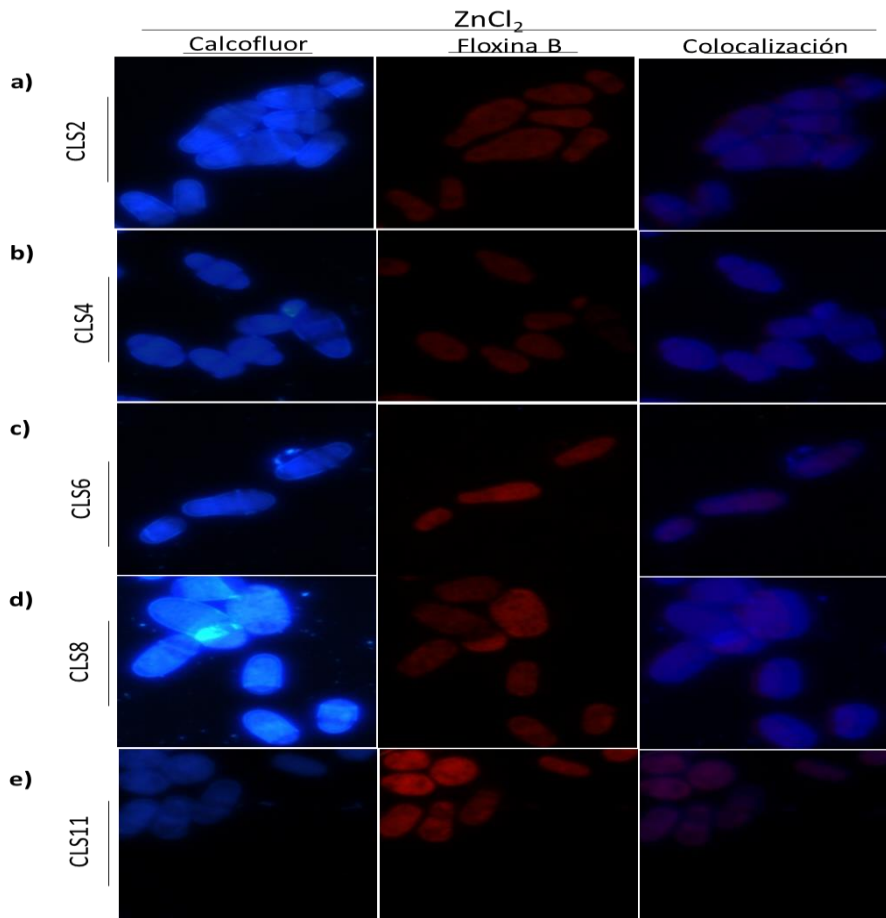
**Figura 22.** Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a HgCl<sub>2</sub> en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*. Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxiina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

#### 7.4.4. Zinc

En las **figuras 23** y **24**, microscopía de contraste de fases y fluorescencia respectivamente, se encuentra que las células tienen una morfología casi homogénea después de las 2 h de exposición al metal (**Figura 23a**, dos microfotografías de dos campos diferentes) y en el envejecimiento desde el CLS2 hasta el CLS8 (**Figura 23b**), se observan células bacilares y algunas con un aumento de volumen celular, hasta el CLS 11 se observan gránulos de estrés y una heterogeneidad marcada de la población, además, interesantemente las células no tienen un compromiso energético marcado hasta el CLS6, el cual se confirma en la colocalización por un aumento en la señal morada. A pesar de que se inhibió la autofagia y además las células se expusieron a una dosis tóxica de zinc, se sigue observando como en los experimentos previos, un aumento en el volumen celular, por lo que se podría sugerir que el zinc no ejerce un efecto tóxico exacerbado como el cadmio y el mercurio.

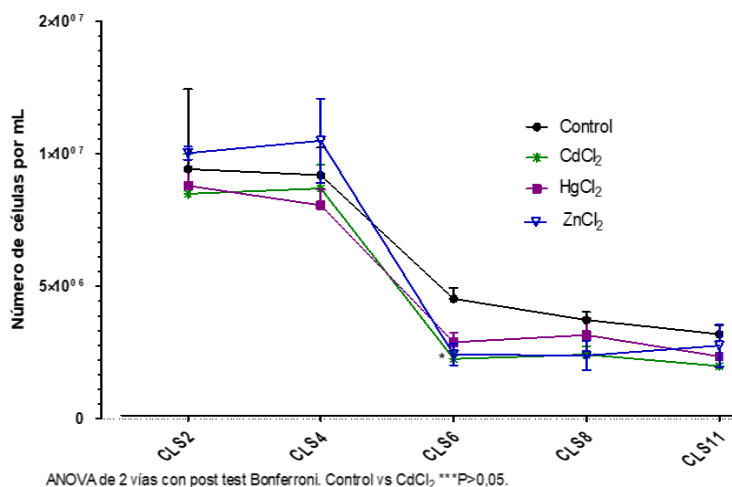


**Figura 23. Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a  $ZnCl_2$  en el CLS de *S. pombe*.** Después de la exposición a CQ, las células se lavaron y se agregó medio EMM, se incubaron con  $ZnCl_2$  [1000  $\mu$ M] durante 2 h (a), posteriormente se lavaron y se adicionó medio EMM, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11 (b). Vista a 40X.



**Figura 24. Efecto de la inhibición de la autofagia y la exposición a  $ZnCl_2$  en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*.** Las células se expusieron a 5  $mg L^{-1}$  de floxina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron inmediatamente en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

Recientemente se demostró en la levadura *S. cerevisiae* que la depleción total del zinc del medio EMM durante 15 h induce el proceso de autofagia (Kawamata et al. 2017), la explicación a este fenómeno se basa en la necesidad de la célula de degradar proteínas para reciclar el zinc que hay en ellas y pueda utilizarlo en otros procesos para mantener su viabilidad (Kawamata et al. 2017). Tomando en cuenta este estudio, en nuestros experimentos la exposición a metales pesados se realiza en medio EMM adicionado con vitaminas y minerales (adicionados con zinc), lo que sugiere que este zinc compite con el cadmio y mercurio para su ingreso al citoplasma, probablemente sí entre una parte de los metales pero no todo, además, al lavar las células y volverlas a colocar en medio EMM con vitaminas y minerales, el zinc de ese nuevo medio podría compensar la depleción de este metal; razón por la cual se planteó realizar un nuevo experimento bajo las siguientes condiciones experimentales: se realizó un precultivo en medio YE, dos días después se cultivaron las células en medio EMM con vitaminas y minerales y se expuso a las células a las EC<sub>10</sub> de cadmio ó mercurio ó zinc, después se lavaron y se le agregó nuevo medio EMM con vitaminas y minerales sin zinc, se cultivó a las células en los CLS2, 4, 6, 8 y 11, se caracterizaron estos grupos experimentales a través del ensayo de UFCs (**Gráfica 24**), microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia (con calcoflúor y floxina B).



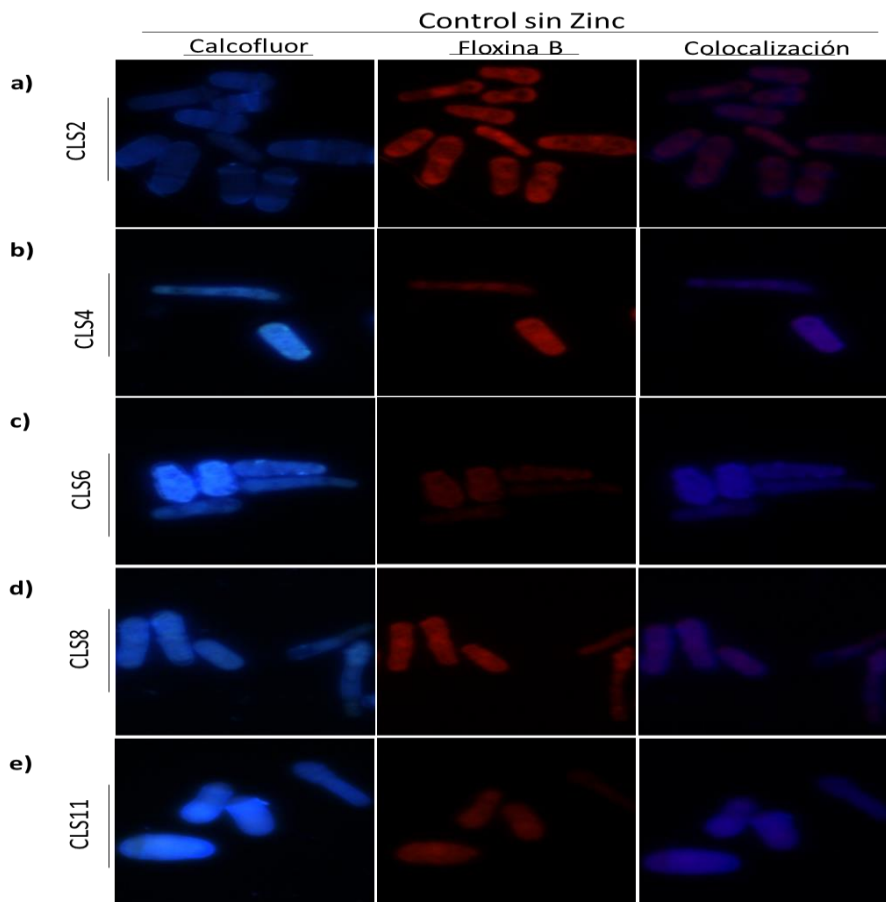
**Gráfica 24.** Unidades formadoras de colonias de *S. pombe* con autofagia inducida y expuesta a CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> en CLS. Se hicieron diluciones seriales en los CLS2-11 y se realizó el ensayo de UFCs, las placas se incubaron 48 h a 29 °C. Los resultados se analizaron en el programa *ImageJ*, se graficó en el programa *GraphPad Prism5* y se realizó una ANOVA de 2 vías con post test Bonferroni.

#### 7.4.5. Control sin zinc

A través de la microscopía de contraste de fases (**Figura 25**) se observa que las células son capaces de mantener su morfología típica bacilar tanto en los CLS2 y 4 (células jóvenes) y en los CLS6, 8 y 11 (células envejecidas); este comportamiento se coteja con la tinción de calcoflúor (**Figura 26**), donde la intensidad de fluorescencia es alta, para la tinción con floxina B se denota que la intensidad de fluorescencia es mayor en los CLS2 y 4. Esta evidencia sugiere que la eliminación del zinc del medio de cultivo activa el proceso de autofagia, por lo que la limpieza de organelos, proteínas y lípidos dañados no disminuye respecto al tiempo, sin embargo, la deficiencia de zinc podría disminuir la viabilidad celular, razón por la cual encontramos un aumento de la señal a floxina en etapas tempranas de estudio, esto se correlaciona con el ensayo de UFCs (**Gráfica 24**, línea negra) donde la tendencia de la línea es similar a los resultados previos (**Gráfica 1**, línea negra), difiriendo en el número de células por mL, en este último experimento se cuantificaron menos células en comparación con el primero; por lo que la deficiencia de zinc disminuye la capacidad de entrar al ciclo celular, ya que se ha reportado en diferentes modelos eucariotas que el zinc es esencial para la proliferación celular, la diferenciación, la síntesis de ADN y la mitosis (Beyersmann & Haase 2001), además de que es un elemento esencial de proteínas como la SOD de cobre que regulan el metabolismo de las ERO e inhiben la apoptosis (Clegg et al. 2005).



**Figura 25. Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc en el CLS de *S. pombe*.** La levadura se cultivó durante 48 h en YE, se cambió a medio EMM durante 4 horas, se realizó un lavado y se agregó medio EMM sin Zinc, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.



**Figura 26.** Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*. Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

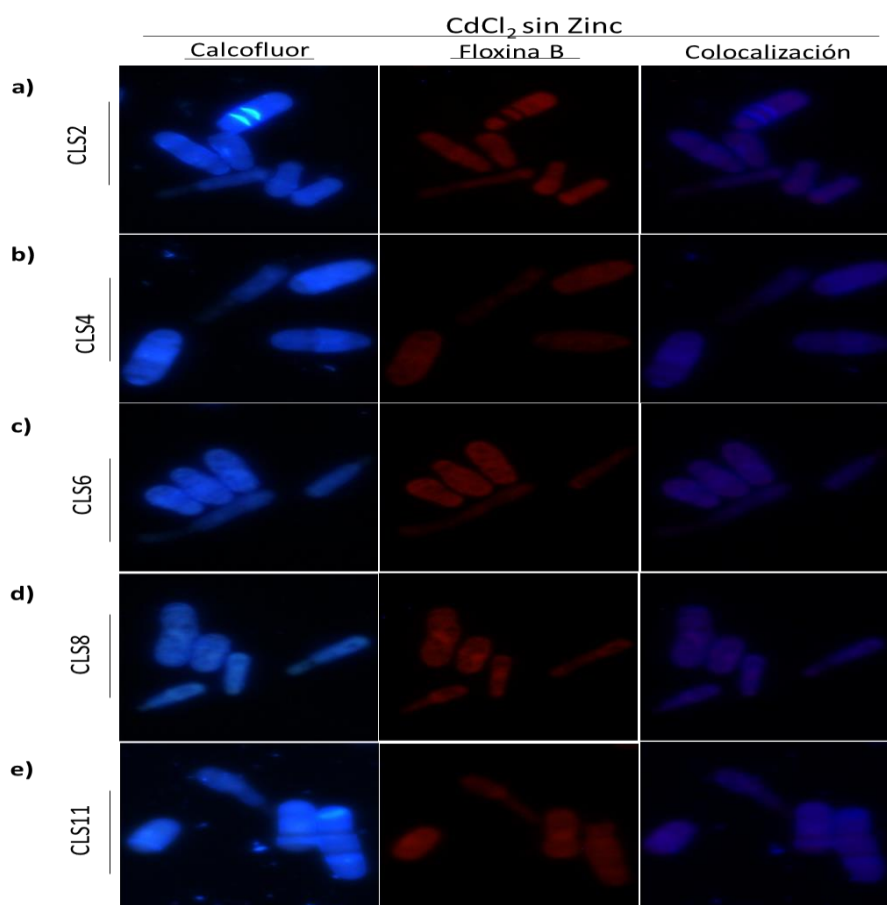
#### 7.4.6. Cadmio sin zinc

En la microscopía de contraste de fases (**Figura 27**), en todos los días de estudio (CLS2-11), la mayor parte de la población conserva su morfología bacilar típica, mientras que una pequeña parte de la población desde el CLS2 muestra pérdida de la morfología y gránulos de estrés, lo cual se correlaciona con los resultados de la microscopía de fluorescencia a calcoflúor (**Figura 28**), sin embargo, en la tinción de floxina B se observa que las células tienen una capacidad energética reducida y en la colocalización hay células de color morado claro, indicando que no están muertas, pero que probablemente pudiesen estar entrando al programa de muerte celular y que comienzan a perder la integridad de la pared celular, cabe destacar que en el ensayo de UFCs (**Gráfica 24**, línea verde) no se encuentran diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin zinc, estos

resultados se correlacionan con un estudio en osteoblastos primarios de rata (Liu et al. 2015), donde la muerte celular mediada por apoptosis disminuyó por el pretatamiento con rapamicina (inductor de la autofagia) antes de la exposición a cadmio, sin embargo, en comparación con la **gráfica 1**, hay una disminución significativa del número de células que pueden entrar al ciclo celular.



**Figura 27. Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición a cadmio en el CLS de *S. pombe*.** La levadura se cultivó durante 48 h en YE, se cambió a medio EMM durante 4 horas, se realizó un lavado y agregó medio EMM con 10  $\mu$ M de CdCl<sub>2</sub>, se expusieron las células durante dos horas, se lavaron y agregó medio EMM sin zinc, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.

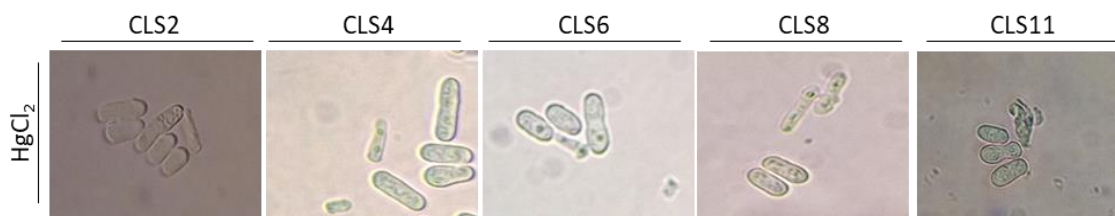


**Figura 28. Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición de cadmio en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*.** Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

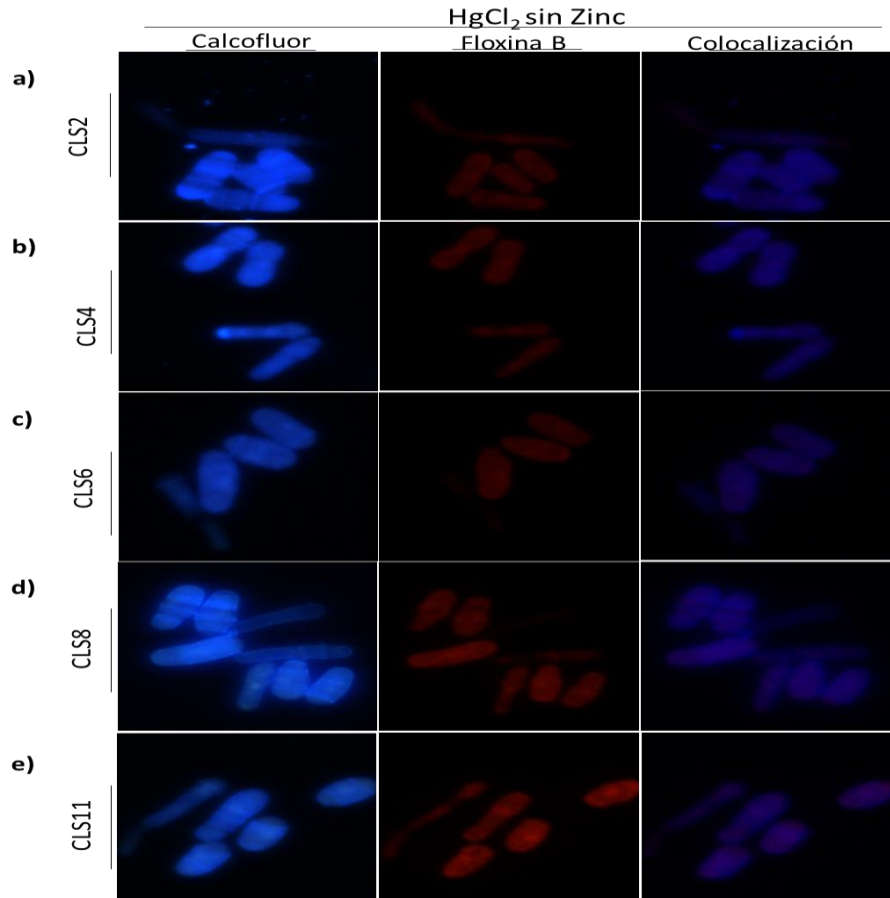
#### 7.4.7. Mercurio sin zinc

De forma similar a los resultados del grupo cadmio sin zinc, en todos los días de estudio CLS2-11 la mayor parte de la población mantiene su morfología bacilar, otra parte de las células la modifican a delgadas, alargadas y con gránulos (**Figura 29**); en la microscopía de fluorescencia a calcoflúor (**Figura 30**) se observa el mismo comportamiento que el grupo cadmio sin zinc, se observa una intensidad de fluorescencia alta, en la tinción con floxina B las células se tiñen pero este fluoróforo se encuentra disperso en el citoplasma y aumenta la intensidad de la fluorescencia a partir del día 8, lo que también se observa en las fotografías de colocación, lo que se correlaciona con los resultados de la **gráfica 24**, línea morada, ya que este grupo no muestra diferencias estadísticamente significativas en la entrada al ciclo celular con el grupo control sin zinc.

En eucariotas superiores, se ha encontrado que el número de células apoptóticas en astrocitos de rata pretratados con rapamicina y posteriormente expuestos a metil mercurio [MeHg]<sup>+</sup> disminuye comparado con los astrocitos tratados sólo con el metal (Yuntao et al. 2016), por lo que nosotros concluimos que en *S. pombe* la inducción de la autofagia seguida de la exposición a mercurio tiene un efecto directo en el mantenimiento de la morfología tanto en células jóvenes como envejecidas y que estas células pueden equiparar su ciclo celular respecto a las células control sin zinc.



**Figura 29. Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición a mercurio en el CLS de *S. pombe*.** La levadura se cultivó durante 48 h en YE, se cambió a medio EMM durante 4 horas, se realizó un lavado y agregó medio EMM con 19  $\mu$ M de HgCl<sub>2</sub>, se expusieron las células durante dos horas, se lavaron y agregó medio EMM sin zinc, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.



**Figura 30.** Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición de mercurio en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*. Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcoflúor, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes obtenidas se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

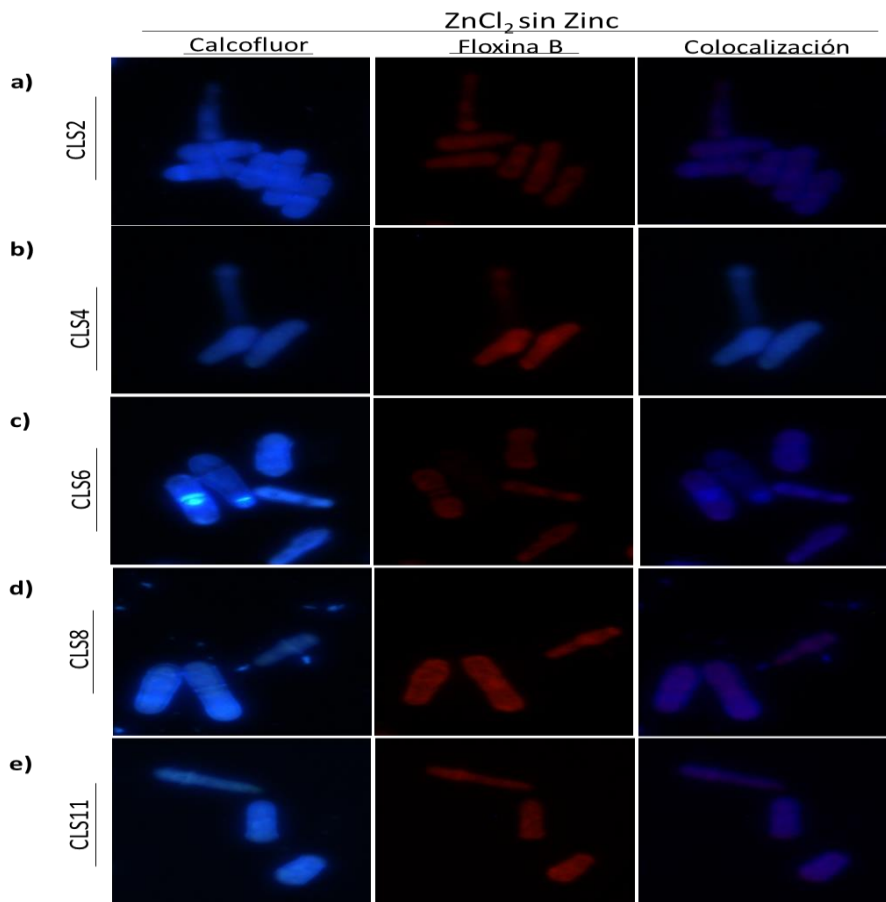
#### 7.4.8. Zinc sin zinc

La inducción de la autofagia a través de la depleción de zinc en el medio, después de la exposición a una dosis tóxica de zinc, no modifica la morfología bacilar de la levadura de fisión, se observa tanto en la microscopía de contraste de fases (**Figura 31**) y en la tinción con calcoflúor (**Figura 32**) que en todos los días de envejecimiento cronológico (CLS2-11) las células son homogéneas, además presentan una mayor viabilidad energética al excluir a la floxina de su citoplasma (**Figura 32**) en comparación con los otros metales; en la colocalización se denota que la intensidad de la señal morada es débil, sin embargo a pesar de estas características las células no aumentan su capacidad para ingresar al ciclo celular y se equipara al grupo control sin zinc (**Gráfica 24**, línea azul). El comportamiento observado en este grupo podría deberse a que las células al ser primero expuestas a una concentración

alta de zinc aumentan su concentración citosólica y pudiesen mantener al metal en los zincosomas, en las vacuolas y en las metaloproteínas (Beyersmann & Haase 2001, Borrelly et al. 2002), pero al sembrar las células en un medio sin zinc, pudiesen liberar al metal en los compartimentos antes mencionados para compensar la falta de zinc a lo largo del envejecimiento cronológico; sin embargo, esto podría no ser suficiente como para que las células ingresen al ciclo celular; por lo que primero se debe cuantificar por espectrometría atómica de masas la concentración del metal en el citosol y en las vacuolas, antes y después de la exposición, así como en los días de envejecimiento, se podría cuantificar por western blot la expresión de la MT, además, sería interesante determinar el tamaño y localización de los zincosomas a través de una microscopía de fluorescencia utilizando NBD-TPEA. Por otra parte, sería necesario cuantificar a la proteína PcaI para poder dilucidar la viabilidad celular.



**Figura 31. Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición a zinc en el CLS de *S. pombe*.** La levadura se cultivó durante 48 h en YE, se cambió a medio EMM durante 4 horas, se realizó un lavado y agregó medio EMM con 1000  $\mu$ M de ZnCl<sub>2</sub>, se expusieron las células durante dos horas, se lavaron y agregó medio EMM sin zinc, se obtuvieron células envejecidas en los CLS2, 4, 6, 8 y 11. Vista a 40X.



**Figura 32. Efecto de la inducción de la autofagia por inanición de zinc y la exposición de zinc en la viabilidad celular en el CLS de *S. pombe*.** Las células se expusieron a 5 mg L<sup>-1</sup> de floxina B. Se agregaron cantidades iguales de NaOH [10%] y calcofluor, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las imágenes se procesaron en el programa *FIJI NHI*. Vista a 40X.

### 7.5. Evaluación de la autofagia

Al encontrar evidencia de la relación del mantenimiento de la morfología y del estado energético de la célula, se decidió evaluar por qPCR a los transcritos de autofagia *atg1*, 3, 4, 5, 8, 14 y 17, para determinar si bajo las condiciones de inducción de autofagia la transcripción de estos genes se regulaba positivamente. Este conjunto de genes se eligió ya que participan en diferentes procesos autofágicos; las evaluaciones se realizaron en células jóvenes (CLS2) y envejecidas (CLS8) control y expuestas a las EC<sub>10</sub> de CdCl<sub>2</sub> ó HgCl<sub>2</sub> ó ZnCl<sub>2</sub>, así como células envejecidas en el mismo día en el paradigma de depleción de zinc en el medio EMM. Se decidió utilizar el día 8 de envejecimiento porque en todas las microscopías de fluorescencia se observó una disminución de la intensidad de floxina, así

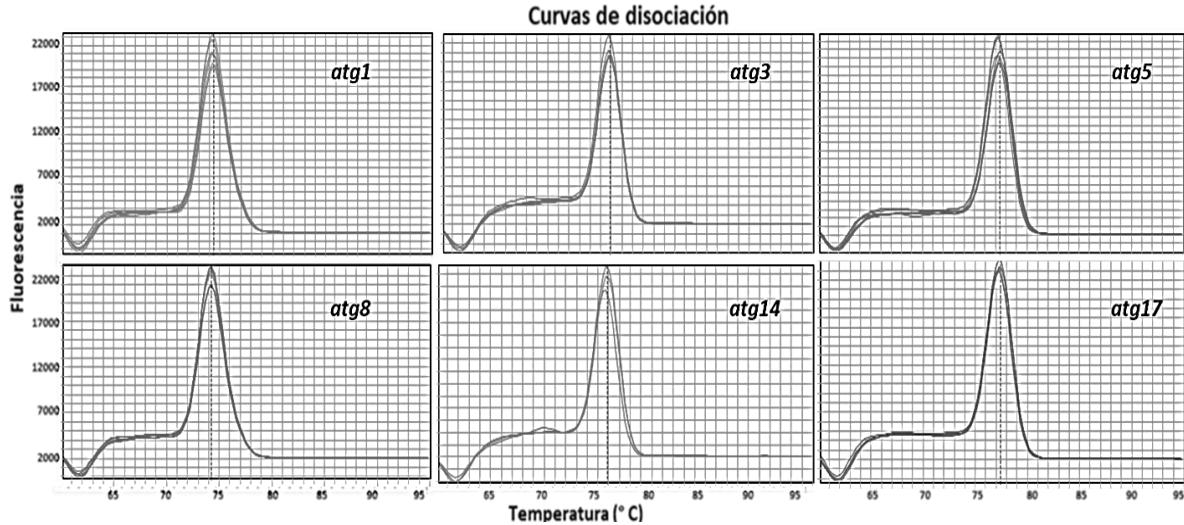
como una disminución de la intensidad en la colocalización, como se ha propuesto en este día se podrían activar mecanismos de sobrevivencia. Para complementar la información, se realizó una microscopía de fluorescencia para determinar el estado de la autofagia en las células CLS8 control, expuestas a CQ y con depleción del zinc, esto con la finalidad de observar cómo se encontraba el proceso en células que son envejecidas y con la autofagia inhibida que es un requisito para poder dictaminar con precisión si realmente bajo las condiciones de interés la autofagia se induce (Klionsky et al. 2016); para ello se utilizó el fluoróforo naranja de acridina, que tiñe a los lisosomas y endosomas en una tonalidad naranja-roja, mientras que los compartimientos no ácidos son teñidos en color verde.

En la **tabla 10** se muestran los oligonucleótidos utilizados para los genes *atg1*, 3, 5, 8, 14 y 17 los cuales fueron diseñados en trabajos previos del laboratorio (Segundo 2015).

**Tabla 10. Diseños de oligonucleótidos para qPCR de los genes *atg1*, 3, 5, 8, 13 y 17.** Estos cebadores se diseñaron en nuestro equipo de trabajo con anterioridad (Segundo 2015).

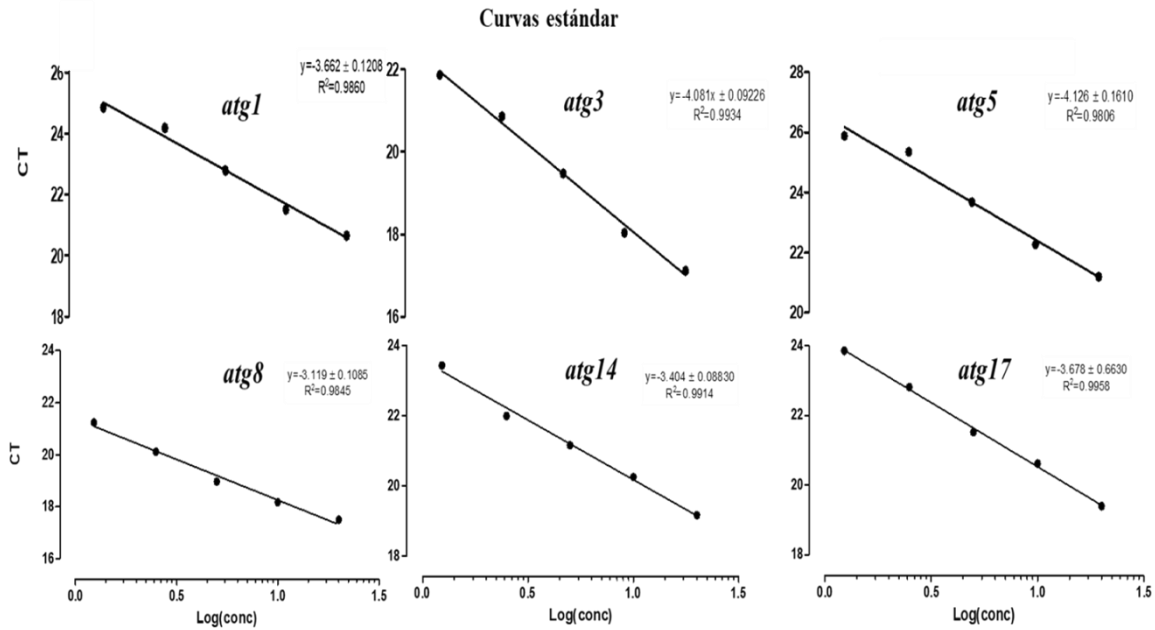
Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Tm (°C)	GC (%)	PM (g/mol)	Tamaño del amplicon (pb)
<i>atg1</i> -sentido	CGG TTT GTT GCG TAC AGC TTT CCA	60.7	50	7325.8	152
<i>atg1</i> -antisentido	TGC TAG CAG CAG GAG CAC TTT CA	60.9	52.2	7048.6	
<i>atg3</i> -sentido	TGT GGA AAT GGC TGC TTA CAT AGG	59.5	52.2	7423.9	112
<i>atg3</i> -antisentido	GGA GGA TCT CGA AGA TCG GCA AAG A	60.7	52	7789.1	
<i>atg5</i> -sentido	TCT CTG GCC TAT CTA GCT AC GTC	57.3	45.8	7403.9	91
<i>atg5</i> -antisentido	AAG GGA GTG AAG GTG CCA ACA G	57.8	50	6857.5	
<i>atg8</i> -sentido	ACA GAG TCT CAA AGA ATC CGG GAA	57.8	45.8	7403.9	127
<i>atg8</i> -antisentido	ACC AAC TGT AAG GTC AGA TGG AAC G	58.6	48	7724.1	
<i>atg14</i> -sentido	TTT CAG GAG GAG GAG TTT CAG CAG	58.6	50	7472.9	136
<i>atg14</i> -antisentido	TCG TCC TCA TCT GAG TGA TGC T	57.6	50	6692.4	
<i>atg17</i> -sentido	ACT GCC GAA GAA CTT GCG GAT TTG	60.2	50	7392.8	99
<i>atg17</i> -antisentido	TCT CCG CAT CAG AAA GGG TGT CAT	60.2	50	7352.8	

Para determinar que los oligonucleótidos sólo amplificaran un solo producto de PCR se generaron curvas de disociación en el termociclador de tiempo real (**Gráfica 25**), se observa que al existir un solo pico en cada curva el amplicón generado es un producto único.



**Gráfica 25.** Curvas de disociación de los genes *atg1*, 3, 5, 8, 14 y 17. Se observa la generación de un solo amplicón representado por un solo pico en la curva.

Para determinar el método apropiado de cuantificación se generó una curva estándar por cada gen, las curvas contaron de 5 puntos utilizando 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ng de ADNc, se graficaron los valores de Ct en función del log<sub>10</sub> de la concentración de ADNc (**Gráfica 26**), se realizó una regresión lineal donde se observa un coeficiente de correlación cercano a  $R \geq 0.99$ , indicando buena reproducibilidad y precisión. Debido a que la eficiencia de cada uno de los genes fue diferente se optó por utilizar el método de cuantificación relativo a la curva estándar. Después de realizar los ensayos de qPCR y los cálculos correspondientes, para cada gen por grupo se realizó una ANOVA de una vía con post test de *Dunnnett*, donde se compararon los CLS8 y CLS8 sin zinc contra el CLS2, además, las gráficas se agruparon dependiendo del proceso en el que están involucrados. Después de las gráficas de qPCR se encuentran las microscopías de fluorescencia a naranja de acridina, y se realizó una correlación entre los transcritos y el proceso, como se muestra a continuación.

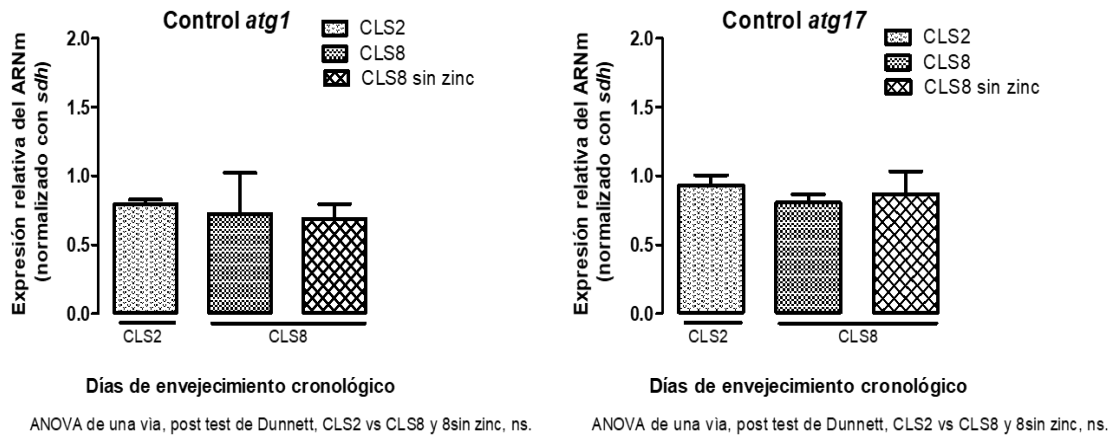


**Gráfica 26. Curvas estándar de los genes *atg1*, *3*, *5*, *8*, *14* y *17*.** Se realizó una curva estándar de 5 puntos con 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 ng de ADNc, se graficaron los CTs obtenidos contra el logaritmo de la concentración del ADNc en el programa *GraphPad Prism5*. Las gráficas cuentan con un coeficiente de correlación cercano a  $R \geq 0.99$ .

### 7.5.1. Control

En la **gráfica 27** se muestran los niveles relativos de los transcritos *atg1* y *atg17*, que forman parte del complejo de iniciación de la autofagia. En ninguno de los dos genes se encuentran diferencias estadísticamente significativas del transcrito en células jóvenes, envejecidas ni en envejecidas sin zinc, probablemente en estos días y bajo estas condiciones las células no necesiten aumentar la síntesis del transcrito porque a nivel postraduccional se está regulando de forma positiva, sin embargo, no hay estudios a nivel del transcrito ni del nivel proteico de ninguna de estas proteínas en un modelo de envejecimiento, por lo que se necesitaría estudiar con mayor detalle, lo cual podría iniciarse con análisis *in silico*.

## Control: Complejo de iniciación

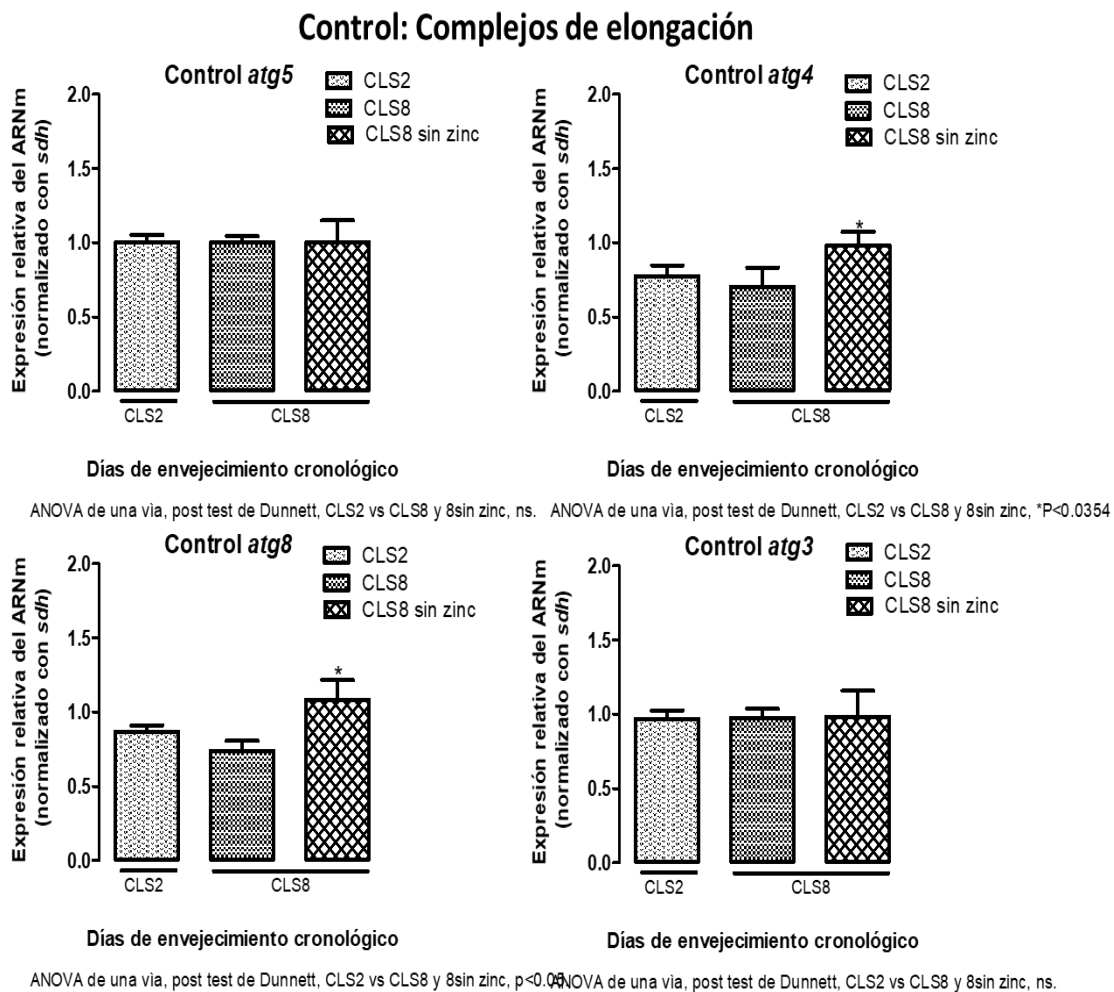


**Gráfica 27.** Expresión relativa del ARNm de *atg1* y *atg7* del complejo de iniciación en los CLS2 y 8 control.

Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo control en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

Para el caso de los complejos de elongación (**Gráfica 28**), los niveles del transcrito *atg5* no se modificaron bajo las tres condiciones experimentales; este gen codifica para una proteína que forma parte del tetrámero conformado por Atg12-5-16, que induce la formación del enlace amida entre Atg8-PE; probablemente la eficacia de formación del enlace por unidad del complejo es alta, por lo que no es necesario aumentar los niveles del transcrito bajo ninguna condición. Por otra parte, *atg4* sí muestra diferencias estadísticamente significativas en la condición sin zinc, cabe recordar que esta es una proteasa que escinde a la proteína Atg8 para exponer su residuo de glicina y recientemente se ha determinado que tiene un rol importante para la expansión eficiente del fagóforo (Hirata, Ohya, & Suzuki 2017), además, también se necesita que esta proteasa corte a Atg8 para que pueda madurar en los lisosomas, por lo que probablemente bajo nuestra condición experimental de depleción de zinc, la cantidad, el tamaño de los autofosomas y/o la eficacia de maduración sea mayor en comparación a las otras condiciones; sin embargo, tomando en cuenta la **figura 33** (en las columnas hay dos microfotografías de diferentes campos de cada día), las células del día 8 se encuentran en color rojo, lo que pudiese indicar que hay muchos compartimientos ácidos pequeños repartidos en todo el citoplasma de la célula los cuales pueden ser lisosomas y autolisosomas, en las células a las que se les inhibió la autofagia con CQ no se observó un aumento de compartimientos ácidos (en color rojo), sugiriendo que a pesar de

observar esta condición 8 días después de la incubación con CQ, esta afecta a largo plazo el proceso de maduración de los autofagosomas en los lisosomas y al inducir la autofagia, se pueden observar un menor número de compartimentos acídicos, sin embargo, estos se observan notablemente más grandes en comparación a la condición de envejecimiento control.

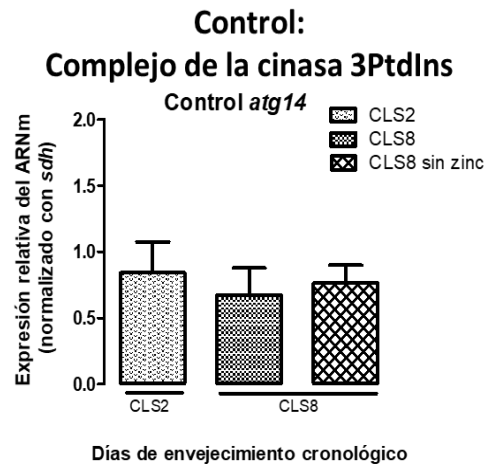


**Gráfica 28. Expresión relativa del ARNm de atg5, 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 control.** Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo control en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

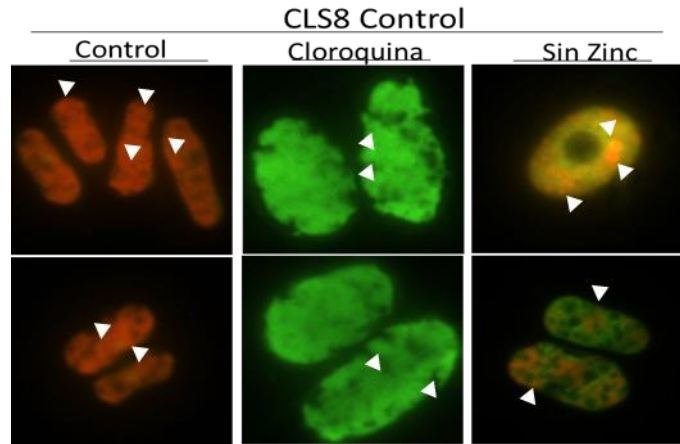
En la condición sin zinc, el transcrito *atg8* aumenta de forma significativa, correlacionándose con los niveles de *atg4*, por lo que sería importante en futuros experimentos analizar el tamaño de los lisosomas utilizando el fluróforo FM4-64, que tiñe con mayor eficacia a los lisosomas, así como evaluar por fluorescencia la presencia de Atg8 y observar su distribución en el citoplasma y en los autofagosomas. Para el caso del

mensajero *atg3*, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, por lo que probablemente no es una proteína paso limitante como Atg4 y 8 (Hirata, Ohya, & Suzuki 2017, Reggiori & Klionsky 2013, Glick, Barth, & Macleod 2010, Klionsky et al. 2011, Nakatogawa et al. 2009).

Para el caso de *atg14* perteneciente al complejo de la 3PtdIns (**Gráfica 29**), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, la función de este complejo es vital, puesto que realiza la nucleación y el ensamblaje inicial de la membrana del fagóforo (Reggiori & Klionsky 2013, Glick, Barth, & Macleod 2010, Nakatogawa et al. 2009), este resultado parece contrario a lo encontrado en *atg4* y 8, para lo cual se propone estudiar la estabilidad del mensajero, así como los mecanismos postraduccionales de regulación de la proteína.



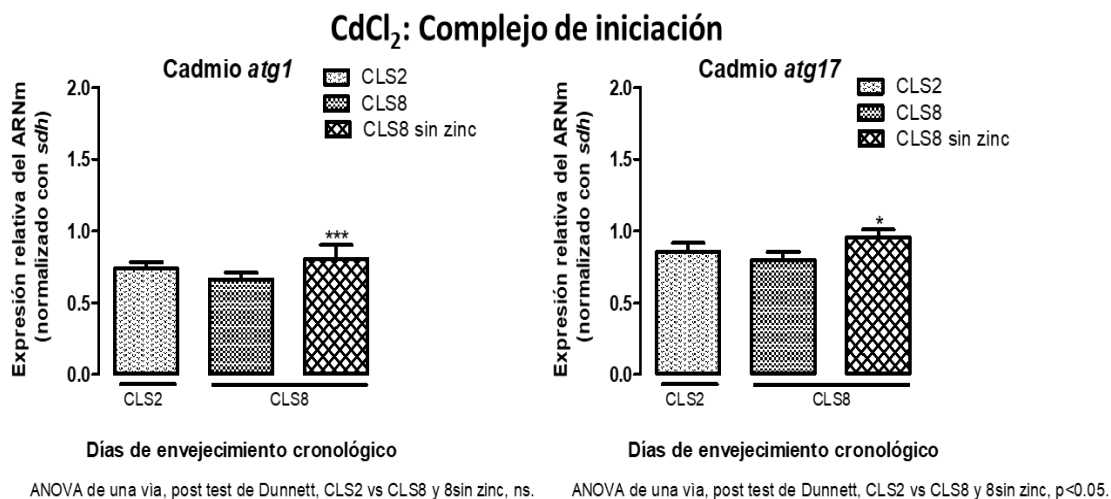
**Gráfica 29.** Expresión relativa del ARNm de *atg14* del complejo de la 3PtdIn en los CLS 2 y 8 control. Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo control en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.



**Figura 33. Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo control.** Se obtuvieron las células bajo las condiciones antes descritas, se lavaron con PBS, se les agregó naranja de acridina [5 µg/mL], se incubaron 15 min a 29 °C en agitación, se lavaron y montaron, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las flechas blancas muestran el puntillero rojo (control y sin zinc) perteneciente a los compartimentos ácidos, probablemente lisosomas y autolisosomas, en verde (cloroquina) el puntillero es verde, probablemente se relacione a un aumento en los autofagosomas inmaduros. Vista 100X.

### 7.5.2. Cadmio

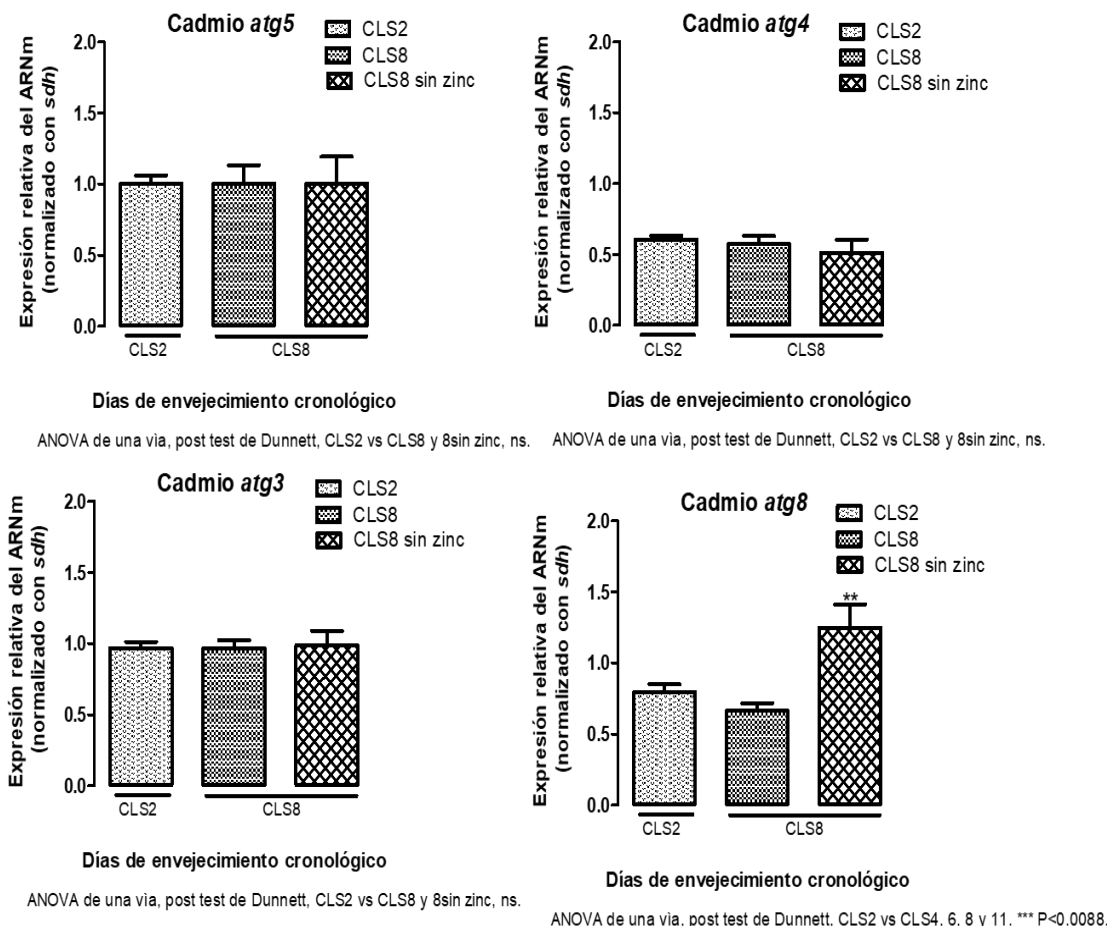
En el complejo de iniciación, el mensajero de *atg1* muestra niveles equiparables en células jóvenes y envejecidas del día 8 (**Gráfica 30**), se ha descrito que es un inductor de la autofagia, sin embargo, los estudios de inducción de autofagia se han realizado inmediatamente después de la exposición a cadmio y bajo nuestras condiciones experimentales esto no fue factible, ya que nuestro objetivo es analizar el efecto de la exposición sobre el envejecimiento cronológico; por otro lado, ya que el cadmio puede desplazar al zinc, al eliminar este metal del medio y proveer nuevo medio EMM con zinc, probablemente las células no necesiten activar la autofagia para suplir sus necesidades de zinc, por lo que es importante la cuantificación de este metal en la levadura. En el grupo sin zinc sí se encuentran diferencias estadísticamente significativas, por lo que probablemente la exposición a cadmio disminuyó el depósito disponible de zinc y al no encontrarlo en el medio de cultivo las células se ven obligadas a aumentar la transcripción de *atg1* para iniciar el proceso de autofagia, esto se correlacionaría con el comportamiento del transcrito *atg17*, en las células sin zinc, donde sí se observa un aumento en sus niveles; para comprobar esta hipótesis se propone realizar una fluorescencia y colocalizar las proteínas Atg1 y 17 con los de sitios de ensamble de los fagóforos.



**Gráfica 30. Expresión relativa del ARNm de *atg1* y *atg7* del complejo de iniciación en los CLS2 y 8 grupo cadmio.** Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo cadmio en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

En los complejos de elongación no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los mensajeros correspondientes a *atg5* y *atg3* (**Gráfica 31**), por lo que probablemente su expresión basal sea suficiente para llevar a cabo sus funciones con eficacia. En este caso, el transcrito de *atg4* no se modificó, cabe recordar que esta proteasa se modula a nivel postrasduccional con las ERO, también se ha descrito que tanto la exposición a cadmio (Erfurt, Roussa, & Thévenod 2003, Son et al. 2011, Messner et al. 2016, Wang et al. 2016, Liu et al. 2015, Liu, Qu, & Kadiiska 2009) y en el envejecimiento cronológico hay un aumento en los niveles de estas (Fabrizio & Longo 2008, Hill & Nyström 2017, Santos, Leão, & Sousa 2012, López-Otín et al. 2013, Farrugia & Balzan 2012, Berlett & Stadtman 1997), por lo que sería interesante saber si las ERO o algún TF que se vean afectados pudieran estar implicados en la modulación de este transcrito.

## CdCl<sub>2</sub>: Complejos de elongación

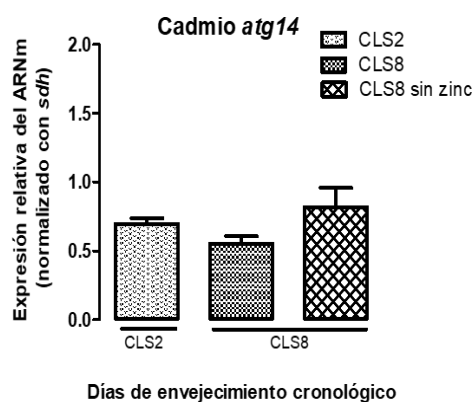


**Gráfica 31. Expresión relativa del ARNm de atg5, 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 grupo cadmio.** Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo cadmio en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

Respecto a *atg8*, se observa que sólo en las células sin zinc aumenta de manera significativa el transcrito, además, en la **figura 34** (en las columnas hay dos microfotografías de diferentes campos de cada día), se observa la coloración roja en forma de puntillito grande, lo que podría deberse a que los autolisosomas sean grandes, siendo imperativo conocer el tamaño de los autofagosomas a través del rastreo por fluorescencia de *atg8*.

En la proteína relacionada a la autofagia del complejo 3PtdIns, *atg14* (**Gráfica 32**), no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, por lo que es probable que sólo la expresión basal sea suficiente para realizar la nucleación e inicio de la formación del fagóforo.

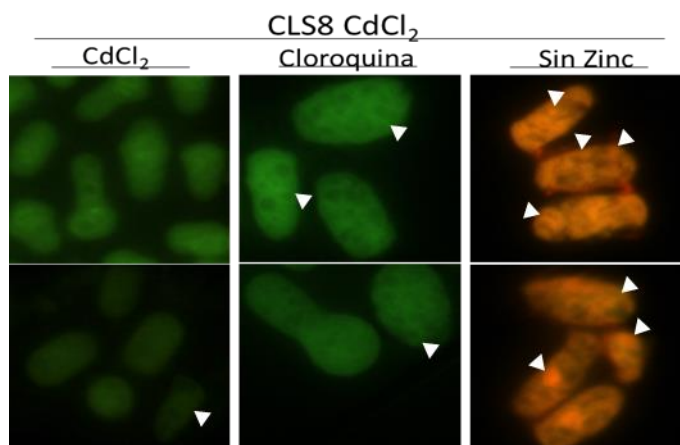
## CdCl<sub>2</sub>: Complejo de la cinasa 3PtdIns



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, ns.

**Gráfica 32.** Expresión relativa del ARNm de *atg14* del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8 grupo cadmio.

Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo cadmio en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS 2.

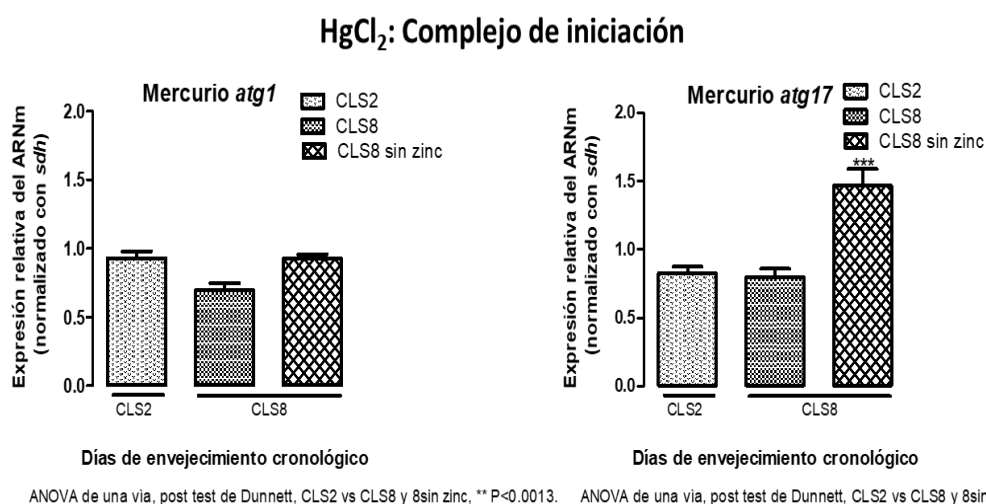


**Figura 34.** Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo cadmio. Se obtuvieron las células bajo las condiciones antes descritas, se lavaron con PBS, se les agregó naranja de acridina [5 µg/mL], se incubaron 15 min a 29 °C en agitación, se lavaron y montaron, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las flechas blancas muestran el puntillero rojo (control y sin zinc) perteneciente a los compartimentos ácidos, probablemente lisosomas y autolisosomas, en verde (cloroquina) el puntillero es verde, probablemente se relacione a un aumento en los autofagosomas inmaduros. Vista 100 X.

### 7.5.3. Mercurio

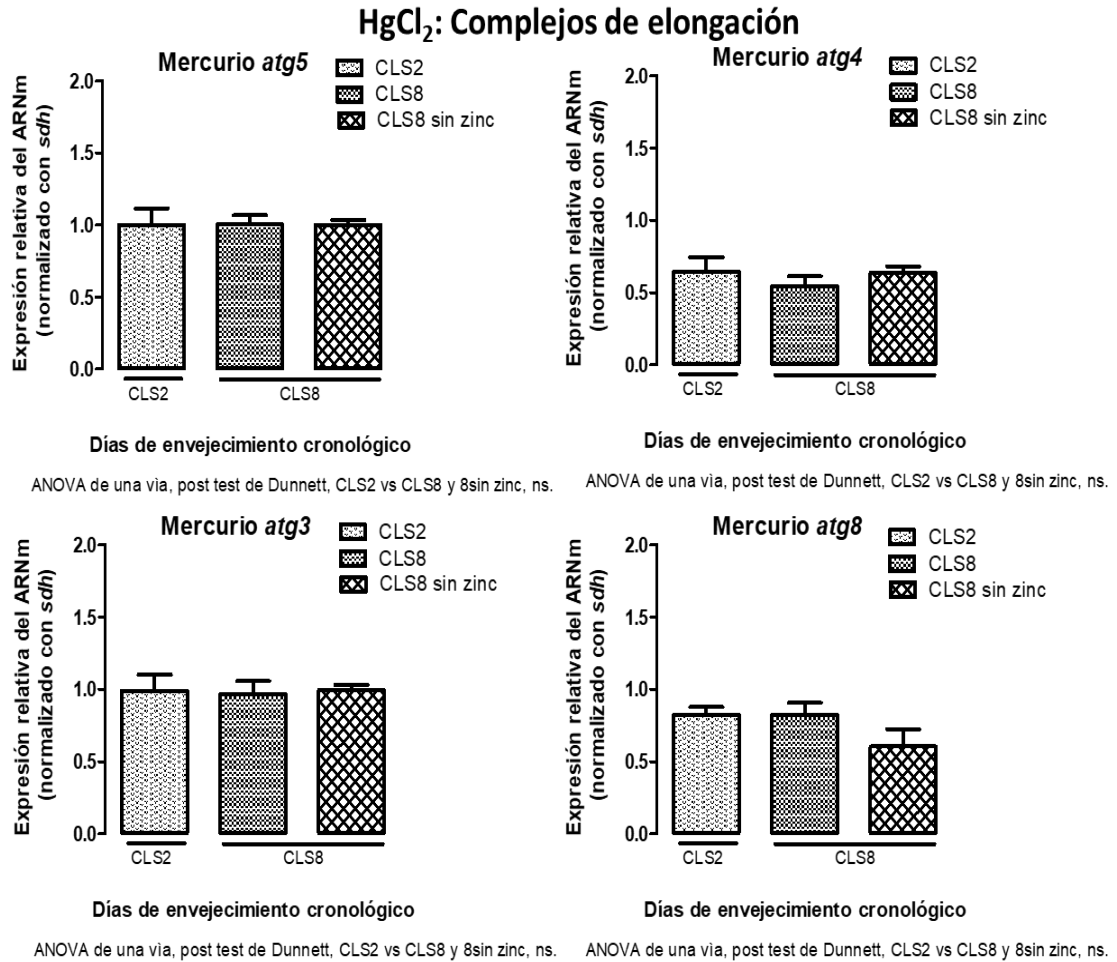
En la **gráfica 33** se aprecia que para el transcrito *atg1* no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio; pero sí existen en el transcrito *atg17* en el grupo CLS8 sin zinc. En otros modelos experimentales se ha descrito que el mercurio puede iniciar la autofagia (Chatterjee et al. 2014), sin embargo, bajo nuestras

condiciones experimentales habría que determinar por qué existen diferencias entre los niveles de *atg1* y *17*, siendo ambos parte del complejo de iniciación. En la **figura 35** (en las columnas hay dos microfotografías de diferentes campos de cada día) las células en el día 8CQ y 8 no muestran señal roja correspondiente a vacuolas, pero en ambos casos se observan estructuras redondas en todo el citoplasma, pudiendo ser fagóforos en formación o autofagosomas, que no tienen el pH ácido como las vacuolas, por lo que se sugiere la existencia de autofagosomas inmaduros, esto se sustenta en que se ha determinado que el HgCl<sub>2</sub> es capaz de unirse a las membranas lisosomales, disminuir la actividad de las enzimas lisosomales y que puede ingresar al lisosoma y promover la desintegración lisosomal (Lauwerys & Buchet 1972, Seitz & Aumuller 1981); en el día 8 del grupo sin zinc se observa una señal naranja-roja tenue, que se explicaría debido a la falta de zinc y por ende la activación de la autofagia.



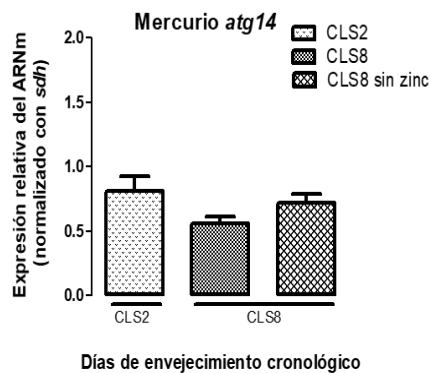
**Gráfica 33. Expresión relativa del ARNm de *atg1* y *atg7* del complejo de iniciación en los CLS2 y 8 grupo mercurio.** Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo mercurio en los CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

Los transcritos *atg 3* y *5*, correspondientes a los complejos de elongación (**Gráfica 34**) no presentan diferencia alguna, es decir, su comportamiento es basal, lo que sugeriría que su mensajero es estable y/o las proteínas son estables. En cuanto a *atg4* y *atg8*, tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas, por lo que se sugiere estudiar cuáles son sus posibles modificaciones postraduccionales y postranscripcionales en presencia de las ERO y del mercurio. Al igual que el grupo control y cadmio para el complejo 3PtdIns no existen diferencias entre grupos (**Gráfica 35**).

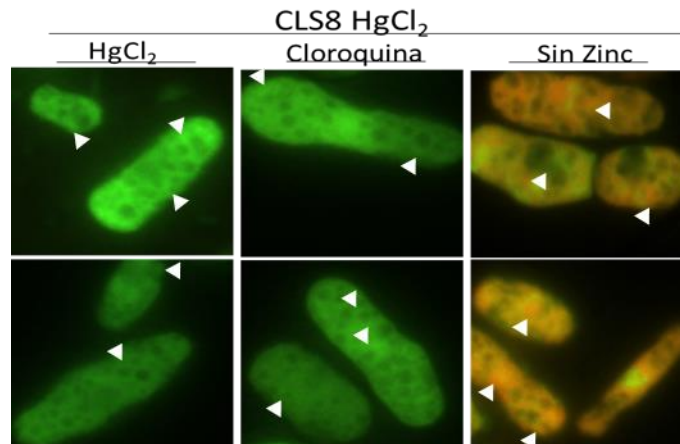


**Gráfica 34.** *Expresión relativa del ARNm de atg5, 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 grupo mercurio.* Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo mercurio en los CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

### HgCl<sub>2</sub>: Complejo de la cinasa 3PtdIns



**Gráfica 35.** *Expresión relativa del ARNm de atg14 del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8, grupo mercurio.* Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo mercurio en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

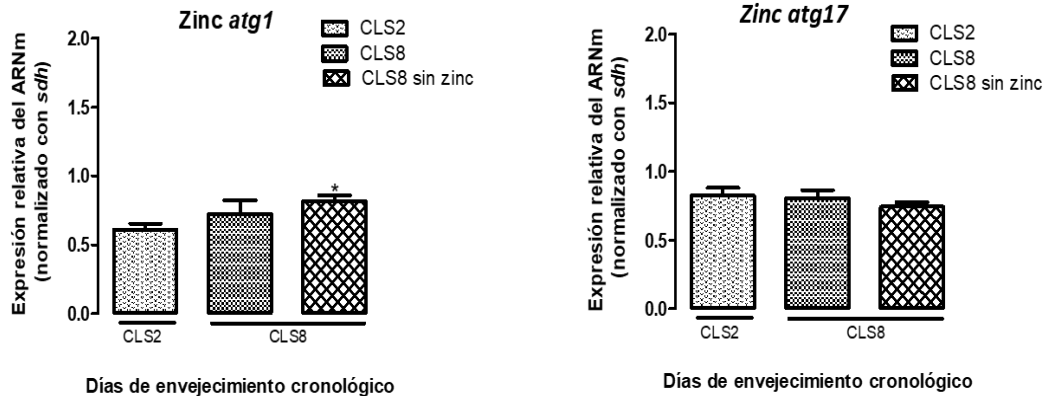


**Figura 35. Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo mercurio.** Se obtuvieron las células bajo las condiciones antes descritas, se lavaron con PBS, se les agregó naranja de acridina [5 µg/mL], se incubaron 15 min a 29 °C en agitación, se lavaron y montaron, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las flechas blancas muestran el puntillero rojo (control y sin zinc) perteneciente a los compartimentos ácidos, probablemente lisosomas y autolisosomas, en verde (cloroquina) el puntillero es verde, probablemente se relacione a un aumento en los autofagosomas inmaduros. Vista a 100X.

#### 7.5.4. Zinc

En el complejo de iniciación, los niveles del transcrito de *atg1* (**Gráfica 36**), presentaron un aumento de sus niveles sólo en las células en que se indujo la autofagia, lo que se correlaciona con la microscopía de fluorescencia a naranja de acridina (**Figura 36**, en las columnas hay dos microfotografías de diferentes campos de cada día), ya que en el CLS2 hay células jóvenes que han sido expuestas a una dosis tóxica de zinc, por lo que al no tener una deficiencia de zinc no necesitan activar como mecanismo de rescate el proceso de autofagia, no así en el día CLS8 sin zinc. En cambio, el mensajero de *atg17* no muestra ninguna diferencia en ninguna condición.

## ZnCl<sub>2</sub>: Complejo de iniciación

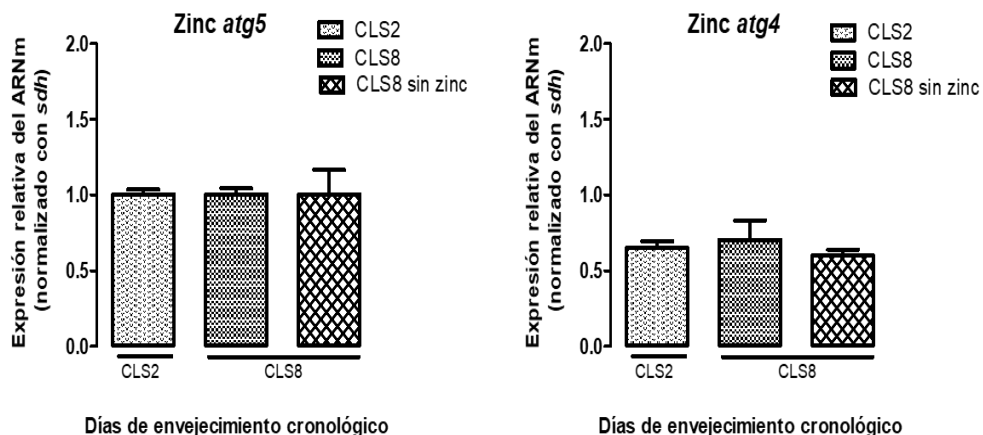


ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, P<0,0253. ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, ns.

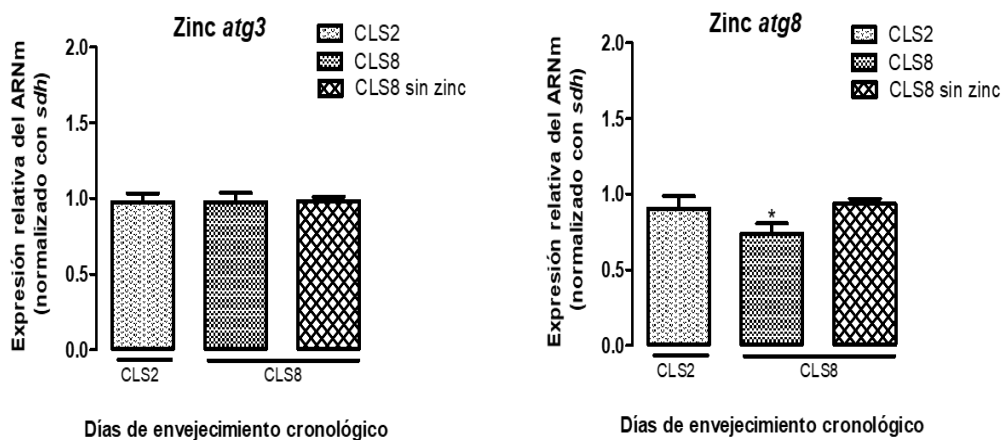
**Gráfica 36. Expresión relativa del ARNm de *atg1* y *atg17* del complejo de iniciación en los CLS2 y 8, grupo zinc.** Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo zinc en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

En cuanto a los transcritos pertenecientes a los complejos de elongación, *atg3*, *4* y *5* (**Gráfica 37**) permanecieron sin cambio alguno, pero el transcrito de *atg8* en el CLS8 mostró una disminución de sus niveles; interesantemente no hay señal roja en las células con zinc y con inhibición de autofagia más zinc, sin embargo sí hay señal en las células sin zinc (**Figura 36**), por lo que sería importante rastrear por microscopía la localización de los Atgs así como su estado de fosforilación y acetilación y conocer si son proteínas activas o no. En la **gráfica 38**, los patrones de expresión de *atg14* no cambiaron, por lo que se podría sugerir que es una proteína esencial y que se mantienen los niveles del transcrito a nivel basal.

## ZnCl<sub>2</sub>: Complejos de elongación



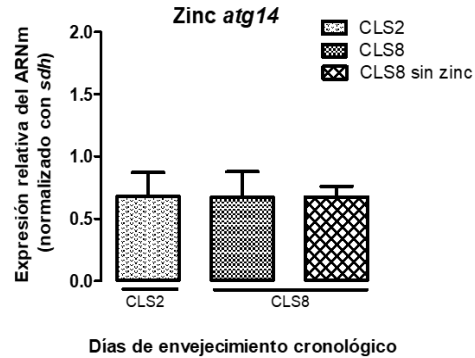
ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, ns. ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, ns.



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, ns. ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc \*P<0.0205.

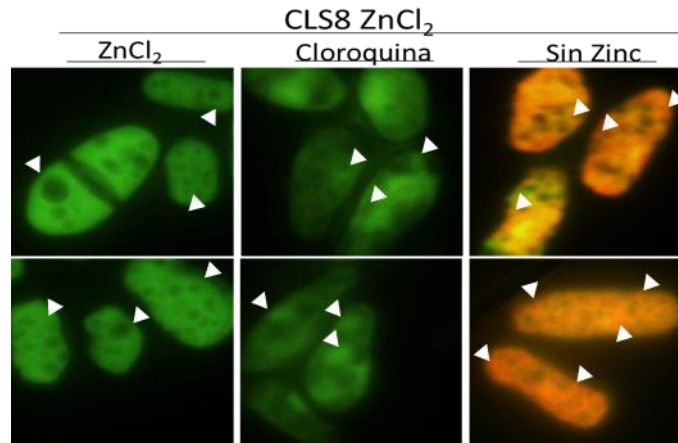
**Gráfica 37. Expresión relativa del ARNm de atg5, 4, 8 y 3 del complejo de elongación en los CLS2 y 8 grupo zinc.** Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo zinc en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.

### ZnCl<sub>2</sub>: Complejo de la cinasa 3PtdIns



ANOVA de una vía, post test de Dunnett, CLS2 vs CLS8 y 8sin zinc, ns.

**Gráfica 38.** Expresión relativa del ARNm de *atg14* del complejo de la 3PtdIn en los CLS2 y 8 grupo zinc. Se cuantificó el transcrito por qPCR del grupo zinc en el CLS2, CLS8 y CLS8 en medio EMM sin zinc, los datos se graficaron en *GraphPad Prism 5.1* y se realizó una ANOVA de una vía con un post test de Dunnett comparando contra el CLS2.



**Figura 36.** Estado de la autofagia en células envejecidas (CLS8) sin y con CQ, y con inducción de la autofagia, grupo zinc. Se obtuvieron las células bajo las condiciones antes descritas, se lavaron con PBS, se les agregó naranja de acridina [5 µg/mL], se incubaron 15 min a 29 °C en agitación, se lavaron y montaron, se observaron en un microscopio de fluorescencia. Las flechas blancas muestran el puntillero rojo (control y sin zinc) perteneciente a los compartimentos ácidos, probablemente lisosomas y autolisosomas, en verde (cloroquina) el puntillero es verde, probablemente se relacione a un aumento en los autofagosomas inmaduros. Vista a 100X.

Como resumen de los resultados anteriores en la **tabla 11**, se recopiló la información de la modificación de los patrones génicos de las **gráficas 27-38** de *S. pombe* bajo el paradigma de envejecimiento cronológico de los grupos control, cadmio, mercurio y zinc, en los días 2 y 8, así como en el CLS8 (de cada grupo) sin adición de zinc al medio. Cabe destacar que las células expuestas a cadmio modificaron sólo el comportamiento de 3 transcritos en la condición sin zinc, tanto que en el grupo control sin zinc sólo cambiaron 2 genes; mientras, que con el metal mercurio sólo se modificó el nivel de un transcrito.

**Tabla 11. Resumen de la modificación de los patrones génicos de la autofagia de *S. pombe* de los grupos control, cadmio, mercurio y zinc del CLS2, 8 y CLS8 sin zinc.** Se recopiló la información de las gráficas 27-38 y se registró el comportamiento de los grupos de estudio para los genes *atg1*, 3, 4, 5, 8, 14 y 17 en los días de envejecimiento 2, 8 y 8 sin zinc. El '-' indica nivel basal o mantenimiento del nivel, la flecha hacia arriba '↑' indica regulación positiva y la flecha hacia abajo '↓' indica regulación negativa del transcrito.

	Grupo	Control			Cadmio			Mercurio			Zinc		
	CLS	CLS2	CLS8	CLS8 sin zinc	CLS2	CLS8	CLS8 sin zinc	CLS2	CLS8	CLS8 sin zinc	CLS2	CLS8	CLS8 sin zinc
Complejo de iniciación	<i>atg1</i>	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	↑
	<i>atg17</i>	-	-	-	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-
Complejo de elongación	<i>atg5</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>atg4</i>	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>atg3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>atg8</i>	-	-	↑	-	-	↑	-	-	-	-	↓	-
Complejo de la cinasa 3PtdIns	<i>atg14</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSIONES**

## 8. Conclusiones

- La exposición a la EC<sub>10</sub> de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> induce un fenotipo temprano de envejecimiento en el tiempo de vida cronológico de *S. pombe*, acompañado de disminución de la capacidad energética; sin embargo, sólo el HgCl<sub>2</sub> disminuye la capacidad de ingreso al ciclo celular.
- En las condiciones del análisis de envejecimiento establecido, en los grupo control, CdCl<sub>2</sub> y HgCl<sub>2</sub> se reguló de forma positiva el nivel del mensajero de *atg4*. La exposición a ZnCl<sub>2</sub> al día CLS6 regulo positivamente los niveles de los transcritos *zym* y *pcaI*, mientras que en el CLS8 aumenta el de *zrt*.
- La exposición a CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub> después de la inhibición de la autofagia con CQ es tóxica para la célula, el fenotipo de envejecimiento aparece prematuramente y las células no son viables.
- La inducción de la autofagia a través de la inanición de zinc mantiene la morfología típica bacilar de las levaduras expuestas a CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>, promoviendo un estado energético favorable, no obstante, la deficiencia de zinc disminuye la capacidad de entrar al ciclo celular.
- La eliminación del zinc del medio EMM en células control, regula positivamente los niveles de los mensajeros *atg4* y *8* en el CLS8. En las células expuestas a cadmio aumentan los niveles de *atg1*, *17* y *8*. La exposición a mercurio regula positivamente el mensajero de *atg17*. Mientras que en el grupo zinc no hay modificación del programa génico.

## 9. Perspectivas

- Cuantificar las ERO inmediatamente después de la exposición de 2 h a los metales y en los días de envejecimiento cronológico 2, 4, 6, 8 y 11.
- Cuantificar por espectrometría atómica de masas los niveles de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>, así como de calcio y zinc a nivel citoplasmático, del retículo endoplásmico, la vacuola y en el medio de cultivo inmediatamente después de la exposición de 2 h y en los CLS2-11.
- Analizar el sistema de fitoquelatinas en respuesta a la exposición de CdCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub> y ZnCl<sub>2</sub>.
- Analizar cómo la exposición a cadmio, mercurio y zinc modifica el flujo autofágico con una microscopía de fluorescencia utilizando la construcción GFP-mCherry-Atg8 o la construcción Atg8-GFP.
- Cuantificar el tamaño y la cantidad de autofagosomas formados utilizando el fluoróforo FM4-64 y microscopía electrónica de transmisión, y rastrear a Atg8 por inmufluorescencia.
- Determinar si el cadmio es capaz de inhibir la actividad de enzimas lisosomales.
- Inducir la autofagia con rapamicina más cafeína y comparar la inducción con inanición de zinc y determinar si existen diferencias mecánicas de acuerdo a la señalización de inducción.
- Analizar el estado de agregación proteica con la exposición a los metales pesados y con la inhibición e inducción de la autofagia, utilizando un PAGE-Nativo y SDS, y un Western Blot para la desagregasa Hsp104.

## 10. Bibliografía

- Águila, E., Díaz, C., Fu, M., Kapteyn, A. & Pierson, A. 2011. "Envejecer en México: condiciones de vida y salud." *Población* 10 (14): 1-115.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2002. "Programmed Cell Death (Apoptosis)." En.: *Garland Science*.
- Baek, In-Joon, Hyun-Jun, K., Chang, M., Il-Dong, C. & Chang-Min, K. 2012. "Cadmium inhibits the protein degradation of Sml1 by inhibiting the phosphorylation of Sml1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424 (3): 385-390.
- Ben-Ozer, E., Rosenspire, A., McCabe, M., Worth, R., Kindzelskii, A., Warra, N. & Petty, H. 2000. "Mercuric chloride damages cellular DNA by a non-apoptotic mechanism." *Mutat Res* 470 (1): 19-27.
- Bento, C., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., Menzies, F. & Rubinsztein, D. 2016. "Mammalian Autophagy: How Does It Work?" *Annu Rev Biochem* 85: 685-713.
- Berlett, B. & Stadtman, E. 1997. "Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress." *J Biol Chem* 272 (33): 20313-20316.
- Beyersmann, D., & H. Haase. 2001. "Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells." *Biometals* 14 (34): 331-41.
- Beyersmann, D., & A. Hartwig. 2008. "Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms." *Arch Toxicol* 82 (8): 493-512.
- Boch, A., Trampczynska, A., Simm, C., Taudte, N., Kramer, U. & Clemens, S. 2008. "Loss of Zhf and the tightly regulated zinc-uptake system SpZrt1 in *Schizosaccharomyces pombe* reveals the delicacy of cellular zinc balance." *FEMS Yeast Res* 8 (6): 883-96.
- Bondy, S. 2007. *Aging and Age-Related Disorders*. Springer.
- Borrelly, B., Harrison, H., Robinson, A., Cox, S., Robinson, N. & Whitehall, S. 2002. "Surplus Zinc Is Handled by Zym1 Metallothionein and Zhf Endoplasmic Reticulum Transporter in *Schizosaccharomyces pombe*." *Journal of Biochem* 277 30394-30400.
- Campisi, J. 2013. "Aging, Cellular Senescence, and Cancer." *Annu Rev Physiol* 75:685-705.
- Cancalon, Paul. 1982. "Degeneration and regeneration of olfactory cells induced by ZnSO<sub>4</sub> and other chemicals - ScienceDirect." *Tissues and Cell* 14 (4): 717-733.
- Cantoni, O., Christie, N., Swann, A., Drath, D. & Costa, M. 1984. "Mechanism of HgCl<sub>2</sub> cytotoxicity in cultured mammalian cells." *Mol Pharmacol* 26 (2): 360-368.
- Cebollero, E., & Reggiori, F. 2009. "Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* 1793 (9): 1413-1421.
- Chatterjee, S., Ray, A., Mukherjee, A., Agarwal, S., Kundu, R. & Bhattacharya, S. 2012. "Low concentration of mercury induces autophagic cell death in rat hepatocytes." *Toxicol Ind Health* 30 (7): 611-620.
- Chen, B. & Runge, W. 2009. "A New *Schizosaccharomyces pombe* Chronological Lifespan Assay Reveals that Caloric Restriction Promotes Efficient Cell Cycle Exit and Extends Longevity." *Exp Gerontol* 44 (8): 493-502.
- Chen, D., Toone, W., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N. & Bähler, J. 2003. "Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress." *Mol Biol Cell* 14 (1): 214-29.
- Clark, S. L. 1957. "Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with electron microscope." *J Biophys Biochem Cytol* 3 (3): 349-362.
- Clegg, M., Hanna, L., Niles, B., Momma, T. & Keen, C. 2005. "Zinc deficiency-induced cell death." *IUBMB Life* 57 (10): 661-669.
- Clemens, S., Kim, E., Neumann, D. & Schroeder, J. 1999. "Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast." *EMBO J* 18 (12): 3325-33.

- Clemens, S. & Simm, C. 2003. "*Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: the phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism." *New Phytologist* 159 (2): 323-330.
- Costa, L., Araujo, B., Haddad, F., Amaral, F., Menezes, A., Rosa, C. & Neves, M. 2009. "Response of *Saccharomyces cerevisiae* to cadmium stress." *International Nuclear Atlantic Conference*, Río de Janeiro, Brazil.
- Dainty, S., Kennedy, C., Watt, S., Bähler, J. & Whitehall, S. 2008. "Response of *Schizosaccharomyces pombe* to Zinc Deficiency." 7 (3): 454-464.
- Das, U. 2011. *Molecular Basis of Health and Disease: Springer*.
- Davie, E., Forte, G. & Petersen, J. 2015. "Nitrogen Regulates AMPK to Control TORC1 Signaling." *Curr Biol* 25 (4): 445-454.
- Di Gioacchino, M., Petrarca, C., Perrone, A., Martino, S., Esposito, D., Lotti, D. & Mariani-Costantini, R. 2008. "Autophagy in hematopoietic stem/progenitor cells exposed to heavy metals: Biological implications and toxicological relevance." *Autophagy* 4 (4): 537-539.
- Elmore, S. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicol Pathol* 35 (4): 495-516.
- Erfurt, C., Roussa, E. & Thévenod, F. 2003. "Apoptosis by Cd<sup>2+</sup> or CdMT in proximal tubule cells: different uptake routes and permissive role of endo/lysosomal CdMT uptake." *Am J Physiol Cell Physiol* 285 (6): C1367-C1376.
- Esteban, B. 2015. Mercury and Low Molecular Mass Substances. En *Encyclopedia of metalloproteins: Springer*.
- Fabrizio, P. & Longo, V. 2008. "Chronological aging-induced apoptosis in yeast." *Biochem Biophys Acta* 1783 (7): 1280-1285.
- Farkas, E., Ujvarosi, K., Nagy, G., Posta, J. & Banfalvi, G. 2010. "Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells." *Toxicol In Vitro* 24 (1): 267-275.
- Farrugia, G. & Balzan, R. 2012. "Oxidative Stress and Programmed Cell Death in Yeast." *Front Oncol* 2 (24): 1-21.
- Fernández A. & López-Otín, C. 2015. "The functional and pathologic relevance of autophagy proteases." *J Clin Invest* 125 (1): 33-41.
- Florentin, A., & Arama, E. 2012. "Caspase levels and execution efficiencies determine the apoptotic potential of the cell." *The Journal of Cell Biology* 196 (4): 513-525.
- Friguet, B. 2006. "Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress." *FEBS Lett* 580 (12):2910-2916.
- Fukuda, H., Shimizu, T., Nakajima, M., Mori, H. & Shirasawa, T. 1999. "Synthesis, aggregation, and neurotoxicity of the Alzheimer's Abeta1-42 amyloid peptide and its isoaspartyl isomers." *Bioorg Med Chem Lett* 9 (7):
- Füllgrabe, J., Ghislat, G., Dong-Hyung, C. & Rubinsztein, D. 2016. "Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance." *Jour of Cell Scie* (129): 3059-3066.
- Geiger, T., & S. Clarke. 1987. "Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation." *J Biol Chem* 262 (2):785-94.
- Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. 2010. "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." *J Pathol* 221 (1):3-12.
- Goodsell, D. 2009. "PDB-101: Sodium-Potassium Pump." Se accesó el 25 Mayo de 2017 <https://pdb101.rcsb.org/motm/118>.
- Harrison, C., Katayama, S., Dhut, S., Chen, D., Jones, N., Bähler, J. & Toda, T. 2005. "SCFPof1-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast." *The EMBO Journal* 24 (3): 599-610.
- He, C. & Klionsky, D. 2009. "Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy." *Annu Rev Genet* 43 :67-93.

- Hentig, J. & Byrd-Jacobs, C. 2016. "Exposure to Zinc Sulfate Results in Differential Effects on Olfactory Sensory Neuron Subtypes in Adult Zebrafish." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (9): 1-15.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K., Maldener, C., et al. 2004. "Chronological aging leads to apoptosis in yeast." *J Cell Biol* 164(4): 501-507.
- Hill, S. & Nyström, N. 2015. "The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger." In *Bioessays* 37(5): 525-531.
- Hirata, E., Ohya, Y. & Suzuki, K. 2017. "Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*." *PLOS One* 12 (7):1-17.
- Holliday, R. 2007. *Aging: The Paradox Of Life*: Springer.
- Hu, G., McQuiston, T., Bernard, A., Park, Yoon-Dong, et. al. Williamson. 2015. "A conserved mechanism of TOR-dependent RCK-mediated mRNA degradation regulates autophagy." *Nature Cell Biology* 17: 930-942.
- Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T. & Evan, G. 1997. "Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells." *Mol Cell Biol* 17 (5): 2468-2474.
- Iqbal, T. & Byrd-Jacobs, C. 2010. "Rapid Degeneration and Regeneration of the Zebrafish Olfactory Epithelium after Triton X-100 Application." *Chemical Senses* 35 (5): 351-361.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. & Beeregowda, K. 2014. "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals." *Interdiscip Toxicol* 7 (2): 60-72.
- Jazwinski, S. & Kriete, A. 2012. "The Yeast Retrograde Response as a Model of Intracellular Signaling of Mitochondrial Dysfunction." *Frontiers in Physiology* 3 (139): 1-12.
- Jin, Y., Dunlap, P., McBride, S., Al-Refai, H., Bushel, P. & Freedman, J. 2008. "Global Transcriptome and Deletome Profiles of Yeast Exposed to Transition Metals." *PLOS Genetics* 4 (4): 1-14. Kaeberlein, M., Burtner, C. & Kennedy, B. 2017. "Recent Developments in Yeast Aging." *PLOS Genetics* 3 (5): 655-660.
- Kamada, Y., Ken-ichi, Y., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K. & Ohsumi, Y. 2010. "Tor Directly Controls the Atg1 Kinase Complex To Regulate Autophagy." *Molecular and cellular biology* 30 (4): 1049-1058.
- Kawamata, T., Horie, M. Matsunami, M. Sasaki, and Ohsumi, Y. 2017. "Zinc starvation induces autophagy in yeast." *J Biol Chem* 292 (20):8520-8530.
- Kerr, J. , Wyllie, A. & Currie, A. 1972. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* 26 (4): 239-257.
- Kirkwood, T. 2005. "Understanding the Odd Science of Aging." *Cell* 120 (4): 437-447.
- Klionsky, D., et al., M. Walker. 2016. "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3era edición)." 12 (1): 1-222.
- Klionsky, D. 2008. "Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve." *Autophagy* 4 (6): 740-743.
- Klionsky, D., Baehrecke, E., Brumell, J., Chu, C., Codogno, P., et al. 2011. "A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition)." *Autophagy* 7 (11): 1273-1294.
- Kroemer, G. 2015. "Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease." *The Journal of Clinical Investigation* 125 (1):1-4.
- Labbadia, J. & Morimoto, R. 2015. "The biology of proteostasis in aging and disease." *Annu Rev Biochem* 84: 435-464.
- Lamkanfi, M. & Dixit, V. 2010. "Manipulation of host cell death pathways during microbial infections." *Cell Host Microbe* 8 (1): 44-54.
- Lauwerys, R. & Buchet, Jean-Pierre. 1972. "Study on the Mechanism of Lysosome Labilization by Inorganic Mercury in vitro." *The FEBS Journal* 26 (4): 535-542.

- Lee, R., Brunette, S., Puente, L. & Megeney, L. 2010. "Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates." *PNAS* 107 (30):13348–13353.
- Lemire, J., Harrison, J. & Turner, R. 2013. "Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications." *Nature Reviews Microbiology* 11: 371-384.
- Lim, H., Kim, S., Park, E. & Lim, C. 2007. "Overexpression of a metacaspase gene stimulates cell growth and stress response in *Schizosaccharomyces pombe*." *Can J Microbiol* 53 (8): 1016-23.
- Lin, Su-Ju, & Austriaco, N. 2013. "Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*." *FEMS Yeast Research* 14 (1): 119-135.
- Liu, J., Qu, W. & Kadiiska, M. 2009. "Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis." *Toxicol Appl Pharmacol* 238 (3): 209-14.
- Liu, W, Dai, N., Wang, Y., Xu, C., Zhao, H., et al. 2015. "Role of autophagy in cadmium-induced apoptosis of primary rat osteoblasts." *Scient Repor* 10: 1-8.
- Liuzzi, J., Guo, L., Yoo, C. & Stewart, T. 2014. "Zinc and Autophagy." *Biometals* 27 (6): 1087-96.
- Longo, V. & Fabrizio, P. 2012. "Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*." *Subcell Biochem* 57: 101-21.
- López-Otín, C., Blasco, M., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. 2013. "The Hallmarks of Aging." *Cell* 153 (6): 1194-217.
- Macirella, R., Guardia, G., Pellegrino, D., Bernabò, I., Tronci, V., et al. 2016. "Effects of Two Sublethal Concentrations of Mercury Chloride on the Morphology and Metallothionein Activity in the Liver of Zebrafish (*Danio rerio*)." *Int J Mol Sci* 17 (3): 1-15.
- Mazzoni, C., Herker, E., Palermo, V., Jungwirth, H., Eisenberg, T. et al. 2005. "Yeast caspase 1 links messenger RNA stability to apoptosis in yeast." *EMBO Rep* 6 (11): 1076-1081.
- Messner, B., Türkcan, A., Ploner, C., Laufer, G. & Bernhard, D. 2016. "Cadmium overkill: autophagy, apoptosis and necrosis signalling in endothelial cells exposed to cadmium." *Cell Mol Life Sci* 73: 1699-1713.
- Minina, E., Coll, N., Tuominen, H. & Bozhkov, P. 2017. "Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation." *Cell Death & Differ* 24 (8): 1314-1325.
- Moradas-Ferreira, P. & Costa, P. 2013. "Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death." *Redox Report* 5 (2000): 277-285.
- Myers, S. 2015. "Zinc Transporters and Zinc Signaling: New Insights into Their Role in Type 2 Diabetes." *Int. Jour. of Endocrin.* 2015 (167503): 1-7.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. 2009. "Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast." *Nat Rev Molec Cell Biol* 10 (7): 458-467.
- Nikoletopoulou, V., Kyriakakis E. & Tavernakis, N. 2014. "Cellular and molecular longevity pathways: the old and the new". *Tren in Endo & Met.* 24 (5): 212-223.
- Ow, D. 1993. "Phytochelatin-mediated cadmium tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*." *In Vit Cell & Develop Biol- Plant* 29 (4): 213-219.
- Partida, V. 2008. "Proyecciones de la población económicamente activa de México y de las entidades federativas, 2005-2050." CONAPO  
<http://www.conapo.gob.mx/work/models/CONAPO/PEA/pea.pdf>.
- Pérez-Pérez, M., Zaffagnini, M., Marchand, C., Crespo, J. & Lemaire, S. 2014. "The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin." *Europe PMC* 10 (14): 1953-1964.
- Rattan, S. 2006. "Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals." *Free Radic Res* 40 (12): 1230-1238.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., et al. 2010. "Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology." *Physiol Rev* 90 (4): 1383-435.
- Reggiori, F. & Klionsky, D. 2013. "Autophagic Processes in Yeast: Mechanism, Machinery and Regulation." *Genetics*, 194(2): 341-361.
- Rosas-Murrieta, N.H., Rojas-Sánchez, G., Reyes-Carmona, S., Martínez-Contreras, R., Martínez-Montiel, N., et al. 2015. "Study of Cellular Processes in Higher Eukaryotes Using the Yeast

- Schizosaccharomyces pombe* as a Model." En *Micro in Agric and Hum Heal*. Manjur, M.: *InTech*. 107-132.
- Roux, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G. & Rokeach, L. 2010. "Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65 (1): 1-8.
- Roux, A., Leroux, A., Alaamery, A., Hoffman, C., Chartrand, P., et al. 2009. "Pro-Aging Effects of Glucose Signaling through a G Protein-Coupled Glucose Receptor in Fission Yeast." *PLOS Genet* 5 (3): 1-17.
- Roux, A., Quissac, A., Chartrand, P., Ferbeyre, G. & Rokeach, P. 2006. "Regulation of chronological aging in *Schizosaccharomyces pombe* by the protein kinases Pka1 and Sck2." *Aging Cell* 5 (4): 345-357.
- Rubinsztein, D., Marino, G. Kroemer, G. 2011. "Autophagy and aging." *Cell* 146 (5): 682-95.
- Chatterjee, S., Ray, A., Mukherjee, A., Agarwal, A., Kundu, R. & Bhattacharya, S. 2012. "Low concentration of mercury induces autophagic cell death in rat hepatocytes." *Toxicol Ind Health* 30 (7): 611-620.
- Santos, J., Leão, C. & Sousa, M. 2012. "Growth Culture Conditions and Nutrient Signaling Modulating Yeast Chronological Longevity." *Oxid Med Cell Longev* 2012, 1-20.
- Scudiero, R., Cigliano, L. & Verderame, M. 2017. "Age-related changes of metallothionein 1/2 and metallothionein 3 expression in rat brain." *C R Biol* 340 (1):13-17.
- Segundo, Patricia. 2015. "Evaluación de la expresión del ARNm de genes de autofagia en el modelo de envejecimiento cronológico de *Schizosaccharomyces pombe*." Licenciatura, Microbiología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Seitz, J. & Aumuller, G. 1981. "Cytochemistry and biochemistry of acid phosphatases. III. Inhibition experiments of lysosomal and secretory acid phosphatases of the rat ventral prostate." *Basic Appl Histochem* 25 (2): 95-104.
- Shimizu, T., Watanabe, A., Ogawara, M., Mori, H. & Shirasawa, T. 2000. "Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease." *Arch Biochem Biophys* 381 (2):225-34.
- Sikora, E., Bielak-Zmijewska & Mosieniak, G. 2014. "Cellular senescence in ageing, age-related disease and longevity." *Curr Vasc Pharmacol* 12 (5): 698-706.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A. & Gupta, R. 2011. "Heavy metals and living systems: An overview." *Indian J Pharmacol* 43 (3): 246-53.
- Son, Y., Wang, O., Hitron, J., Zhang, Z., Cheng, S. et al. 2011. "Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells." *Toxicol Appl Pharmacol* 255 (3): 287-96.
- Suetta, C., Frandsen, U., Jensen, L., Jensen, M., Jespersen, et al. 2012. "Aging Affects the Transcriptional Regulation of Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy." *PLoS One* 7 (12): 34-38
- Sun, Ling-Ling, Li, M., Suo, F., Liu, Xiao-Man, Shen, En-Zhi, et al. 2013. "Global Analysis of Fission Yeast Mating Genes Reveals New Autophagy Factors." *PLOS Genet* 9 (8): 715-721.
- Takahara, T. & Maeda, T. 2012. "TORC1 of fission yeast is rapamycin-sensitive." *Gen Cells* 17 (8): 698-708.
- Takeda, K., Yoshida, T., Kikuchi, S., Nagao, K., Kokubu, A. et al. Yanagida. 2010. "Synergistic roles of the proteasome and autophagy for mitochondrial maintenance and chronological lifespan in fission yeast." *Proc Natl Acad Sci* 107 (8): 3540-5.
- Tamás, M., Sharma, S., Ibstedt, S., Jacobson, T. & Christen, P. 2014. "Heavy Metals and Metalloids As a Cause for Protein Misfolding and Aggregation." *Biomolecules* 4 (1): 252-267.
- Thirumoorthy, N., Shyam, A., Sunder, K., Kumar, M., Senthil, G. et al. 2011. "A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology." *World J Surg Oncol* 9: 23-54.
- Tsai, Jia-Shiuan, Chao, Cheng-Han & Lin, Lih-Yuan. 2016. "Cadmium Activates Multiple Signaling Pathways That Coordinately Stimulate Akt Activity to Enhance c-Myc mRNA Stability." *PLOS One* 11 (1): 1-22.

- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. 1993. "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* 333 (1-2): 169-74.
- Ung, C., Lam, S., Hlaing, M., Winata, C., Korzh, S. et al. 2010. "Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation." *BMC Genomics* 11 (1): 201-212.
- Wang, X., Yi, M., Liu, H., Han, Y. & Yi, H. 2016. "Reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> are involved in cadmium-induced cell killing in yeast cells." *Can J Microbiol* 63 (2): 153-159.
- Wanga, Q., Zhua, J., Zhanga, K., Jianga, C., Wanga, Y. et al. 2013. "Induction of cytoprotective autophagy in PC-12 cells by cadmium." *Biochem Biophys Res Commun* 438 (1):186–192.
- Wu, L., Chen., Y., Gao, H., Jingjing, H. & Huang, L. 2016. "Cadmium-induced cell killing in *Sacharomyces cerevisiae* involves increases in intracellular NO levels" *FEMS Microbiology Letters*, 316: 1-5.
- Wysocki, R. & Tamás, M. 2010. "How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids." *FEMS Microb Rev* 34 (6): 925-951.
- Xinghua, W., Min Y., Hui, Y., Yansha, H. & Huilan, H. 2017. "Reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> are involved in cadmium-induced cell killing in yeast cells." *Can J Microbiol* 63 (2): 153-159.
- Yin, D. & Chen, K. 2005. "The essential mechanisms of aging: Irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions." *Exp Gerontol* 40 (6): 455-65.
- Yuntao, F., Chenjia, G., Panpan, Z., Wenjun, Z., Suhua, W. et al. 2016. "Role of autophagy in methylmercury-induced neurotoxicity in rat primary astrocytes." *Arch Toxicol* 90 (2): 333-45.
- Zalups, R. & Koropatnick, J. 2000. "Temporal changes in metallothionein gene transcription in rat kidney and liver: relationship to content of mercury and metallothionein protein." *J Pharmacol Exp Ther* 295 (1): 74-82.
- Zhao, Y. & Wang, D. 2012. "Formation and regulation of adaptive response in nematode *Caenorhabditis elegans*." *Oxid Med Cell Longev* 2012: 564-569.

## Apéndice A Soluciones generales

### EMM base

Reactivo	Concentración	
Ácido ftálico	3.3 g	
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.48 g	Aforado a 1 L, pH 5.0
NH <sub>4</sub> Cl	5.5 g	
Sales 50X	22 mL	Esterilizado a 15 lbs 20 minutos
Glucosa 20%	200 mL	

### Complejo vitamínico 1000X

Reactivo	Concentración
Ácido pantoténico	10 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Inositol	100 mg
Biotina	100 mg

### Complejo de Minerales 10 000X

Reactivo	Concentración
Ácido bórico	50 mg
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	45 mg
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	72 mg
Ácido molibdico	17 mg
KI	16 mg
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	10 mg
Ácido cítrico	4 mg

### Sales 50X

Reactivo	Concentración
MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	5.35 mg
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	75 mg
KCl	5 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mg