

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS
Y BIOTECNOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



EFEECTO DEL INHIBIDOR MG132 SOBRE EL SISTEMA
UBIQUITINA PROTEOSOMA, LA CITOTOXICIDAD,
AGREGACIÓN PROTEICA Y LOS NIVELES DE PROTEÍNA
LRP1 EN CÉLULAS HEPG2

Tesis presentada por la Bachiller:

Gonzales Urday, Ana Lucia

Martínez Málaga, Jimena Alexandra

Asesor:

Dr. José Villanueva Salas

Para optar el Título Profesional de
Ingeniera Biotecnóloga

AREQUIPA – PERÚ

2017

ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN	iv
OBJETIVOS	vi
HIPÓTESIS.....	vii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1. Degradación de proteínas mal plegadas en enfermedades neurodegenerativas	1
2. Sistema Ubiquitina-proteosoma en enfermedades neurodegenerativas.....	3
2.1. Inhibidor del sistema Ubiquitina-proteosoma.....	5
3. Autofagia en enfermedades neurodegenerativas	7
4. LRP1	9
4.1. Características estructurales	9
4.2. Rol de LRP1 en la degradación de beta amiloide	12
5. Viabilidad celular.....	14
6. <i>Western Blot</i>	15
7. Inmunocitoquímica	16
CAPÍTULO II	17
1. Equipos	17
2. Materiales Biológicos	17
3. Reactivos.....	18
4. Otros materiales	20
5. Cultivo de células HEPG2	20
6. Tratamiento de células HEPG2.....	21
6.1. Niveles de LRP1	21
6.2. Viabilidad celular	22
7. Extracción de proteínas.....	22
8. Evaluación de la viabilidad celular	23
9. Análisis de <i>Western Blot</i>	24
10. Inmunocitoquímica	25
CAPÍTULO III.....	26

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
1. Cultivo de células HepG2	26
2. Extracción de proteínas	27
3. Evaluación de la viabilidad celular	28
4. Análisis de Western Blot	29
4.1. Agregación de proteína	29
4.2. Niveles de LRP1	30
5. Inmunocitoquímica	32
CONCLUSIONES	34
RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS.	42
ANEXO I	43
CULTIVO CELULAR	43
ANEXO II	44
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	44
1. Resultados para la Muestra A	44
2. Resultados para la Muestra B	46
ANEXO III	48
VIABILIDAD CELULAR	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación de proteínas mal plegadas por varias vías proteolíticas ⁹	2
Figura 2. Sistema Ubiquitina-proteosoma ¹²	4
Figura 3. Estructura química del MG132 ⁵⁵	6
Figura 4. Autofagia o Macroautofagia ²⁰	8
Figura 5. Estructura de LRP1 ⁵¹	10
Figura 6. Estructura y dominio soluble de LRP1 ¹⁰	11
Figura 7. Papel de LRP1 en la liberación de beta amiloide ¹⁰	13
Figura 8. Células de hepatocarcinoma HepG2.....	27
Figura 9. Tratamientos con MG132 con relación al porcentaje de viabilidad de las células HepG2	28
Figura 10. Proteína LRP1 ubiquitinada ligada a K48	30
Figura 11. (A) Niveles de proteína LRP1 en células HepG2 tratadas con MG132. (B) Gráfico de los tratamientos con MG132 comparados con los niveles de proteína LRP1.....	31
Figura 12. Fluorescencia de LRP1 y LC3 en células HepG2 tratadas con MG132...	32
Figura 13. Curva de calibración	44
Figura 14. Curva de calibración	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos con seis cinco concentraciones de MG132	22
Tabla 2. Volúmenes recomendados según la concentración celular deseada	43
Tabla 3. Relación de la concentración de albúmina de suero bovino con su absorbancia	44
Tabla 4. Cuantificación de proteínas de los tratamientos	45
Tabla 5. Relación de la concentración de albúmina de suero bovino con su absorbancia	46
Tabla 6. Cuantificación de proteínas de los tratamientos	47
Tabla 7. Porcentaje de viabilidad celular por el ensayo de MTS.....	48



RESUMEN

El sistema Ubiquitina-proteosoma, es un proceso proteolítico implicado en la degradación de proteínas dañadas y mal plegadas. Las proteínas sometidas a este evento deben conjugarse con uno o más monómeros de ubiquitina, un proceso conocido como ubiquitinización. La inhibición del sistema Ubiquitina-proteosoma produce agregación de proteínas que causan citotoxicidad. La proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) es un receptor transmembrana, el cual está implicado en la captación de moléculas a través de la vía clatrina para transporte transcelular o degradación lisosomal. La inhibición del sistema mencionado por MG132 aumenta la vida media de LRP1 en células HepG2 según indican estudios previos. Por el contrario, la agregación de proteínas podría tener un papel en la reducción de los niveles de LRP1.

El propósito de esta investigación es demostrar que MG132, inhibidor del sistema Ubiquitina-proteosoma, induce citotoxicidad, agregación de proteínas y además reduce los niveles de la proteína LRP1 en células HepG2. Estas células se

trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones de MG132 (0,03 – 3,0 μ M) reduciendo la viabilidad celular de una manera dependiente a la concentración, determinada por la reacción de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, en el ensayo MTS. Los lisados de células enteras se extrajeron y separaron en SDS-PAGE. Se realizaron varias pruebas de *Western Blot*, como técnica para determinar los niveles de LRP1 y la unión de K48 a proteínas ubiquitinadas. Bajo concentraciones de 0,3 y 1,0 μ M de MG132, aumentaron las proteínas ubiquitinadas unidas a K48 y se redujeron los niveles de la proteína LRP1 de una manera dependiente a la concentración.

PALABRAS CLAVE: sistema Ubiquitina-proteosoma, proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, inhibidor del sistema Ubiquitina-proteosoma, agregación de proteínas.

ABSTRACT

Ubiquitin proteasome system (UPS) is a conserved proteolytic process involved in the degradation of damaged and misfolded proteins. Proteins undergoing this event must be conjugated to one or more monomers of ubiquitin, a process known as ubiquitination. UPS inhibition produces protein aggregation, which causes cytotoxicity. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) is a transmembrane receptor that is involved in the uptake of molecules via clathrin for either transcellular transport or lysosomal degradation. UPS inhibition by MG132 increases LRP1 half-life in HepG2 cells as reported in the literature. Conversely, protein aggregation might have a role in LRP1 reduction.

The purpose of this research was to demonstrate that MG132, a UPS inhibitor, induces cytotoxicity, protein aggregation and reduces LRP1 protein levels in HepG2 cells. These cells were treated for 24 hours with different concentrations of MG132 (0.03 – 3.0 μ M) reducing cell viability in a concentration-dependent manner determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS assay). Whole cell lysates were extracted and separated on SDS-PAGE. Immunoblotting was used to determine K48-linked ubiquitinated proteins and LRP1. MG132 at 0.3 and 1.0 μ M increased K48-linked ubiquitinated proteins and reduced LRP1 protein levels in a concentration-dependent manner.

KEY WORDS: Ubiquitin proteasome system, low-density lipoprotein receptor-related protein-1, Ubiquitin proteasome system inhibitor, protein aggregation.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer, es un trastorno neurodegenerativo y ha emergido como la forma más prevalente de la demencia tardía en humanos, se caracteriza por el deterioro progresivo de la memoria y los procesos cognitivos. Esta enfermedad es comúnmente producida por factores genéticos o ambientales; y otros factores de riesgo tales como la obesidad, la diabetes, el estrés oxidativo, entre otros, los cuales conllevan a una sobreestimulación cerebral. Este trastorno está caracterizado por la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares y la acumulación y deposición extracelular de la placa amiloide en el cerebro.¹

En cerebros jóvenes y bajo condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción y eliminación de proteínas dañadas y mal plegadas, que lo mantiene en niveles constantes, lo que se conoce como estado de equilibrio². Sin embargo existen péptidos como el beta amiloide, que se producen de manera rápida y espontánea, y además con el envejecimiento y las condiciones patológicas como el desorden metabólico y la excitotoxicidad, la formación y eliminación del péptido beta amiloide se altera, lo que lleva a su acumulación y una formación de placa. Una estructura anormal presente en el espacio extracelular neuronal que está formada por oligómeros insolubles de beta amiloide, provenientes de una proteína transmembrana, la proteína precursora de amiloide (APP, de las siglas en inglés).³

Las proteínas mal plegadas, generadas en varios compartimientos de las células, son eficientemente removidas por 3 diferentes procesos: Sistema Ubiquitina-proteosoma (UPS, de las siglas en inglés Ubiquitin proteasome system), autofagia mediada por chaperonas (CMA) y macroautofagia. El sistema Ubiquitina-proteosoma constituye la mayor vía de degradación por la cual se proteolisan proteínas mal plegadas durante su síntesis y otras proteínas. Éste es activado por una serie de enzimas, antes de empezar el proceso de ubiquitinización, en el cual moléculas de Ubiquitina (Ub) se adhieren a las proteínas antes de ser degradadas por el proteosoma.

El desequilibrio del nivel de beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer puede ser debido a su producción y eliminación en el cerebro. Existen diferentes rutas, como la de activación de enzimas degradantes, la vía celular y vascular mediada por chaperonas y otros mecanismos mediante los cuales se desactiva beta amiloide en el cerebro. Algunos receptores como la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1), cumplen un importante rol en la eliminación mediada por receptores de beta amiloide. Algunos estudios han demostrado que el bloqueo del gen que expresa LRP1 en neuronas del cerebro de ratones, aumentó los niveles de beta amiloide del cerebro y exacerbó la deposición de placa amiloide selectivamente en la corteza.⁴ Además, se ha sugerido que la P-glicoproteína participa en la depuración de beta amiloide como una bomba de eflujo en la barrera hematoencefálica (BHE).⁵

LRP1 es una proteína transmembrana que actúa como un receptor de señalización y transportador de carga. Cumple algunas funciones neuronales esenciales, incluyendo el proceso de escisión de la proteína precursora de amiloide y la modulación de la toxicidad del beta amiloide resultante. LRP1 y sus Ligandos, la Apolipoproteína E y $\alpha 2$ –macroglobulina, son involucrados en la deposición de beta amiloide mediante secuestro y eliminación de sus formas solubles.⁶ LRP1 se ha asociado a la enfermedad de Alzheimer debido a su capacidad para unirse a más de 40 ligandos incluyendo Apolipoproteína E y beta amiloide, tomando un rol indispensable en su degradación. Zlokovic y colegas han propuesto un mecanismo de tres pasos para la eliminación de beta amiloide por LRP1 a través de la barrera hematoencefálica: 1) El beta amiloide del cerebro se une al LRP1 de superficie de la zona abluminal de la BHE. 2) El beta amiloide circulante libre se une al LRP1 soluble en plasma (sLRP1). 3) De este modo lo transporta al hígado para ser degradado por el sistema Ubiquitina-proteosoma.⁸ Sin embargo, la inhibición de este sistema, muestra una reducción de los niveles de LRP1, lo cual sugiere otra forma de degradación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del inhibidor del sistema Ubiquitina-Proteosoma, MG132, sobre la citotoxicidad, agregación proteica y los niveles de proteína LRP1 en células HepG2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto del inhibidor MG132 en la viabilidad de la línea celular HepG2 utilizando el método MTS.
2. Evaluar la detección de agregación proteica de la proteína LRP1 ligada a K48 utilizando *Western Blot*.
3. Evaluar el efecto del inhibidor MG132 en la reducción de los niveles de proteína LRP1 mediante la normalización y análisis estadístico.
4. Determinar el efecto del inhibidor MG132 en los niveles de proteína LRP1 y comparar con los niveles de proteína LC3 mediante Inmunofluorescencia.

HIPÓTESIS

Si MG132 es un inhibidor del sistema Ubiquitina-proteosoma es posible que haya una reducción en la viabilidad de la línea celular de hepatocarcinoma y una reducción en los niveles de la proteína LRP1.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Degradación de proteínas mal plegadas en enfermedades neurodegenerativas

Existen tres rutas de degradación conocidas mediante las cuales las proteínas mal plegadas generadas en varios compartimentos celulares como el citoplasma, el núcleo y el retículo endoplasmático, son eficientemente removidas bajo condiciones normales. Sin embargo, con la edad, estas rutas comienzan a fallar, disminuyendo su capacidad para la degradación de las proteínas dañadas.

La primera línea de defensa en degradar las proteínas mal plegadas solubles es el sistema Ubiquitina-proteosoma, un sistema proteolítico selectivo, en el cual los sustratos son marcados con ubiquitina (Ub), desplegados en las cadenas primarias de polipéptidos, para luego ser escindidos en péptidos a medida que pasa a través de una estrecha cámara del proteosoma. Otras proteínas mal plegadas específicas, que muestran la señal de degradación KFERQ son degradadas mediante la autofagia mediada por chaperonas, un sistema secundario al de autofagia-lisosoma, en el cual los sustratos son reconocidos selectivamente por la chaperona cognado de choque térmico-70 (Hsc70) y llevados directamente al lisosoma, donde será degradado en aminoácidos por hidrolasas. Las

proteínas que escapan de la vigilancia del sistema Ubiquitina-proteosoma y la autofagia mediada por chaperonas o tienden a formar agregados, son degradadas mediante macroautofagia, un proceso catabólico en el cual los substratos son aislados en autofagosomas, que a su vez, se fusionan con lisosomas para la degradación en aminoácidos.⁹⁻¹⁰

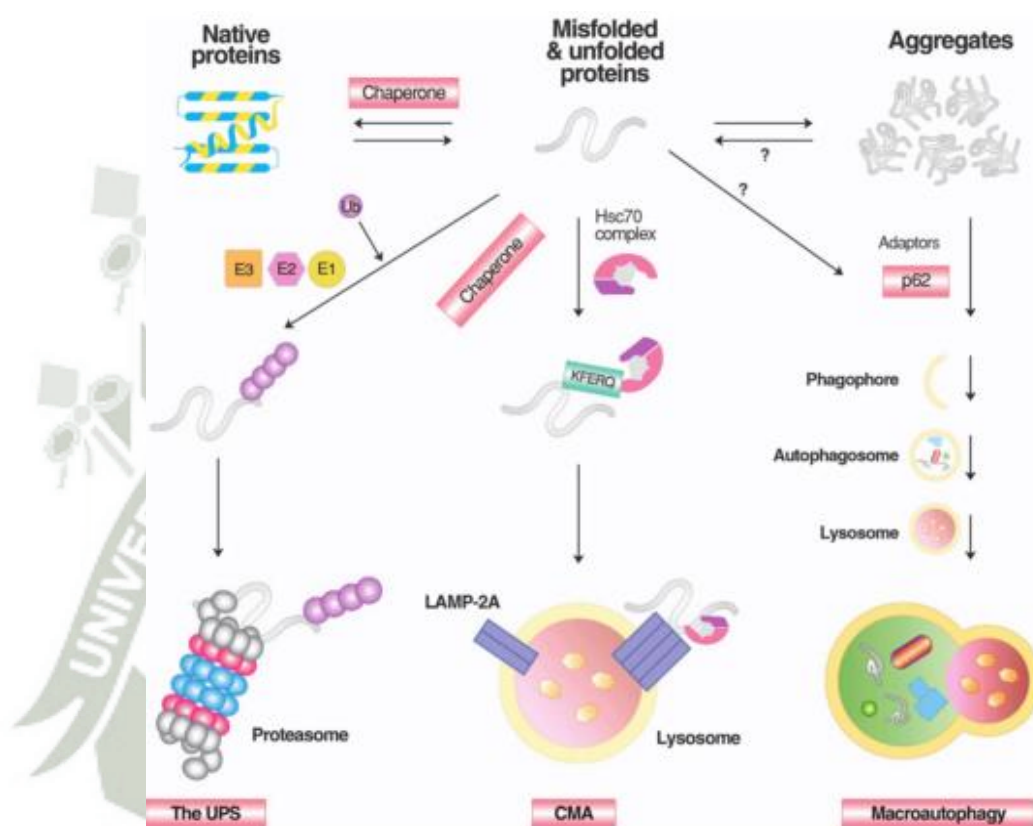


Figura 1. Degradación de proteínas mal plegadas por varias vías proteolíticas⁹

Las proteínas mal plegadas son inicialmente reconocidas por moléculas chaperonas, las cuales dirigen los substratos al sistema Ubiquitina-proteosoma, la autofagia mediada por chaperonas o macroautofagia dependiendo de la naturaleza del mal plegamiento, tamaño y solubilidad. En general las proteínas solapadas y monoméricas mal plegadas se degradan principalmente por los primeros dos sistemas mencionados.

2. Sistema Ubiquitina-proteosoma en enfermedades neurodegenerativas

El Sistema Ubiquitina-proteosoma, es el sistema proteolítico selectivo primario en células eucariotas, un mecanismo preciso que mantiene la concentración de muchas proteínas regulatorias involucradas en múltiples procesos biológicos. Este sistema es un componente clave de la red de proteostasis para terminar con las proteínas dañadas.¹¹

La degradación de proteínas en el sistema Ubiquitina-proteosoma es mediada por mecanismo secuencial enzimático que implica tres clases distintas de enzimas y entre ~500 – 1000 proteínas, el cual inicia por la conjugación de moléculas de ubiquitina a la proteína sustrato, proceso llamado ubiquitinización. Donde la ubiquitina es activada primero, formando un enlace tioéster entre su residuo Gly76 del C-terminal y un sitio activo de cisteína (Cys) de la enzima activadora de ubiquitina (E1), de una manera ATP-dependiente. La ubiquitina activada es luego transferida a la enzima de conjugación de ubiquitina (E2) mediante un enlace tioéster. La enzima ubiquitina ligasa (E3) es la que reconoce selectivamente y media la ubiquitinización de sustratos. Una vez que este proceso generó una cadena de cuatro o más ubiquitina en el residuo de lisina (Lys) del sustrato, se convierte en una señal de degradación, la cual se da en el proteosoma. Esta maquinaria cilíndrica está compuesta de una partícula proteolítica 20S, cubierta por ambos extremos por una partícula reguladora 19S.¹²⁻¹³

La partícula 19S se une y despliega el sustrato proteico poliubiquitinado y alimenta la cadena polipeptídica desplegada dentro de la cámara de la partícula 20S, la cual tiene un diámetro de 13 angstroms, a su vez la partícula 19S deubiquitina para reciclar ubiquitina (Figura 2). Cuando los sustratos pasan por la cámara, éstos son escindidos en pequeños péptidos por las subunidades beta-5, beta-2 y beta-1 con actividades similares a la quimotripsina, tripsina y caspasa, respectivamente.



4

a residuos específicos de sustratos de Lys (Lisina). Sustratos ubiquitinados son deubiquitinados, desplegados, llevados hacia la estrecha cámara del proteosoma, y se escinden progresivamente en péptidos pequeños. Dependiendo del tipo de ligasas E3, ubiquitina puede ser directamente transferida de E2 hacia el sustrato o mediante un proceso dos pasos que implica una unión transitoria de E3 con ubiquitina. Estudios extensos han demostrado que la actividad del proteosoma puede disminuir gradualmente con el envejecimiento, lo que luego provoca una capacidad reducida para degradar las proteínas mal plagadas, contribuyendo a la formación de agregados proteicos patológicos.¹⁴⁻¹⁵

Las proteínas agregadas inhiben las actividades de los componentes del sistema Ubiquitina-proteosoma, por ejemplo, agregados ricos de hojas beta de PrP bloquea la apertura de la partícula 20S del proteosoma¹⁶, o la proteína tau ubiquitinada y agregada en la enfermedad de Alzheimer puede bloquear la puerta de la partícula 19S, demorando la degradación proteosomal.

2.1. Inhibidor del sistema Ubiquitina-proteosoma

El sistema Ubiquitina-proteosoma está involucrado en tantos procesos biológicos que la implicancia de esta ruta en enfermedades humanas no es nada inesperado. Por consiguiente, la inhibición de componentes críticos del sistema Ubiquitina-proteosoma es probablemente que cause efectos dramáticos. Por ejemplo, la inhibición de la enzima de activación de ubiquitina (E1), es letal. Por otro lado, la desregulación de este sistema se ha visto involucrada en varias enfermedades humanas como fibrosis quística, síndrome de Liddle, enfermedades neurodegenerativas como la de expansión de trinucleótidos, Alzheimer y Parkinson. Esto sugiere que la habilidad de manipular los componentes del sistema Ubiquitina-proteosoma, puede en algunos casos ofrecer terapias benéficas. Además, la

inhibición no letal de componentes del sistema, como el proteosoma, permite la identificación de nuevos objetivos terapéuticos y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para los inhibidores del proteosoma.

En los últimos años, los inhibidores del proteosoma han asumido un rol importante en biología y medicina, dando su mayor aplicación en tratamientos para enfermedades como el cáncer y condiciones inflamatorias. Los inhibidores del proteosoma pertenecen a diferentes categorías de químicos y fármacos, por ejemplo MG132, también llamado carbobenzoxi-Leu-Leu-leucinal, Z-LLL-CHO (Figura 3), es un péptido aldehído y fue el primer inhibidor del proteosoma desarrollado (Vinitsky et al., 1992; Palombella et al., 1994; Rock et al., 1994). MG132 es un potente y selectivo inhibidor del proteosoma que es permeable a las células y muy útil para identificar roles fisiológicos del proteosoma.⁵⁷

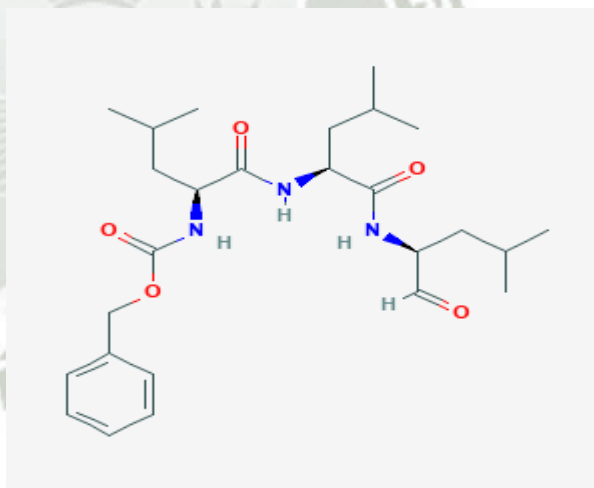


Figura 3. Estructura química del MG132⁵⁵

También llamado carbobenzoxi-Leu-Leu-leucinal, Z-LLL-CHO, inhibidor de la actividad del proteosoma.

3. Autofagia en enfermedades neurodegenerativas

La autofagia es un proceso catabólico intracelular, en el cual fracciones del citosol, organelas y macromoléculas son degradadas a través del lisosoma. Uno de los principales roles de la autofagia es actuar como un sistema de degradación cuando éste se encuentra en condiciones de estrés metabólico, como la privación de nutrientes, daño del DNA, hipoxia o estrés oxidativo, este sistema es el encargado de degradar diferentes sustratos para soportar el equilibrio energético.¹⁷⁻¹⁸ Aunque la autofagia tiene un importante rol como mecanismo de control de calidad de proteínas y organelas para mantener la homeostasis celular, también ha emergido como un mecanismo selectivo para degradar las proteínas mal plegadas y agregadas.¹⁹

La macroautofagia es un proceso autocatabólico en el que las porciones del citoplasma se envuelven en vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas. Luego se transporta la carga al lisosoma, donde su membrana externa se fusiona con la membrana del lisosoma y tanto el material secuestrado como la membrana interna del autofagosoma se degradan.

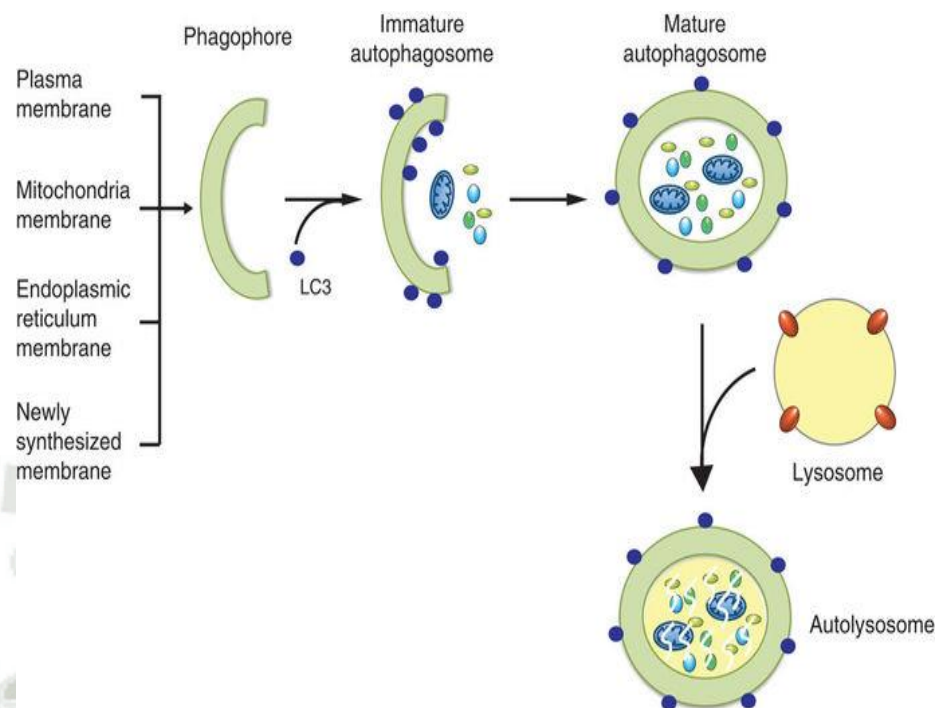


Figura 4. Autofagia o Macroautofagia²⁰

La macroautofagia comienza con la formación del fagóforo (complejo ULK1/2), una membrana doble que puede ser nueva u originarse del retículo endoplásmico, mitocondrias o membrana plasmática. Luego una serie de complejos promueven la elongación del fagóforo, hasta que los bordes de la membrana se funden para luego dar pie a la formación del autofagosoma. La maduración del fagóforo viene con la conjugación de LC3 (proteína citoplasmática) a la fosfatidiletanolamina, un proceso conocido como lipidación de LC3, y se recluta en las membranas autofagosómicas. El autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma, donde se produce la ruptura de la vesícula del autofagosoma. Las células sometidas a autofagia deben demostrar la colocalización de LC3, p62 y marcadores lisosómicos. La microscopía de inmunofluorescencia se ha utilizado para identificar visualmente LC3, p62 y/o lisosomas sobre una base por célula ²⁰.

4. LRP1

4.1. Características estructurales

La proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1), se identificó por primera vez en 1988 a partir de linfocitos de ratón y bibliotecas de cDNA de hígado humano mediante la búsqueda de secuencias homólogas del dominio de unión de Apolipoproteína E dentro de LDLR²¹. LRP1 es una proteína transmembrana tipo I y existe en dos formas fisiológicamente: una forma unida a la superficie celular (LRP1) y una forma soluble (sLRP1).

La de superficie está compuesta por una subunidad extracelular N-terminal de 515 kDa y una subunidad transmembrana C-terminal de 85 kDa, que están asociadas entre sí de una manera no covalente.²²

Las secuencias características en la cola citoplasmática de LRP1 son dos secuencias NPXY, una YXXL y dos secuencias dileucina que se unen a adaptadores endocíticos, traficando rápidamente ligandos como beta amiloide en endosomas²³⁻²⁴ transportándolos hacia el lumen vascular. El dominio extracelular tiene cuatro dominios de unión al ligando I-IV, donde los dominios II y IV son las principales regiones de unión para casi todos los ligandos en presencia de calcio (Figura 5).²⁵⁻²⁶

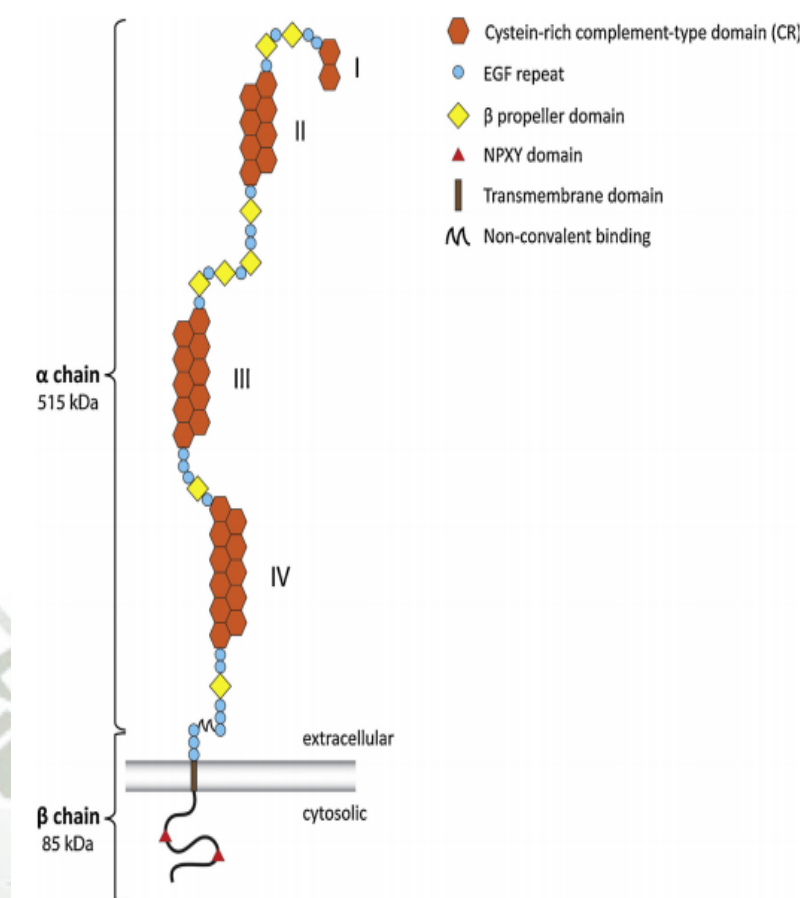


Figura 5. Estructura de LRP1⁵¹

Estructura de la proteína-1 relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad madura (LRP-1).

Varias proteasas incluyendo beta-secretasa 1 (BACE-1), A Desintegrina y metaloproteasa (ADAM) y el activador de plasminógeno tisular (t-PA) han demostrado estar involucrados en el desprendimiento de LRP1²⁷⁻³². El dominio extracelular de LRP1 liberado es la forma soluble sLRP1³³ (Figura 6).

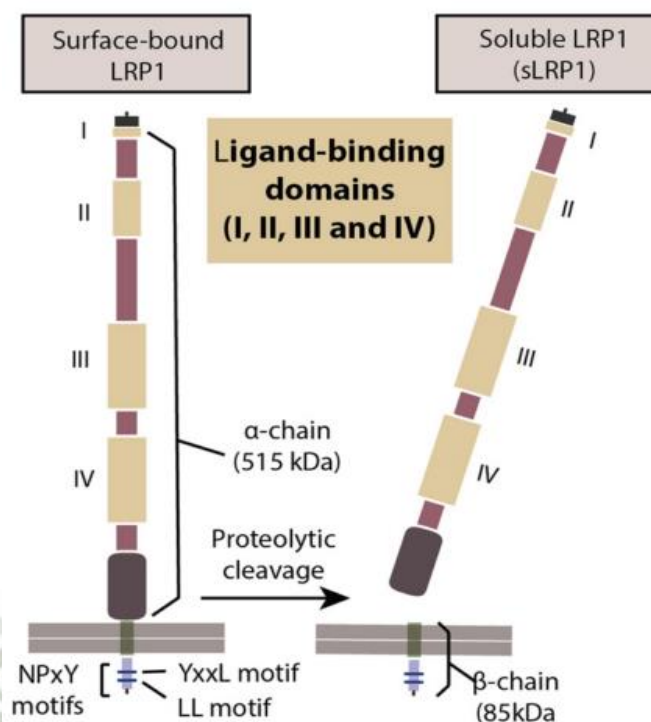


Figura 6. Estructura y dominio soluble de LRP1¹⁰

La estructura de LRP1. El dominio extracelular consiste en una α -cadena pesada (515 kDa), con cuatro dominios de unión a ligando, al ser separado de la cadena ligera por BACE1, se convierte en la forma soluble de LRP1 (sLRP1). La cadena ligera o cadena beta (85kDa) se extiende dentro del compartimiento intracelular.

4.1.1. Características funcionales

Más de 40 proteínas, incluyendo beta amiloide, Apolipoproteína E y α 2-macroglobulina activada, han sido reportadas como ligandos para LRP1³⁴. Además de controlar el metabolismo del ligando, LRP1 puede regular las vías de señalización o activaciones funcionales por acoplamiento con otros receptores o proteínas de la superficie celular, tales como el receptor de factor de crecimiento de plaquetas (PDGF)³⁵⁻³⁶, y el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA)³⁷⁻³⁸.

El dominio intracelular de LRP1 sirve como un regulador de la transcripción, que afecta a la expresión de varios genes, similar a la proteína precursora amiloide, mientras que las formas solubles secretadas de LRP1 (sLRP1) pueden afectar el metabolismo de beta amiloide³⁹.

LRP1 es expresada en diversos tejidos, incluyendo el hígado, cerebro y tejido vascular. El bloqueo génico condicional de LRP1 en hepatocitos, macrófagos, adipocitos o células de músculo liso vascular en modelos de ratones, han demostrado papeles críticos de LRP1 en el desarrollo y homeostasis de cada tejido mediante la regularización del metabolismo de los ligandos. Por lo tanto, las alteraciones funcionales de LRP1 probablemente contribuyan al desarrollo de enfermedades como aterosclerosis y el cáncer. O en el caso de neuronas en ratones, han demostrado varias características de las enfermedades neurodegenerativas relevantes para la enfermedad de Alzheimer⁴⁰.

4.2. Rol de LRP1 en la degradación de beta amiloide

Para prevenir la agregación y deposición de beta amiloide en el cerebro, existen mecanismos de eliminación fisiológica: vía transvascular a través de la barrera hematoencefálica (BHE)⁴¹⁻⁴² como el aclaramiento perivascular tradicional como flujo masivo de fluido intersticial (ISF)⁴³⁻⁴⁴ o la degradación enzimática⁴⁵⁻⁴⁷.

En la interface neurovascular, LRP1 es expresada por células endoteliales vasculares que forman la BHE, como pericitos y células de músculo liso vascular, neuronas y astrocitos⁴⁸. En la BHE, el transportador LRP1 se expresa principalmente en el lado abluminal y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la

homeostasis de beta amiloide en el sistema nervioso central (SNC). LRP1 ayuda a eliminar el beta amiloide mediante un mecanismo de tres pasos (Figura 7):

1. En la BHE, LRP1 de superficie se expresa en el lado endotelial de la membrana, hacia el cerebro (abluminal). LRP1 se une al beta amiloide cerebral y rápidamente se inicia la eliminación hacia la sangre (luminal)⁴⁹.
2. En el plasma, sLRP1 secuestra el beta amiloide libre en circulación.
3. En el hígado, donde fue identificada LRP1 por primera vez, es donde se elimina el beta amiloide del sistema. Adicionalmente, los complejos sLRP1- beta amiloide son removidos también por el riñón y el bazo⁵⁰.

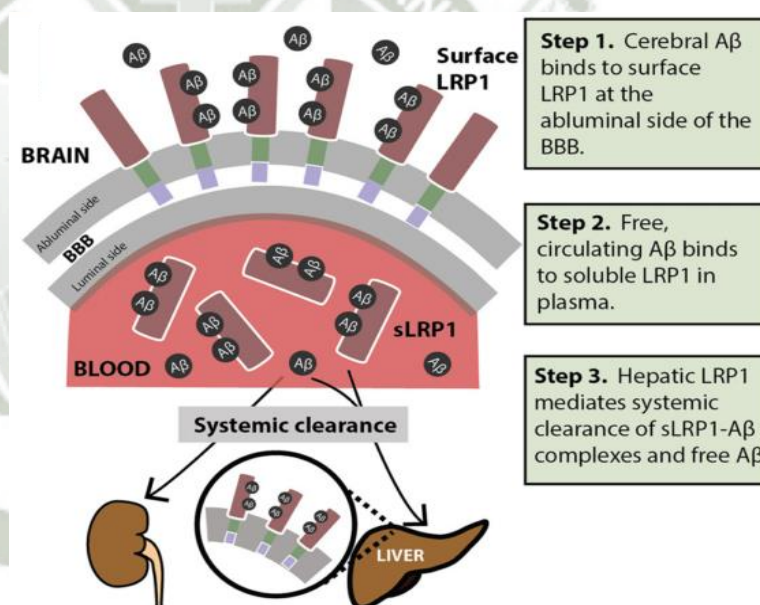


Figura 7. Papel de LRP1 en la liberación de beta amiloide¹⁰

Los tres pasos de la liberación de beta amiloide mediada por LRP1 del cerebro (paso 1), de la sangre (paso 2) y del cuerpo (paso 3).

5. Viabilidad celular

Para determinar los efectos sobre la proliferación celular o los efectos citotóxicos que conducen a la muerte celular, se pueden utilizar ensayos basados en células. Hay una variedad de métodos de ensayo que pueden usarse para estimar el número de células eucariotas viables. Algunos de los principales métodos utilizados en formatos de *microplates* donde los datos se registran utilizando un lector de placas, incluyen reducción de tetrazolio, reducción de resazurina, marcadores de proteasa y detección de ATP.

Se han usado una variedad de compuestos de tetrazolio para detectar células viables. Los compuestos más utilizados son: MTT, MTS, XTT y WST-1. Estos compuestos se dividen en dos categorías:

1. MTT, que está cargado positivamente y penetra fácilmente en células eucariotas viables.
2. MTS, XTT y WST-1, que están cargados negativamente y no penetran fácilmente en las células, por lo cual se utilizan como aceptores de electrones intermedio que pueden transferir electrones desde el citoplasma o membrana plasmática para facilitar la reducción del tetrazolio en el producto coloreado de formazano.⁵²

Los reactivos de tetrazolio han sido mejorados y eliminan una etapa de manipulación de líquidos durante el procedimiento porque no es necesaria una segunda adición de reactivo a los *microplates*, para solubilizar los precipitados de formazano en medio de cultivo celular. Este conjunto de reactivos de tetrazolio se utilizan en combinación con reactivos aceptores de electrones tales como fenazina metil sulfato (PMS) o fenazina etil sulfato (PES) que pueden penetrar células viables, se reducen en el citoplasma o en la superficie celular⁵³.

6. *Western Blot*

Es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas. La especificidad de esta técnica se logra mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína de interés. Con la técnica de Western Blot se puede estimar el tamaño de una proteína, confirmar la presencia de modificaciones post-traduccionales y ser utilizado para comparar cuantitativamente los niveles de proteína.

Considerando una visión general, esta técnica consta de cinco etapas:

1. Preparación de la muestra: comienza con la extracción de proteínas mediante disrupción mecánica o química, dependiendo de dónde se encuentre la proteína de interés.
2. Electroforesis en gel de acrilamida: las proteínas se separan de acuerdo a su tamaño y el dodecilsulfato de sodio (SDS) añadido al gel se une a las proteínas y confiere una carga negativa.
3. Transferencia electroforética a una membrana: las proteínas son transferidas a un soporte rígido o membrana (nitrocelulosa), donde quedarán inmovilizadas.
4. Hibridación del Anticuerpo: las proteínas inmovilizadas en la membrana se tratan para bloquear las zonas con ausencia de proteínas y de este modo evitar la unión no específica de los anticuerpos. Seguidamente se incuba con un anticuerpo primario dirigido contra el epítipo específico de la proteína de interés. Tras varios lavados, se adiciona un anticuerpo secundario marcado que se unirá de forma específica al anticuerpo primario, proporcionando una forma de detección.
5. Detección de las bandas: después de un lavado de la membrana para eliminar el anticuerpo que no se unió, se procede a detectar las bandas en la membrana, para ello se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa (HRP); la

adición de un sustrato de HRP provoca una reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz. Dicha luz puede ser detectada en una película de rayos x, de manera digital o mediante un sistema de captación de imágenes.⁵⁴

7. Inmunocitoquímica

La Inmunocitoquímica es una técnica que utiliza anticuerpos para visualizar la localización de proteínas de interés dentro de una célula. Esta técnica detecta antígenos específicos en poblaciones de células conservadas usando una estrategia de marcado de anticuerpos.

El procedimiento consta en fijar las células con paraformaldeído, para mantener la morfología celular, la arquitectura y la antigenicidad de los epítomos de interés; luego se permeabiliza la membrana con Tritón-X; posteriormente sigue la incubación con el anticuerpo primario, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario marcado (fluorocromos). Para finalizar se añade el colorante fluorescente de núcleo celular y se observa en el microscopio de fluorescencia.

La inmunofluorescencia se basa en las propiedades de los fluorocromos, que son moléculas que emiten luz visible cuando son iluminadas por una determinada longitud de onda. Su verdadero potencial se muestra al realizar una múltiple inmunodetección, es decir, detectar dos o más moléculas presentes en una misma célula de forma simultánea.⁵⁶

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Equipos

- Cabina de bioseguridad, *Cell Culture Hoods, Class II Type A2* (Kossodo).
- Contador de células, *Cellometer, Auto T4 Bright Field Cell Counter* (Nexcelom Bioscience).
- Lector de microplatos, *Microplate reader, Varioskan LUX Multimode* (Thermo Scientific).
- Microcentrifuga, *Microcentrifuge Sorvall Legend Micro 17 and 21* (Thermo Scientific).
- Fuente de poder para electroforesis, *Power supply for electrophoresis* (Bio-Rad).
- Equipo de transferencia de proteínas, *Semi-dried transfer device Trans-blot* (Bio-Rad).
- Lector de bandas por luminiscencia, *C-DiGit Blot scanner* (Licor technologies).
- Microscopio de fluorescencia invertido, *Inverted Fluorescence Z1* (Zeiss)
- Herramienta para la captura y salvataje de imágenes, *NIS Elements software* (Nikon).

2. Materiales Biológicos

- Células de Hepatocarcinoma, HepG2 (ATCC).
- Medio Mínimo Esencial, MEM (ATCC).

- Opti-Medio Mínimo Esencial, Opti-MEM (ATCC).
- Medio sin suero, FSM (ATCC).
- Suero fetal bovino, FBS (ATCC).
- Antibiótico, penicilina/estreptomicina (ATCC).
- Anticuerpos, Anti-LRP1 (ab92544, Abcam).
- Anticuerpos, Anti-ubiquitina K48, proteínas específicas unidas a la ubiquitina K48 (ab140601, Abcam).
- Inmunoglobulina G de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (ab97051, Abcam).
- Ratón policlonal anti-beta-actina conjugado con peroxidasa de rábano picante (ab49900, Abcam).
- Anticuerpos, Anti-LC3 I/II (SC-398822, Santa Cruz Biotechnology).
- Inmunoglobulina G de cabra anti-conejo (Alexa-fluor 488).
- Anti-ratón de cabra (Alexa fluor 647).

3. Reactivos

- Tripsina-EDTA (ATCC).
- Buffer fosfato salino, PBS (ATCC).
- Azul de tripán (Sigma-Aldrich).
- Inhibidor MG132 (Tocris #1748).
- Dimetilsulfóxido, DMSO (ATCC).
- Compuesto de Tetrazolio, *Cell Titer 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, *Tetrazolium compound* [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS ^(a)] and an electron coupling reagent (phenazine ethosulfate; PES), MTS (Promega).
- Reactivo de extracción de proteínas de mamíferos, M-PER® (Thermo Scientific).
- Cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa, Halt™ (Thermo Scientific).
- Ácido etilendiaminotetraacético, EDTA (Thermo Fisher Scientific).

- Kit para la detección colorimétrica y cuantificación del total de proteínas basado en el ácido bicinconínico, PierceTM BCA (Thermo Scientific).
 - BCA Reagent A (Thermo Scientific).
 - BCA Reagent B (Thermo Scientific).
 - Estándares de albúmina de suero bovino, BSA (Thermo Scientific).
- Kit para *Western Blot* (BioRad)
 - Agente reductor, RA (BioRad).
 - Buffer de corrida, TrisGlicina-SDS buffer 1X, 4°C (BioRad).
 - Buffer de transferencia, *One Step transfer buffer* (BioRad).
 - Buffer de bloqueo, Leche deshidratada sin grasa 5 % p/v en solución salina tris tamponada con Tween 20, TBS-T (BioRad).
 - Buffer de desprendimiento de proteínas (BioRad).
 - Buffer fosfato salino 1X, PBS (BioRad).
 - Solución salina tris tamponada con Tween 20, TBS-T (BioRad).
 - Rojo de Ponceau (Sigma-Aldrich).
 - Geles 7.5 % de proteínas, *Mini-Protean TGX* prefabricados.
 - Filtros (BioRad).
 - Leche deshidratada sin grasa (Thermo Scientific).
 - Membranas de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0,22 o 0,45 µm (BioRad).
 - Marcadores de peso molecular, *Precision Plus Protein* de doble color, 500 µL # 1610374 (BioRad).
 - Sustrato quimioluminiscente, *SuperSignal West Pico* (Thermo Fisher Scientific).
- Kit para Inmunofluorescencia (Boston Bioproducts).
 - Colorante fluorescente de núcleo celular, *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI (Thermo Fisher Scientific)
 - Paraformaldehído 4 % en buffer fosfato salino (Boston Bioproducts).

- Triton ® X-100 0,1 % en buffer fosfato salino. (Boston Bioproducts).
- Buffer fosfato salino en Tween 20 0,1 %, PBS-T (Boston Bioproducts).
- Buffer de bloqueo en buffer fosfato salino con Tween 20, PBS-T (Boston Bioproducts):
 - Suero de cabra 10 % (Abcam).
 - Albúmina de suero bovino 4 %, BSA (Boston Bioproducts).
 - Glicina 0,3 M (Boston Bioproducts).

4. Otros materiales

- Flasks para cultivo celular (Thermo Scientific).
- *Well plates* de 6 pozos (Thermo Scientific).
- *Microplates* de 96 pozos (Thermo Scientific).
- Cámara de electroforesis, *Electrophoresis Chamber* (BioRad).
- *Lab-Tek™ II Chamber Slide* de 8 pozos, *Nunc™* (Thermo Scientific).

5. Cultivo de células HEPG2

Las células HepG2 son un carcinoma hepatocelular aislado de un varón Caucásico de 15 años. Esta línea celular se cultivó en Medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino y con 1 % de solución penicilina/estreptomicina a 37°C en un entorno humidificado con 5 % CO₂. Se realizó el pasaje de células HepG2 en cultivo monocapa de un flask de cultivo celular a otro, mediante la liberación de células de monocapa en suspensión por tripsinización. Primero, se retiró el medio de cultivo del flask por aspiración, luego se lavó las células con buffer fosfato salino y se retiró. Posteriormente, se añadió tripsina y se incubó el flask por 5 minutos a 37°C en un ambiente humidificado con 5 % de CO₂ y suavemente agitado. Al despegarse las células del flask se añadió medio sin suero en una relación 3:1 según el volumen utilizado de tripsina, esta

suspensión fue colectada y transferida a un tubo falcon, se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm y solo se conservó el pellet. Se añadió 1 mL de medio completo y se resuspendió suavemente con una micropipeta, se completó con 9 mL de medio completo y nuevamente se resuspendió. Para contar y evaluar el porcentaje de viabilidad celular, se retiró 0,5 mL de la suspensión celular y se mezcló en un eppendorf con 0,5 mL de azul de tripán (1:1); de esta mezcla se tomó 0,2 mL y se colocó en la cámara del Contador de células. Se preparó una suspensión con la cantidad de células deseadas, siendo 500 000 y 10 000 células por pozo en *well plates* de 6 pozos y *microplates* de 96 pozos, respectivamente; se añadió medio completo y el resto se colocó en un nuevo flask de cultivo celular para investigaciones futuras. Finalmente, las células ya sembradas fueron incubadas entre 24 y 48 horas a 37°C en un ambiente humidificado con 5 % de CO₂. Es importante destacar, que según el volumen de los flasks y según la concentración celular que se desea obtener, se recomienda determinados volúmenes de tripsina, medio libre de suero y de medio completo (Tabla 2, ANEXO I).

6. Tratamiento de células HEPG2

Se preparó una solución *stock* de MG132 de 50 nM disuelta 100 % en DMSO, la cual fue conservada a -20°C. Posteriormente, una vez que las células llegaron al 80 % de confluencia, se les retiró el medio y se colocó el MG132 en diferentes concentraciones, disuelto en medio Opti-MEM, como tratamiento y a su vez manteniendo constante una concentración de 0,5 % (v/v) de DMSO, en todos los tratamientos agregados a las células.

6.1. Niveles de LRP1

Se realizaron cinco tratamientos con concentraciones de 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 y 3,0 μ M de MG132 y un control, en *well-plates* de 6 pozos y con una densidad celular de 500 000 células por pozo. Se

realizaron 4 repeticiones de cada tratamiento, agrupadas en 2 muestras A y B (Tabla 1). Se dejó incubando los *well-plates* a 37°C en una incubadora con 5 % de CO₂ durante 48 horas.

Tabla 1. Tratamientos con seis cinco concentraciones de MG132

Tratamientos MG132 (μM)	Muestras	
	A	B
Control	0,0	0,0
T 1	0,03	0,03
T 2	0,1	0,1
T 3	0,3	0,3
T 4	1	1
T 5	3	3

6.2. Viabilidad celular

Se realizaron cinco tratamientos con concentraciones de 0,03; 0,1; 0,3; 1,0 y 3,0 μM de MG132 y un control, en *microplates* de 96 pozos y una densidad celular de 10 000 células por pozo. Se realizaron 5 repeticiones de cada tratamiento, y se dejó incubando los *microplates* a 37°C en una incubadora con 5 % de CO₂ durante 24 horas.

7. Extracción de proteínas

Pasado el tiempo de incubación de 48 horas en los *well plates* de 6 pozos, se realizó la extracción de proteínas a bajas temperaturas en un recipiente con hielo, primero se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces en buffer fosfato salino. Luego, se agregó a las células 300 μL/pozo el reactivo de extracción de proteínas de mamíferos, conteniendo el cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa, con el fin de preparar un lisado de células enteras. Después, el lisado celular se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recolectó el

sobrenadante y los niveles de proteína se determinaron por el ensayo colorimétrico del ácido bicinconínico a 562 nm.

Primero, se diluyó 30 μ L del lisado celular de cada muestra en 60 μ L de buffer fosfato salino, luego se preparó estándares de albúmina de suero bovino diluidos en buffer fosfato salino en concentraciones desde 125; 250; 500; 1 000; hasta 2 000 μ g/mL. En un *microplate* de 96 pozos se colocó 3 repeticiones de 20 μ L de cada estándar y de cada muestra, se les agregó 200 μ L del *Working Reagent* (WR) *Pierce*TM *BCA*, se incubó a 37°C por 30 minutos, pasado el tiempo de incubación se leyó en el lector de microplatos a 562 nm. Luego, se construyó una curva de calibración con las concentraciones conocidas de la albúmina de suero bovino, para cada tratamiento, con la finalidad de determinar la concentración de proteínas en cada tratamiento. Finalmente se diluyeron y llevaron a una sola concentración, manteniendo constante un volumen de 50 μ L de agente reductor y completando con buffer fosfato salino, para el análisis de *Western Blot*. Estas muestras se almacenaron a -80°C para experimentos posteriores.

8. Evaluación de la viabilidad celular

Se determinó la viabilidad celular por el método colorimétrico utilizando el reactivo compuesto de Tetrazolio conocido como el ensayo MTS, el cual se llevó a temperatura ambiente aproximadamente por 90 minutos o en baño maría a 37°C por 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación, se pipeteo 10 μ L y se diluyó en 190 μ L de medio sin suero teniendo una solución de 200 μ L como volumen final; se mezcló suavemente y posteriormente se le retiró el medio de cultivo a las células tratadas con MG132; y se colocó 200 μ L de la solución preparada. Se incubó a 37°C por 3 horas en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Concluido el tiempo de incubación se leyó la absorbancia a 490 nm usando el equipo *microplate reader*.

Los datos se reportaron como media $\pm$ desviación estándar, se realizó comparaciones entre múltiples grupos con un análisis de varianza, ANOVA one-way, seguido por la prueba de Dunnett, donde se comparó los grupos experimentales con el grupo control (células tratadas con el vehículo). Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un valor $p < 0,05$. Se realizó cuatro experimentos independientes de al menos cinco repeticiones.

9. Análisis de *Western Blot*

Los lisados celulares provenientes del cultivo en *well plates* de 6 pozos se disolvieron y desnaturalizaron bajo condiciones reductoras en el agente reductor (Tris-ácido clorhídrico (250 mM, pH 6,8), Dodecilsulfato sódico 8 %, glicerol (40 %), β -mercaptoetanol (8 %), bromofenol (0,02 %)) por 5 minutos a 95°C. Misma cantidad de proteínas totales fue electroforéticamente separada a 125 V por 50 minutos en geles de 7,5 %. Luego, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,22 o 0,45 μ m mediante el uso del equipo de transferencia de proteínas. Estas membranas fueron bloqueadas con 5 % leche deshidratada sin grasa en buffer de bloqueo por una hora a temperatura ambiente. Después del proceso de bloqueo, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos anti-LRP1 (1:10 000) y anti-ubiquitina K48 (1:5 000). Estas membranas fueron lavadas tres veces en buffer de bloqueo y expuestas al anticuerpo secundario a Inmuglobulina G de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:2 000) por una hora. El sustrato quimioluminiscente se añadió a las membranas y se incubó por 5 minutos. Las bandas fueron visualizadas en el lector de luminiscencia. Beta-actina se usó como control, las membranas se incubaron con Ratón policlonal anti-beta-actina conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:10 000) por una hora y las bandas fueron visualizadas por el método ya mencionado.

Se realizó la normalización de los resultados usando el software Image Studio Lite Version 5.2 y los datos se reportaron como media $\pm$ desviación estándar. Se realizó comparaciones entre múltiples grupos con un análisis de varianza, ANOVA one-way, seguido por la prueba de Dunnett, donde se comparó los grupos experimentales con el grupo control (células tratadas con el vehículo). Se consideraron estadísticamente significativos los resultados con un valor $p < 0,05$. Cada experimento se realizó en tres repeticiones independientes.

10. Inmunocitoquímica

Se cultivó células HepG2 en *Lab-Tek™ II Chamber Slide* de 2 pozos. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por Opti-MEM conteniendo MG132 por otras 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino frío, fijadas con 4 % paraformaldehído en buffer fosfato salino por 15 minutos a 37°C y permeabilizadas con 0,1 % Triton-X por 10 minutos. Posteriormente se retiró los *chambers* y se conservó los *slides*, los cuales fueron bloqueados con 4 % albúmina de suero bovino, 10 % suero de cabra, 0,3 M glicina en buffer fosfato salino con Tween 20 (0,1 %) por una hora.

Se añadió los anticuerpos anti-LRP1 (1:100) y anti-LC3 I/II (1:50) por dos horas a temperatura ambiente. Se lavó las láminas 3 veces por 5 minutos cada una con buffer fosfato salino en Tween 20 0.1 %. Luego, las láminas se incubaron con los anticuerpos: Inmunoglobulina G de cabra anti-conejo Alexa-fluor 488 (1:400) y Anti-ratón de cabra Alexa-Fluor 594 (1:400) por 2 horas a temperatura ambiente. Tras la inmunotinción se añadió el colorante fluorescente de núcleo celular y las láminas fueron visualizadas con el software Nikon Eclipse 600 y las imágenes fueron digitalizadas con el software NIS Elements.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cultivo de células HepG2

Al realizar el cultivo celular se puede observar que el porcentaje de confluencia de las células es de 80 %, lo que sugiere que las células se han adherido al flask y han crecido de manera homogénea y en monocapa, además sin formar agrupamientos, bajo las condiciones sugeridas por Pajaniradje et al, en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino.

Se sembraron en *well plates* de 6 pozos y en *microplates* de 96 pozos una cantidad de 500 000 y 10 000 células/pozo respectivamente. Después del tiempo de incubación adecuado, las células alcanzaron el 80 % de confluencia, determinando que dichas concentraciones fueron ideales para el crecimiento y multiplicación del cultivo celular logrando alcanzar la confluencia necesaria en 48 y 24 horas respectivamente (Figura 8). Este procedimiento fue monitoreado, observando las células diariamente en el microscopio invertido.

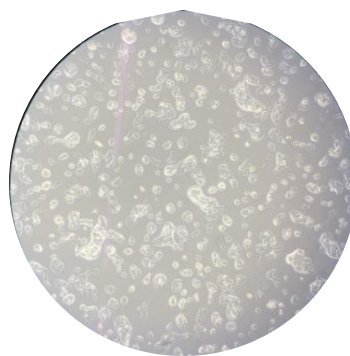


Figura 8. Células de hepatocarcinoma HepG2

Imagen de células HepG2, con un objetivo de 40X. Las células alcanzaron un 80 % de confluencia, punto que evita la formación de agrupamiento de las mismas.

2. Extracción de proteínas

El *WR PierceTM BCA*, tiene un color verde, el cual pasado el tiempo de incubación con las muestras que contienen proteínas, se fue tornando de color violeta, debido a la reducción del cobre por BCA. Mientras más intenso el color violeta, mayor es la cantidad de proteínas contenida en la muestra.

Los resultados de las absorbancias, leídas a 562 nm, y las concentraciones conocidas de la albúmina de suero bovino se utilizaron para luego extrapolar las concentraciones de proteína de los tratamientos con la curva de calibración (ANEXO II).

De acuerdo a las concentraciones halladas, se realizaron diluciones y se llevaron a una sola concentración, para poder cargar la misma concentración proteica en el gel a utilizar en el *Western Blot* y así poder comparar los niveles relativos de la proteína LRP1.

3. Evaluación de la viabilidad celular

La inhibición del sistema Ubiquitina-proteosoma con MG132, a concentraciones desde 0,03 hasta 3,0 μM , en un tratamiento de 24 horas, reduce la viabilidad celular e incrementa la agregación proteica en células HepG2, de una manera dependiente de la concentración, determinado por el ensayo MTS (ANEXO III).

El gráfico representa los cuatro experimentos independientes, donde las células HepG2 fueron tratadas con las diferentes concentraciones de MG132 y posteriormente se realizó el ensayo con MTS. Cada experimento contó con al menos cinco repeticiones, para confirmar los resultados (Figura 9).

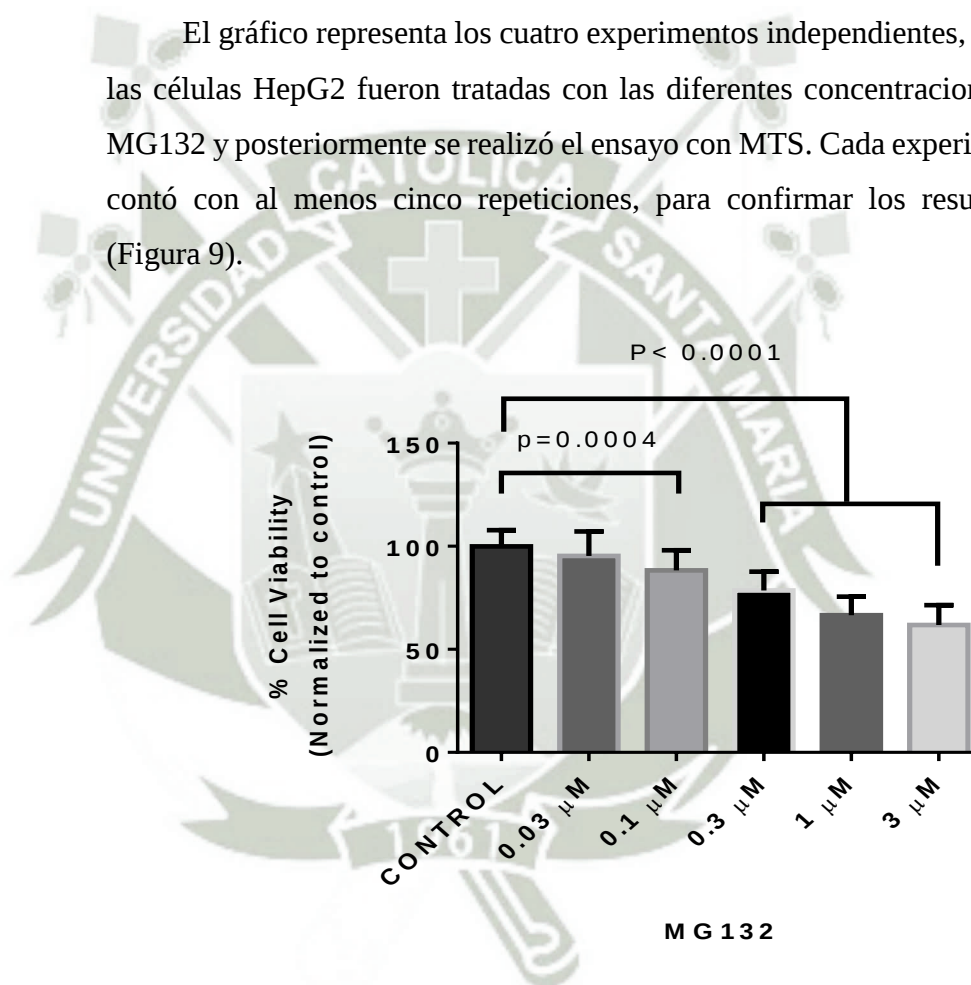


Figura 9. Tratamientos con MG132 con relación al porcentaje de viabilidad de las células HepG2

MG132 (0,03 – 3,0 μM , 24 horas) reduce la viabilidad celular en células HepG2 en una manera dependiente de la concentración, determinado por MTS; sugiriendo que la inhibición del sistema Ubiquitina-proteosoma provocaría un incremento de la proteína LRP1, lo

cual llevaría a su acumulación y por consecuencia causaría citotoxicidad y muerte celular. Los datos presentados se muestran como media $\pm$ desviación estándar (ANOVA one-way, seguido la prueba de Dunnett en comparación con el grupo control, donde $p < 0,05$ se consideró significativo).

El estudio demuestra que MG132 es un inhibidor selectivo del proteosoma y no letal para las células según Rego C et al., sin embargo se requieren de más estudios para determinar si hay daño en la función celular causando apoptosis, lo cual podría ser motivo de un estudio a futuro.

4. Análisis de Western Blot

4.1. Agregación de proteína

Los resultados de los *Western Blots* obtenidos, de los tres experimentos independientes, revelaron que las proteínas ubiquitinadas ligadas a K48, considerado a éste como un marcador de agregación de proteínas, demostraron que MG132 a concentraciones de 0,3 y 1,0 μM específicamente, induce la agregación de proteínas (Figura 10). Como se mencionó la ubiquitinización de las proteínas es la señal que indica la degradación de las proteínas mediante el sistema Ubiquitina-proteosoma, como podemos observar que sigue sucediendo aplicando bajas concentraciones de MG132, sin embargo, al inhibir este sistema con mayores concentraciones de MG132, las proteínas ya no se degradan y empiezan a acumularse formando un agregado proteico, el cual puede inducir citotoxicidad, como se explicó anteriormente.

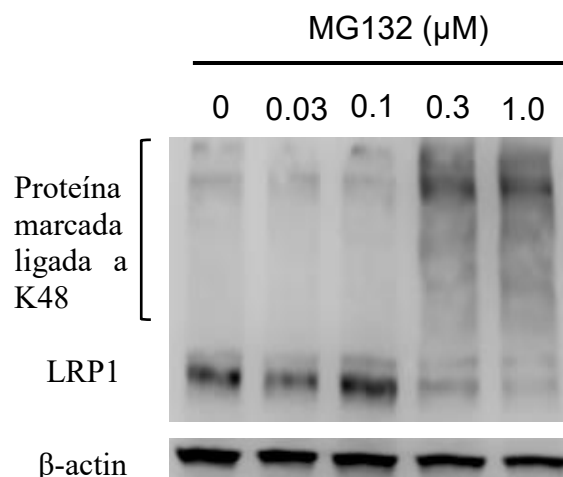


Figura 10. Proteína LRP1 ubiquitinada ligada a K48

Los datos presentados se muestran como media $\pm$ desviación estándar (ANOVA *one-way*, seguido la prueba de Dunnett en comparación con el grupo control, donde $p < 0,05$ se consideró significativo). Se utilizó beta actina sólo como control para comprobar que se cargó la misma concentración de muestra proteica.

4.2. Niveles de LRP1

El sistema primario de la degradación de proteínas dañadas y mal plegadas es el sistema Ubiquitina-proteosoma, al ser inhibido por MG132 produce agregación de proteínas que causa citotoxicidad y aumenta la vida media de LRP1 en células HepG2 según se informa en la bibliografía. Varios estudios han reportado que el inhibidor del proteosoma MG132, incrementa los niveles proteicos de LRP1 no solo en células HepG2, sino también en células humanas vasculares de músculo liso.

Sin embargo, en el presente estudio se probó que los niveles de LRP1 reducían significativamente y de una manera dependiente a la concentración de MG132 (0,3 y 1,0 μM) en

células HepG2. Como se muestra en los análisis de *Western Blot* de la cadena beta de LRP1 (85 kDa) (Figura 11, A).

Análisis densitométricos de estos *blots* demostraron que los niveles de LRP1 son reducidos aproximadamente en un 60 y 80% en células HepG2 tratadas con 0,3 y 1,0 μM de MG132, respectivamente, comparadas con el control (Figura 11, B).

Contradiendo los previos estudios realizados, al inhibir el sistema Ubiquitina-proteosoma con MG132, éste produce agregación de la proteína LRP1 y además sus niveles son reducidos, lo que sugiere la activación de una ruta alterna de degradación. Esto llevó a realizar un ensayo de Inmunofluorescencia para observar la posibilidad de la participación de la autofagia en este estudio.

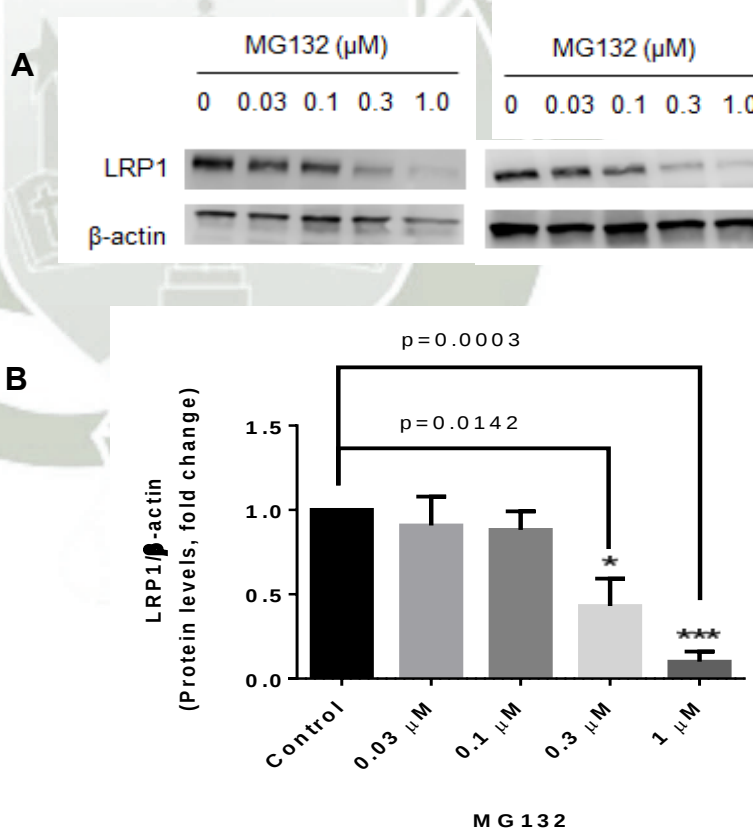


Figura 11. (A) Niveles de proteína LRP1 en células HepG2

tratadas con MG132. (B) Gráfico de los tratamientos con MG132 comparados con los niveles de proteína LRP1

(A) Resultados de los Western Blot de las muestras A y B respectivamente, teniendo beta-actina como control de la misma concentración proteica cargada en el gel. Los niveles de LRP1 disminuyen a medida que la concentración de MG132 incrementa. (B) El gráfico representa cuatro experimentos independientes. Los datos presentados se muestran media $\pm$ desviación estándar (ANOVA *one-way*, seguido la prueba de Dunnett en comparación con el grupo control, donde $p < 0,05$ se consideró significativo).

5. Inmunocitoquímica

Células HepG2 tratadas con MG132 a una concentración de $0,3 \mu\text{M}$ por 24 horas, fueron fijadas y se pudo analizar una múltiple inmunodetección, de dos anticuerpos simultáneamente: LRP1 (verde) y LC3 (rojo). Imágenes representativas de células tratadas con MG132 se muestran en (Figura 12).

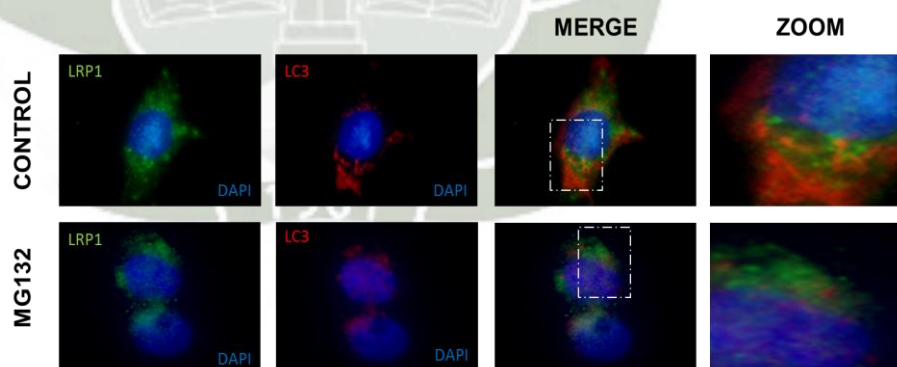


Figura 12. Fluorescencia de LRP1 y LC3 en células HepG2 tratadas con MG132

Como se muestra en las imágenes, los niveles de proteína LRP1 y LC3 son reducidos por MG132 en células HepG2, entonces al inhibir el sistema Ubiquitina-proteosoma se reducen los niveles de proteína LRP1 y

adicionalmente LC3 es evaluado para determinar la activación por autofagia, detectada por Inmunofluorescencia. Resultados similares se obtuvieron por *Western Blot*, estas imágenes permitieron confirmar los ensayos de *Western Blot*, donde mostraban que los niveles proteicos de LRP1 disminuyen y por otra parte se activa la autofagia, comprobada por LC3.

Recientes estudios demostraron que al inhibir el sistema Ubiquitina-proteosoma otras vías de degradación son activadas, como autofagia. Se requieren experimentos adicionales para elucidar el mecanismo de reducción LRP1 por MG132 cuando el sistema Ubiquitina-proteosoma está inhibido.

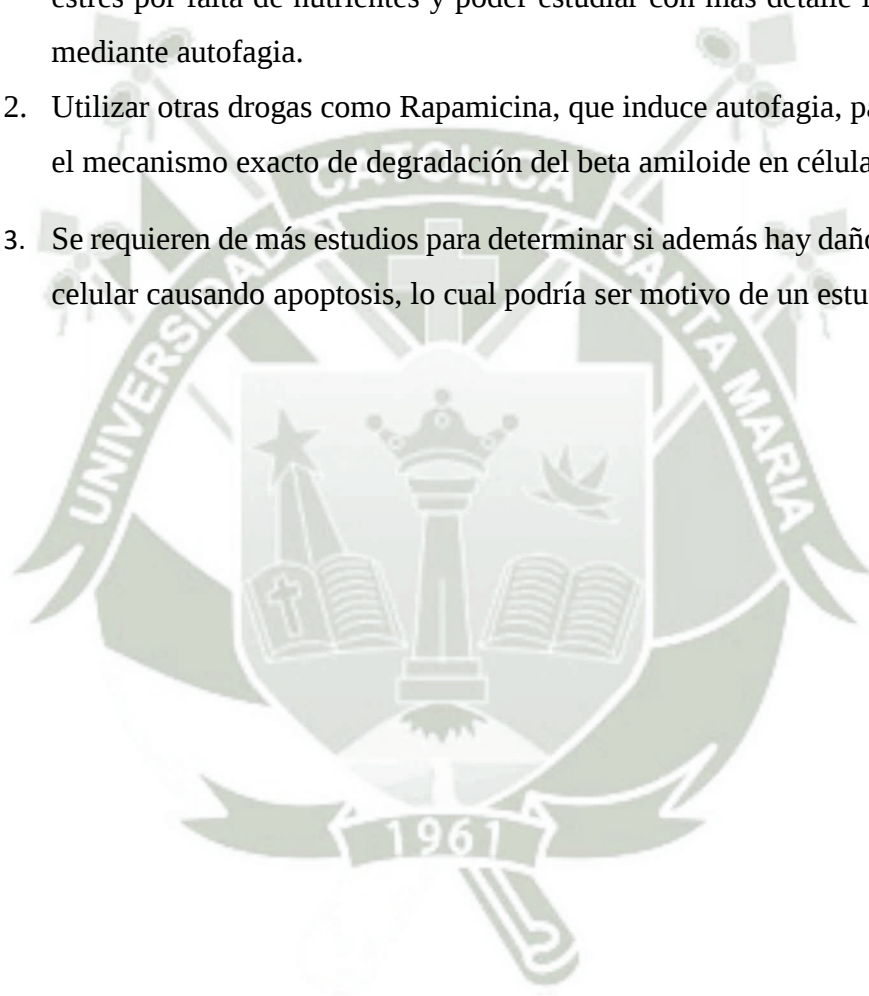


CONCLUSIONES

1. El tratamiento de las células HepG2 con el inhibidor MG132, redujo la viabilidad celular.
2. La agregación proteica de LRP1 incrementó en células HepG2 tratadas con MG132.
3. Los niveles de la proteína LRP1 redujeron de manera dependiente de acuerdo a las diferentes concentraciones de MG132 en las células HepG2.
4. El tratamiento de las células HepG2 con MG132 redujo los niveles de la proteína LC3, indicador de la degradación de autofagia; como consecuencia de la agregación proteica.

RECOMENDACIONES

1. Realizar experimentos futuros con diferentes condiciones, como provocar estrés por falta de nutrientes y poder estudiar con más detalle la degradación mediante autofagia.
2. Utilizar otras drogas como Rapamicina, que induce autofagia, para determinar el mecanismo exacto de degradación del beta amiloide en células HepG2.
3. Se requieren de más estudios para determinar si además hay daño en la función celular causando apoptosis, lo cual podría ser motivo de un estudio a futuro.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Association, A. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement.* 9, 208–245.
2. Shankar GM, Walsh DM: Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and A β . *Mol Neurodegener* 2009;4:48–61.
3. O'Brien RJ, Wong PC: Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 2011;34:185–204.
4. Kanekiyo T, Cirrito JR, Liu CC, et al: Neuronal clearance of amyloid-beta by endocytic receptor LRP1. *J Neurosci* 2013; 33: 19276– 19283.
5. Lam FC, Liu R, Lu P, et al: β -Amyloid efflux mediated by P-glycoprotein. *J Neurochem* 2001;76:1121–1128.
6. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, et al: Modulation of amyloid β -protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest* 2000;106:1159–1166.
7. Tsubuki S, Saito Y, Tomioka M, Ito H, Kawashima S. Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine. *J Biochem.* 1996;119:572-6.
8. Zhao, Z. et al. Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat. Neurosci.* 18, 978–987 (2015).
9. Ciechanover, A. & Kwon, Y.T., 2015. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine*, 47(3), p.e147.
10. Ramanathan, A. et al., 2015. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: The role, regulation and restoration of LRP1. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(JUL), pp.1–12.
11. Schmidt, M. & Finley, D. Regulation of proteasome activity in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 13–25 (2014).
12. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513 (2009).
13. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol*

- 2003; 21:921–926.
14. Keller JN, Huang FF, Markesbery WR. Decreased levels of proteasome activity and proteasome expression in aging spinal cord. *Neuroscience* 2000; 98:149–156.
 15. Gregori L, Fuchs C, Figueiredo-Pereira ME, Van Nostrand WE, Goldgaber D. Amyloid β -protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. *J Biol Chem* 1995; 270: 19702–19708.
 16. Andre R, Tabrizi SJ. Misfolded PrP and a novel mechanism of proteasome inhibition. *Prion* 2012; 6:32–36.
 17. Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J. & Guan, K. L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* 7, 643–644 (2011).
 18. Rubinsztein, D. C., Marino, G. & Kroemer, G. Autophagy and aging. *Cell* 146, 682–695 (2011)
 19. Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat. Med.* 19, 983–997 (2013).
 20. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075 (2008).
 21. Herz, J., U. Hamann, S. Rogne, O. Myklebost, H. Gausepohl, and K. K. Stanley. 1988. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *Embo J* 7: 4119-4127.
 22. Herz, J., R. C. Kowal, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 1990. Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *Embo J* 9: 1769-1776.
 23. Li, Y., Lu, W., Marzolo, M. P., and Bu, G. (2001a). Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J. Biol. Chem.* 276, 18000–18006. doi: 10.1074/jbc.m101589200.
 24. Deane, R., Wu, Z., Sagare, A., Davis, J., Du Yan, S., Hamm, K., et al. (2004). LRP/amyloid β -peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* 43, 333–344. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.017.

25. Neels, J. G., B. M. van Den Berg, A. Lookene, G. Olivecrona, H. Pannekoek, and A. J. van Zonneveld. 1999. The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. *J Biol Chem* 274: 31305-31311.
26. Obermoeller-McCormick, L. M., Y. Li, H. Osaka, D. J. FitzGerald, A. L. Schwartz, and G. Bu. 2001. Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J Cell Sci* 114: 899-908.
27. Rozanov, D. V., Hahn-Dantona, E., Strickland, D. K., and Strongin, A. Y. (2004). The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J. Biol. Chem.* 279, 4260–4268. doi: 10.1074/jbc.m311569200.
28. von Arnim, C. A. F., Kinoshita, A., Peltan, I. D., Tangredi, M. M., Herl, L., Lee, B. M., et al. (2005). The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J. Biol. Chem.* 280, 17777–17785. doi: 10.1074/jbc.m414248200.
29. Polavarapu, R., Gongora, M. C., Yi, H., Ranganthan, S., Lawrence, D. A., Strickland, D., et al. (2007). Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109, 3270–3278. doi: 10.1182/blood-2006-08-043125
30. Liu, Q., Zhang, J., Tran, H., Verbeek, M. M., Reiss, K., Estus, S., et al. (2009). LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol. Neurodegener.* 4:17. doi: 10.1186/1750-1326-4-17.
31. Selvais, C., D'Auria, L., Tyteca, D., Perrot, G., Lemoine, P., Troeberg, L., et al. (2011). Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function. *FASEB J.* 25, 2770–2781. doi: 10.1096/fj.10-169508.
32. An, J., Zhang, C., Polavarapu, R., Zhang, X., Zhang, X., and Yepes, M. (2008). Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain.

- Blood 112, 2787–2794. doi: 10.1182/blood-2008-02-141630
33. Quinn, K. A., Grimsley, P. G., Dai, Y. P., Tapner, M., Chesterman, C. N., and Owensby, D. A. (1997). Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. *J. Biol. Chem.* 272, 23946–23951. doi: 10.1074/jbc.272.38.23946.
 34. Zlokovic, B. V., R. Deane, A. P. Sagare, R. D. Bell, and E. A. Winkler. 2010. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. *J Neurochem* 115: 1077-1089.
 35. Muratoglu, S. C., I. Mikhailenko, C. Newton, M. Migliorini, and D. K. Strickland. 2010. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway. *J Biol Chem* 285: 14308-14317.
 36. Craig, J., I. Mikhailenko, N. Noyes, M. Migliorini, and D. K. Strickland. 2013. The LDL receptor-related protein 1 (LRP1) regulates the PDGF signaling pathway by binding the protein phosphatase SHP-2 and modulating SHP-2-mediated PDGF signaling events. *PLoS One* 8.
 37. May, P., A. Rohlmann, H. H. Bock, K. Zurhove, J. D. Marth, E. D. Schomburg, J. L. Noebels, U. Beffert, J. D. Sweatt, E. J. Weeber, and J. Herz. 2004. Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol Cell Biol* 24: 8872-8883.
 38. Maier, W., M. Bednorz, S. Meister, A. Roebroek, S. Weggen, U. Schmitt, and C. U. Pietrzik. 2013. LRP1 is critical for the surface distribution and internalization of the NR2B NMDA receptor subtype. *Mol Neurodegener* 8: 1750-1326.
 39. Sagare, A., R. Deane, R. D. Bell, B. Johnson, K. Hamm, R. Pendu, A. Marky, P. J. Lenting, Z. Wu, T. Zarcone, A. Goate, K. Mayo, D. Perlmutter, M. Coma, Z. Zhong, and B. V. Zlokovic. 2007. Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med* 13: 1029-1031.
 40. Gonias, S. L., and W. M. Campana. 2014. LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous

- system. *Am J Pathol* 184: 18- 27.
41. Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201. doi: 10.1016/j.neuron.2008. 01.003.
 42. Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738. doi: 10.1038/nrn3114.
 43. Weller, R. O., Subash, M., Preston, S. D., Mazanti, I., and Carare, R. O. (2008). Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 18, 253–266. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00133.x
 44. Hawkes, C. A., Sullivan, P. M., Hands, S., Weller, R. O., Nicoll, J. A. R., and Carare, R. O. (2012). Disruption of arterial perivascular drainage of amyloid- β from the brains of mice expressing the human APOE 4 allele. *PLoS One* 7:e41636. doi: 10.1371/journal.pone.0041636.
 45. Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., et al. (2003). Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 4162–4167. doi: 10.1073/pnas. 0230450100.
 46. Kanemitsu, H., Tomiyama, T., and Mori, H. (2003). Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci. Lett.* 350, 113–116. doi: 10.1016/s0304- 3940(03)00898-x.
 47. Hernandez-Guillamon, M., Mawhirt, S., Blais, S., Montaner, J., Neubert, T. A., Rostagno, A., et al. (2015). Sequential Abeta degradation by the matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *J. Biol. Chem.* 290, 15078–15091. doi: 10. 1074/jbc.m114.610931.
 48. Kanekiyo, T., and Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 6:93. doi: 10.3389/fnagi.2014.00093.
 49. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B.,

- et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1–40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 106, 1489–1499. doi: 10.1172/jci10498.
50. Sagare, A. P., Winkler, E. A., Bell, R. D., Deane, R., and Zlokovic, B. V. (2011b). From the liver to the blood-brain barrier: an interconnected system regulating brain amyloid- β levels. *J. Neurosci. Res.* 89, 967–968. doi: 10.1002/jnr.22670.
51. Emonard, H. et al., 2014. Regulation of LRP-1 expression: Make the point. *Pathologie Biologie*, 62(2), pp.84–90.
52. Barltrop J, Owen T. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg Med Chem Lett.* 1991;1:611–614.
53. Goodwin CJ, Holt SJ, Downes S, Marshall NJ. 1995. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *J Immunol Methods* 13;179(1):95-103.
54. H. Towbin. (2011). Análisis de proteínas: Electroforesis, Transferencia e Inmunoprecipitación. *Proc Natl Acad Sci*, 76, 350-384. doi: 10.1186/1750-1326-4-33.
55. National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database;SID=136367651,<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/136367651>.
56. Abcam. Immunocytochemistry and immunofluorescence protocol: Procedure for staining of cell cultures using immunofluorescence.
57. Rego C, Malva J, Cunha R, Oliveira C. 2007. Interaction between neurons and glia in aging and disease. Springer Science & Business Media.

ANEXOS



ANEXO I

CULTIVO CELULAR

Según el volumen de los flasks, *well plates* y/o *microplates*; y según la concentración celular que se desea obtener, se recomienda determinados volúmenes de tripsina, de medio sin suero y de medio completo.

Tabla 2. Volúmenes recomendados según la concentración celular deseada

Cultivo celular	Concentración celular (células/mL)	Volumen de tripsina (mL)	Volumen de medio sin suero (mL)	Volumen de medio completo (mL)
Corning flasks 25 cm ²	1,5 x 10 ⁶	2	6	5 – 7,5
Corning flasks 75 cm ²	6 x 10 ⁶	6	18	15 – 22,5
Corning flasks 150 cm ²	1,5 x 10 ⁷	10	30	30 – 45
<i>Well plates</i> de 6 pozos	500 000	-	-	2
<i>Microplates</i> de 96 pozos	10 000	-	-	0,2

ANEXO II

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

1. Resultados para la Muestra A

Los resultados de las absorbancias, leídas a 562 nm, y las concentraciones conocidas de la albúmina de suero bovino se utilizaron para luego extrapolar las concentraciones de proteína de los tratamientos con la curva de calibración.

Tabla 3. Relación de la concentración de albúmina de suero bovino con su absorbancia

Concentración de Albúmina (µg/mL)	Absorbancia (nm)			Promedio
2000	1,8563	1,8813	1,9683	1,9020
1000	1,0803	1,1353	1,1403	1,1187
500	0,6023	0,6543	0,6033	0,6200
250	0,3323	0,3543	0,3583	0,3483
125	0,1813	0,1813	0,1933	0,1853

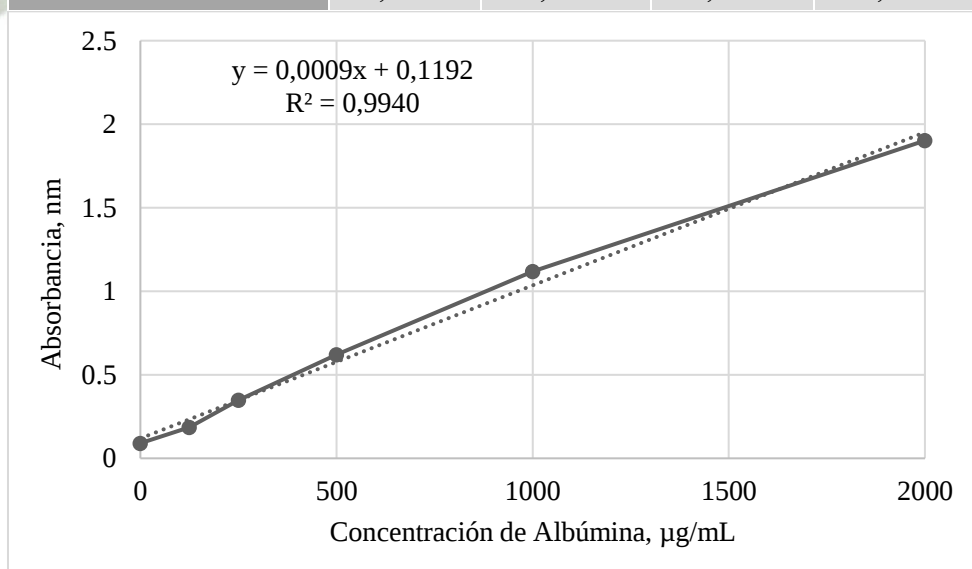


Figura 13. Curva de calibración

Concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino en las (eje de

abscisas) y Absorbancia leída a 562 nm (eje de ordenadas). Con un coeficiente de determinación de 0,9940.

La ecuación hallada por regresión lineal permitió predecir las concentraciones de proteína de cada tratamiento mediante extrapolación y luego las concentraciones se multiplicaron por 3, debido a que los tratamientos se diluyeron en buffer fosfato salino para el ensayo colorimétrico.

Tabla 4. Cuantificación de proteínas de los tratamientos

Tratamientos (μ M)		Absorbancia Promedio (nm)	Concentración proteica (μ g/mL)	DS
C	0,0	0,7733	2180,44	0,0139
		0,7593	2133,78	0,0125
T1	0,03	0,8583	2463,78	0,0075
		0,8347	2384,89	0,0065
T2	0,1	0,7953	2253,78	0,0062
		0,7710	2172,67	0,0121
T3	0,3	0,6797	1868,22	0,0375
		0,6297	1701,56	0,0081
T4	1,0	0,4587	1131,56	0,0075
		0,4207	1004,89	0,0070
T5	3,0	0,2183	330,44	0,0092
		0,2423	410,44	0,0036

De acuerdo a las concentraciones halladas, se realizaron diluciones y se llevaron a una sola concentración, para poder cargar la misma concentración proteica en el gel a utilizar en el *Western Blot* y así poder comparar los niveles relativos de la proteína LRP1.

Considerando que los datos obtenidos de la desviación estándar (DS) son muy bajos o muy cercanos a cero, sugiere que los resultados de las absorbancias y las concentraciones son confiables.

2. Resultados para la Muestra B

Tabla 5. Relación de la concentración de albúmina de suero bovino con su absorbancia

Concentración de Albúmina (µg/mL)	Absorbancia (nm)			Promedio
2000	1,907	2,057	2,017	1,994
1000	1,107	1,161	1,178	1,149
500	0,654	0,671	0,716	0,680
250	0,339	0,379	0,381	0,366
125	0,200	0,213	0,233	0,215

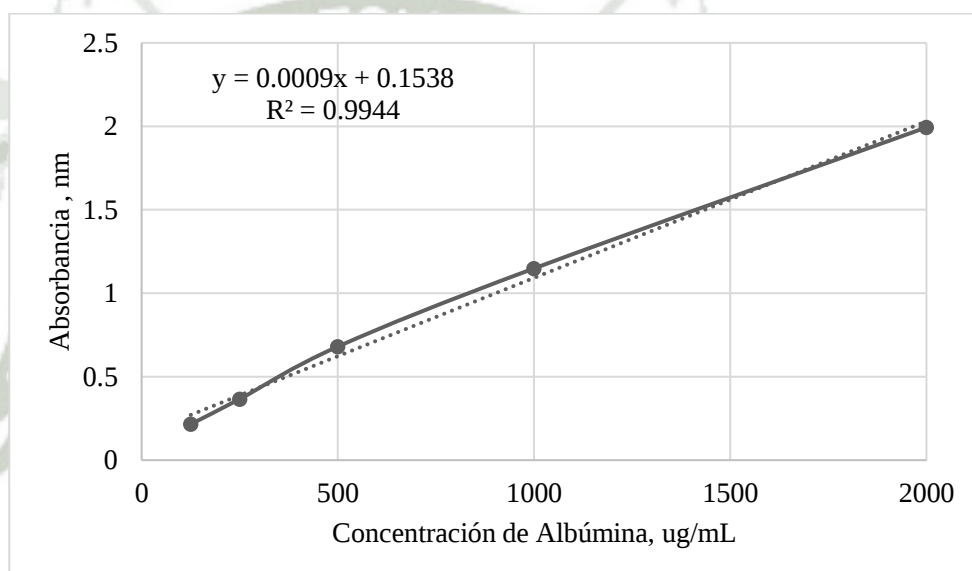


Figura 14. Curva de calibración

Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9944. Lo cual indica que las concentraciones que se hallarán extrapolando a partir de la ecuación serán bastante aproximadas.

Se utilizó la ecuación hallada por regresión lineal, para determinar las concentraciones de proteína de cada tratamiento y luego las concentraciones se multiplicaron por 3, debido a que los tratamientos se diluyeron en buffer fosfato salino para el ensayo colorimétrico.

Tabla 6. Cuantificación de proteínas de los tratamientos

Tratamientos (μ M)		Absorbancia Promedio (nm)	Concentración proteica (μ g/mL)	DS
C	0,0	0,7390	1950,67	0,0150
		0,7260	1907,33	0,0131
T1	0,03	0,7847	2102,89	0,0740
		0,8803	2421,78	0,0270
T2	0,1	0,7507	1989,56	0,0042
		0,6863	1775,11	0,0104
T3	0,3	0,6070	1510,67	0,0302
		0,5547	1336,22	0,0075
T4	1,0	0,3097	519,56	0,0067
		0,3670	710,67	0,0038
T5	3,0	0,1697	52,89	0,0027
		0,1260	-92,67	0,0032

El tratamiento 5 con 3,0 μ M de MG132, mostró una cantidad insuficiente de proteínas por lo cual no se pudo realizar el *Western Blot*.

ANEXO III

VIABILIDAD CELULAR

Se realizó la lectura de absorbancias en el lector de microplatos a 490 nm, se halló el promedio del blanco, es decir, células sin tratamiento, para considerar su viabilidad como el 100 % y a partir de ese dato comparar las absorbancias, de las células con tratamiento, y hallar su porcentaje de viabilidad.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad celular por el ensayo de MTS

Tratamiento (μ M)	Porcentaje de viabilidad (%)					Promedio
0,0	111,42	103,51	104,20	95,94	84,93	100,00
	86,99	102,43	99,80	116,23	94,55	100,00
	98,37	103,55	106,88	99,11	92,08	100,00
	95,57	107,29	103,71	102,08	91,35	100,00
0,03	109,36	106,26	112,11	90,43	86,65	100,96
	81,73	90,60	92,90	88,30	86,33	87,98
	112,80	105,40	93,19	78,39	91,71	96,30
	111,19	104,36	104,03	86,47	73,45	95,90
0,1	83,55	91,46	101,79	95,25	79,42	90,29
	75,82	86,01	95,53	85,35	80,42	84,62
	79,87	80,24	78,76	89,12	88,75	83,34
	78,01	94,92	111,19	104,36	87,12	95,12
0,3	80,45	86,99	104,20	84,24	77,70	86,72
	74,83	73,52	82,72	66,95	64,32	72,47
	73,94	79,87	69,50	70,98	76,16	74,09
	73,13	76,71	91,67	86,79	75,41	80,74
1,0	73,23	66,34	88,37	72,19	65,31	73,09
	73,19	69,91	67,94	64,65	49,87	65,11
	64,32	70,24	60,62	72,09	79,13	69,28
	53,94	53,28	63,04	65,65	57,19	58,62
3,0	72,88	68,75	84,93	58,43	54,99	68,00
	59,07	68,26	70,89	58,41	62,02	63,73
	53,22	52,48	44,71	55,81	57,29	52,70
	51,98	55,24	73,13	69,55	65,00	62,98