

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE BAFILOMICINA A1 Y MG132
SOBRE EL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LA PROTEÍNA 1
RELACIONADA AL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA
DENSIDAD (LRP1) EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPÁTICO (HepG2)**

Tesis presentada por el Bachiller:

Aranibar Aragón, Brian Danny

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesora: Dra. Nieto Montesinos, Rita Milagros

AREQUIPA – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA Expediente N°. 20170000046576
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas N° Trámite en Fac. 1720-2017
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica Fecha 12-10-2017

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

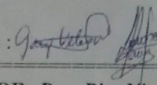
DE: ARANIBAR ARAGON, Brian Danny

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LA PROTEINA I RELACIONADA AL RECEPTOR DE LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD (LRPI) EN CELULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR (HepG2) TRATADAS CON BAFILOMICINA A1 Y MGI32, BOSTON, 2017"

DICTAMINADORES: 1) Dra. Gaby Velasco Lozano 2) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas:  (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 25/10/17

ASESOR: Dra. Rita Nieto Montesinos

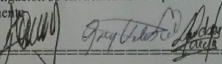
DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesora en el presente Trabajo de Investigación, cumpro con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

Firma  Fecha 06/08/2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas
- 2) Dra. Gaby Velasco Lozano
- 3) Mgter. Julitza Paredes Fuentes

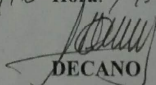
DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por la recurrente, debiendo cambiar el título a "DETERMINACION DEL EFECTO DE BAFILOMICINA A1 Y MGI32 SOBRE EL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LA PROTEINA I RELACIONADA AL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEINA DE BAJA DENSIDAD (LRPI) EN CELULAS DE CARCINOMA HEPATICO (HepG2)", y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

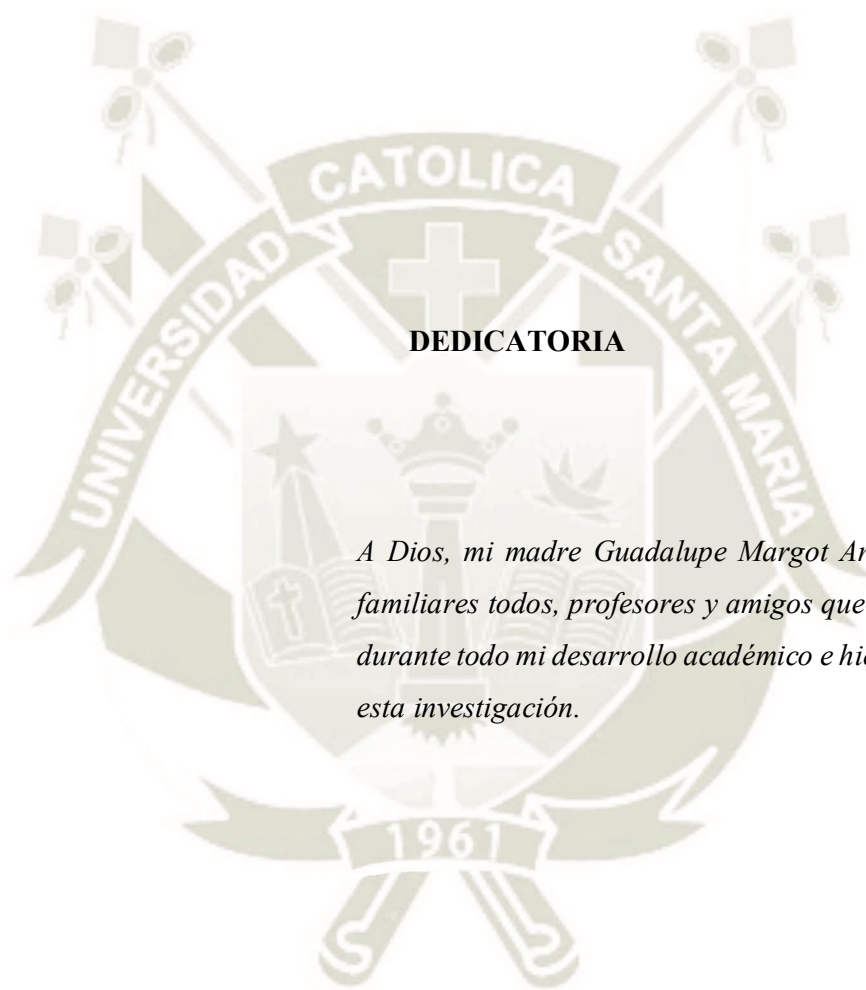
Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 06/09/18

JURADOS: Presidente
Vocal
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 26/09/18 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)


DECANO



DEDICATORIA

*A Dios, mi madre Guadalupe Margot Aragón Ticona,
familiares todos, profesores y amigos que me apoyaron
durante todo mi desarrollo académico e hicieron posible
esta investigación.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por acompañarme cada día, a mi madre y familiares que, con su apoyo y amor, estuvieron conmigo en el camino que me llevó a conseguir este objetivo.

De manera especial a mis compañeras y amigas Stefany Nathaly Huaynasi Aguirre y Karin Tenglin por ayudarme en la realización de esta investigación.

De manera especial a mi asesora la Dra. Rita Nieto Montesinos por el apoyo y tiempo brindado durante la redacción de este trabajo de investigación. Gracias por ser parte de mi formación profesional y la confianza brindada a lo largo de todo este tiempo.

A quienes fueron mis docentes en mi preparación profesional, dictaminadores y jurados en la sustentación de esta investigación Dr. José Villanueva Salas, Mgter. Julitza Paredes Fuentes y Dra. Gaby Velazco Lozano por el tiempo dedicado a las correcciones y/o sugerencias previas a la sustentación.

A la Universidad de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa, por el tiempo, conocimientos, consejos y confianza brindada, al M. Sc. Alejandro Rondón Ortiz por el tiempo y apoyo brindado.

Agradezco a la Universidad Católica de Santa María y a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por haberme acogido entre sus aulas y haberme brindado una excelente educación tanto en conocimientos científicos que me brindaron desde el inicio de esta carrera profesional como en enseñanzas sobre la ética y la moral.

INTRODUCCIÓN

La Proteína 1 relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) se compone de dos subunidades: una subunidad extracelular de 515 kDa ligada a la subunidad transmembrana de 85 kDa. Aunque LRP1 esta compuesto de 4 clusters de unión, los principales son el II y IV ya que estos se unen a la mayoría de los ligandos, incluyendo el β -amiloide ($A\beta$). LRP1 se encuentra dentro de muchas células como astrocitos, neuronas, hepatocitos y células del musculo liso pero las células de interés analizadas en este estudio son células hepáticas cancerígenas conocidas como células HepG2. LRP1 localizado en el hígado podría ser el lugar principal para el aclaramiento sistémico de $A\beta$ en el cuerpo, pero LRP1 también se encuentra en otras células, como astrocitos, neuronas y células del músculo liso. También hay una forma soluble de LRP1, conocida como sLRP1, que está presente en el plasma y se une a $A\beta$ para transportarlo a los hepatocitos para su consiguiente degradación.

El $A\beta$ es un péptido que tiene aproximadamente 4 kDa de peso y que es producido regularmente por muchas células. La presencia de $A\beta$ dentro del cuerpo no es atípica; el problema es que la acumulación de $A\beta$ puede ocurrir en el cerebro, y esto podría provocar un deterioro mental, pérdida de la memoria, entre otros. En tal sentido, los mecanismos que ayudan a eliminar el $A\beta$ necesitan funcionar correctamente. Las placas de $A\beta$ son una de las dos características clave de la enfermedad del Alzheimer (AD). Hay dos razones potenciales que podrían explicar por qué se acumula $A\beta$; porque hay demasiada producción de $A\beta$ y el cuerpo no puede mantener su degradación, o hay una disminución en la degradación de $A\beta$, o una combinación de ambos problemas.

Dado que el $A\beta$ sistémico es degradado en el hígado, entonces una hipofuncionalidad de LRP1 en el hígado podría conducir potencialmente a una acumulación de $A\beta$ en tejidos periféricos, lo que conduciría al desequilibrio de $A\beta$ entre tejidos periféricos y el cerebro, resultando en la acumulación de $A\beta$ en el cerebro. Estudios realizados por Sagare et al. en el año 2012, en la Escuela de Medicina de la Universidad de California del Sur indican que un aumento en la expresión de LRP1 en el hígado podría ser una opción terapéutica para aumentar la degradación de $A\beta$. Una vez dentro de las células,

la degradación de las proteínas típicamente ocurre a través de uno o ambos de estos sistemas de degradación: sistema de proteosoma - ubiquitina (UPS) y/o sistema de degradación lisosomal.

El sistema de degradación lisosomal funciona mediante la creación de un entorno ácido para la degradación de las proteínas. La degradación lisosomal típicamente se especializa en la degradación de proteínas que se encuentran en el exterior de la célula o proteínas ubicadas en la membrana celular. LRP1 se degrada a lo largo de la vía endosómica, terminando con la fusión del endosoma tardío con un lisosoma, que contiene las enzimas necesarias que funcionan en un $\text{pH} < 7.0$ (pH fisiológico). Esto permite la degradación de proteínas en moléculas más pequeñas y aminoácidos para otros usos dentro de la célula. El bajo pH de los endosomas y los lisosomas es creado y mantenido por las bombas de proteínas dependientes de ATP que llevan H^+ a las vesículas. Esta bomba, conocida como ATPasa vacuolar (V-ATPasa), es inhibida por la Bafilomicina A1, que es un antibiótico derivado de *Streptomyces griseus*, por lo que cuando se utiliza la Bafilomicina A1 en las células HepG2, se inhibe la vía de degradación lisosomal para LRP1. El aumento de los niveles de LRP1 en comparación con el control indicaría que LRP1 está siendo degradada por degradación lisosomal.

El otro sistema de degradación, UPS, también se encuentra dentro de la célula, y especializa en la degradación de proteínas en el citosol y el núcleo. El componente degradante de la proteína es el proteosoma 26S compuesto de dos partes: Un regulador 19S y un núcleo 20S. La parte 19S regula la entrada de proteínas ubiquitinadas listas para la degradación, y el núcleo 20S tiene la capacidad de degradar las proteínas. MG132 es un aldehído peptídico que inhibe el sistema UPS por unión reversible al proteosoma 20S. Curiosamente, un estudio realizado en el laboratorio de Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, Boston - Estados Unidos demostró que la expresión de LRP1 en células HepG2 disminuyó, en lugar de aumentar, cuando se les expuso a MG132, lo que indica que, en estas células, UPS no es el principal sistema de degradación de LRP1, y la inhibición de UPS no conserva la proteína.

Un trabajo realizado por Cal R et al, en el 2013, estudió la estabilización de LRP1 inducida por las lipoproteínas de baja densidad (agLDL) mediante la disminución de

la ubiquitina ligasa o E3, demostrando que las agLDL disminuyen la ubiquitinización de LRP1 en células de músculo liso vascular humano (VSMC). A través de este estudio, por densitometría se observó que una concentración de 10 μM de MG132 redujo la ubiquitinización de LRP1 durante un tratamiento de 18 horas en células vasculares de musculo liso, y que por lo tanto la expresión de la proteína LRP1 aumentó. En otro trabajo realizado donde se estudiaba la vía de degradación de LRP4, se demostró que la vida media de la subunidad 515 kDa de este se prolongaba en 3 horas aproximadamente con la adición de MG132 a una concentración de 20 μM . Los datos de estos experimentos podrían indicar que LRP1 también sería preservado cuando UPS es inhibido por MG132, pero estudios recientes realizados en el Laboratorio de la Universidad de MCPHS presentaron resultados diferentes - LRP1 no se conservó con la adición de MG132 en células HepG2.

Los procesos de síntesis y degradación de proteínas están muy controlados dentro de las células. Dado que la proteína puede ser incorrectamente transcrita / traducida o dañada y/o no funcional debido al entorno celular, es importante que la célula sea capaz de degradar y reemplazar la proteína dañada, razón por la cual la renovación de proteínas es un proceso normal dentro de todas las células. La tasa de rotación de proteínas no es la misma para todos los tipos de proteínas, pero es necesario medir la tasa de rotación de proteínas en los experimentos porque los cambios en el entorno celular, como la adición de tratamientos afectan la degradación de proteínas. Esta es la razón por la que Cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas se utiliza para evitar la mala interpretación de la disminución o aumento de los niveles de LRP1 en comparación con el control.

Debido a esta información reciente, y entendiendo que los estudios de acumulación y degradación de $\text{A}\beta$ son importantes, puesto que se sabe que sLRP1 se une a $\text{A}\beta$ para llevarlo a los hepatocitos para su degradación, este proyecto tuvo como objetivo estudiar los niveles de LRP1 en células HepG2 cuando se inhibe el sistema de degradación lisosomal o el UPS para comprender qué proceso es el principal responsable de la degradación de LRP1 para posteriormente poder determinar el tiempo de vida media de LRP1 y evaluar el efecto de los inhibidores antes mencionados sobre este parámetro.



RESUMEN

El Alzheimer, enfermedad neurodegenerativa en la cual se produce un declive cognitivo, se produce por la sobreacumulación de péptido de β -amiloide ($A\beta$) en la corteza, ya sea por un desequilibrio entre la tasa de eliminación y producción o por factores genéticos. Se sabe que la degradación de $A\beta$ a nivel cerebral esta dado por enzimas producidas en neuronas, neuroglías, entre otras, y que a nivel periférico el $A\beta$ tiene una degradación hepática. La proteína 1 relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad (LRP1) es una proteína-receptor endocítico que se expresa en los hepatocitos, neuronas, astrocitos entre otras. Este receptor a nivel cerebral puede mediar la salida de $A\beta$ a través de la barrera hematoencefálica y es sLRP1 quien transporta el $A\beta$ hasta los hepatocitos para su degradación, siendo internalizado por LRP1 expresado en hepatocitos. El objetivo fue determinar la principal vía de degradación de LRP1 y cuantificar su vida media en células HepG2. La metodología utilizada consistió en que primero se cultivó este tipo de células para luego tratarlas con un inhibidor de la vía de degradación lisosomal-autofágica (Bafilomicina A1) y un inhibidor de la vía de degradación ubiquitina-proteosoma (MG132). Luego, se probó diferentes concentraciones de Cicloheximida con el fin de encontrar la concentración óptima para inhibir la síntesis de proteínas en las células HepG2, para

usar esta concentración en los experimentos para la determinación del tiempo de vida media de LRP1. Finalmente, se realizó la determinación del tiempo de vida media de LRP1, igualmente en células tratadas con Bafilomicina A1 y MG132. Los resultados demostraron que la principal vía de degradación para LRP1 es la degradación lisosomal-autofágica, además que la vida media de LRP1 es de 7.67 ± 0.05 horas y esta se ve incrementada significativamente en presencia de Bafilomicina A1 (22.03 ± 0.05 horas) y se ve disminuida significativamente en presencia de MG132 (7.1 ± 0.1 horas). En conclusión, esta investigación demuestra que el tiempo de acción de LRP1 se puede aumentar mediante la inhibición de su principal vía de degradación y por lo tanto esta acción mejoraría el papel de LRP1 en el organismo, especialmente la internalización de las proteínas dañinas y su posterior degradación.

PALABRAS CLAVE

LRP1, β -amiloide, Sistema de degradación lisosomal, Sistema de proteosoma-ubiquitina, Bafilomicina A1, MG132, tiempo de vida media.



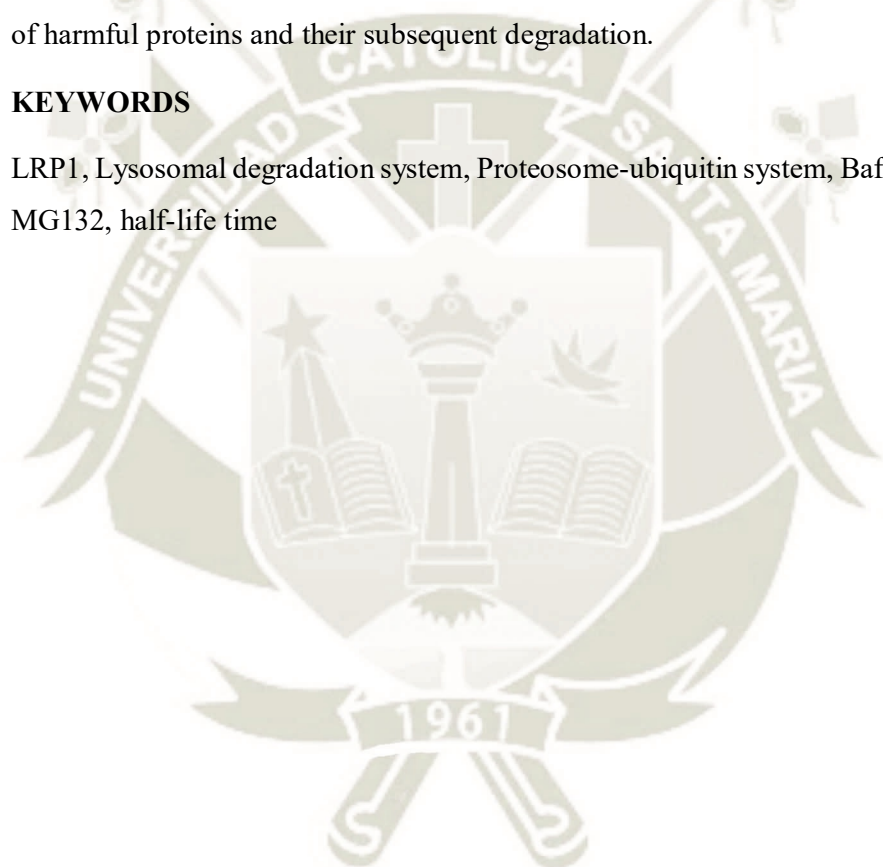
ABSTRACT

Alzheimer's, a neurodegenerative disease in which a cognitive decline occurs, is produced by the overaccumulation of β -amyloid peptide ($A\beta$) in the cortex, either due to an imbalance between the rate of elimination and production or by genetic factors. It is known that the degradation of $A\beta$ at brain level is given by enzymes produced in neurons, neuroglia, among others, and that peripherally the $A\beta$ has a hepatic degradation. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) is an endocytic protein-receptor that is expressed in hepatocytes, neurons, astrocytes, and others. This receptor at the brain level can mediate the exit of $A\beta$ through the blood-brain barrier and it is sLRP1 that transports the $A\beta$ up to the hepatocytes for its degradation, being internalized by LRP1 expressed in hepatocytes. The objective was to determine the main degradation pathway of LRP1 and quantify its half-life in HepG2 cells. The methodology used consisted of first cultivating this type of cells and then treating them with an inhibitor of the lysosomal-autophagic degradation pathway (Bafilomycin A1) and an inhibitor of the ubiquitin-proteasome degradation pathway (MG132). Then, different concentrations of Cycloheximide were tested in order to find the optimal concentration to inhibit the synthesis of proteins in HepG2 cells, to use this concentration in the experiments for the determination of the half-life of LRP1.

Finally, the determination of the half-life of LRP1 was carried out, also in cells treated with Bafilomycin A1 and MG132. The results showed that the main degradation pathway for LRP1 is lysosomal-autophagic degradation, in addition that the half-life of LRP1 is 7.67 ± 0.05 hours and this is significantly increased in the presence of Bafilomycin A1 (22.03 ± 0.05 hours) and is significantly decreased in the presence of MG132 (7.1 ± 0.1 hours). In conclusion, this research shows that the time of action of LRP1 can be increased by inhibiting its main degradation pathway and therefore this action would improve the role of LRP1 in the organism, especially the internalization of harmful proteins and their subsequent degradation.

KEYWORDS

LRP1, Lysosomal degradation system, Proteosome-ubiquitin system, Bafilomycin A1, MG132, half-life time



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de Bafilomicina A1 y MG132 sobre el tiempo de vida media de LRP1 en células HepG2.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la principal vía de degradación de LRP1 en células HepG2.
- Determinar la concentración óptima a la cual la Cicloheximida inhiba la síntesis proteica en células HepG2 sin que sea tóxico para estas.
- Determinar el tiempo de vida media de LRP1 en células HepG2.

HIPÓTESIS

Dado que LRP1, receptor de membrana endocítico expresado en hepatocitos, es responsable de la internalización del péptido β -amiloide para su degradación sistémica; es probable que inhibidores de las principales vías de degradación de proteínas intracelulares como Bafilomicina A1 y MG132 modifiquen el tiempo de vida media de LRP1 y consecuentemente incrementen la degradación de β -amiloide, uno de los causantes de Alzheimer.

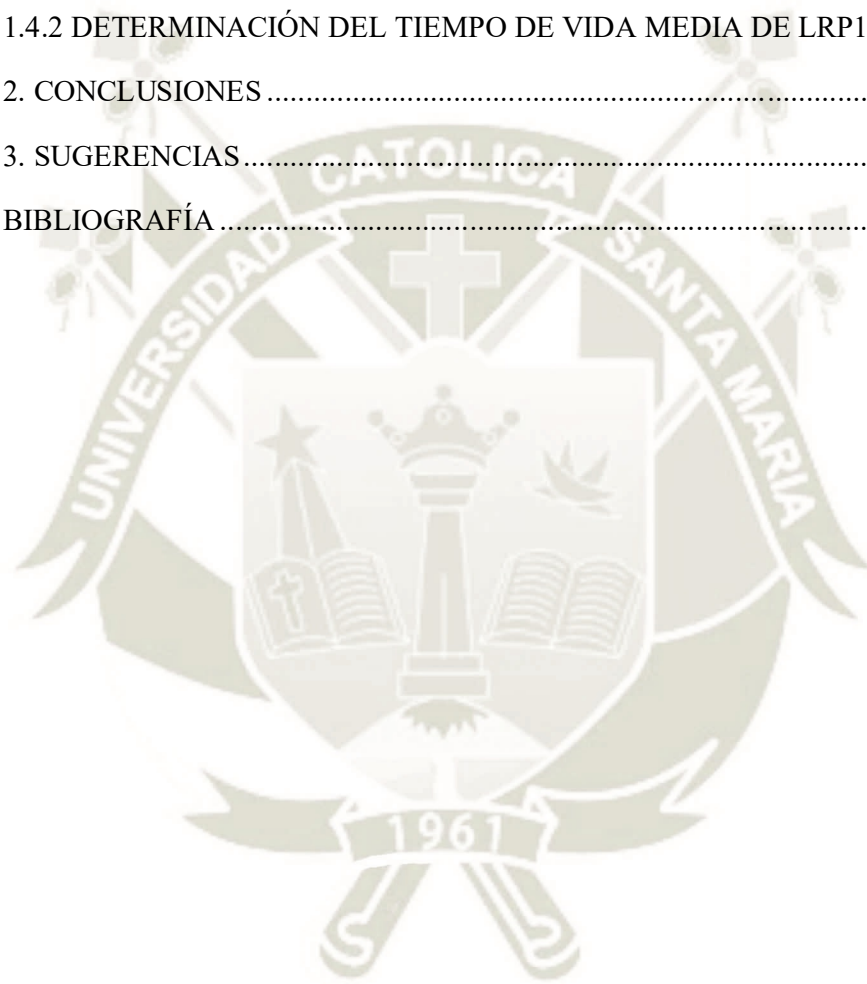
INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
OBJETIVOS	xii
HIPÓTESIS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xviii
ÍNDICE DE FIGURAS	xx
ÍNDICE DE ANEXOS	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xxvii
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	1
1. DEMENCIA	2
1.1 DEFINICIÓN	2
1.2 CLASIFICACIÓN	2
2. ALZHEIMER	4
2.1 DEFINICIÓN	4
2.2 CLASIFICACIÓN	5
2.2.1 INICIO TEMPRANO O FAMILIAR	6
2.2.2 INICIO TARDÍO O ESPORÁDICO	6
2.3 ETIOLOGÍA	6
2.3.1 FACTORES GENÉTICOS	6
2.3.2 HIPÓTESIS DEL ALZHEIMER	7
2.4 SIGNOS CLINICOS DEL ALZHEIMER	14
2.5 TRATAMIENTO DEL ALZHEIMER	14
2.5.1 TRATAMIENTO NO FARMACOLOGICO	15

2.5.2 TRATAMIENTO FARMACOLOGICO	15
3. PROTEÍNA 1 RELACIONADA AL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LRP1).....	18
3.1 DESCRIPCIÓN	18
3.2 ESTRUCTURA	19
3.3 FUNCIÓN	21
3.4 IMPORTANCIA DE LRP1 EN EL ALZHEIMER.....	22
3.5 LRP1 COMO OBJETIVO TERAPÉUTICO PARA ALZHEIMER.....	24
3.6 BIOSÍNTESIS	27
3.7 DEGRADACIÓN	30
3.7.1 DEFINICIÓN	30
3.7.2 CLASIFICACIÓN	30
4. LINEA CELULAR DE CARCINOMA HEPÁTICO (HepG2).....	35
4.1 DESCRIPCIÓN	35
4.2 HEPG2 Y ALZHEIMER.....	36
5. CULTIVO CELULAR.....	36
5.1 DEFINICIÓN	36
6. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	37
6.1 AZUL DE TRIPAN	37
7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	38
7.1 ENSAYO DE BCA.....	38
7.2 WESTERN BLOT	39
CAPÍTULO II METODOLOGÍA	43
1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	44
1.2 INSTRUMENTOS UTILIZADOS	44

1.3 MATERIALES Y REACTIVOS.....	45
1.4 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	47
2. METODOLOGÍA.....	47
2.1 CULTIVO CELULAR.....	48
2.2 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	50
2.3 LISIS CELULAR Y EXTRACCION DE PROTEINAS.....	50
2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA).....	51
2.5 CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LRP1 POR WESTERN BLOT.....	52
2.6 DETERMINACIÓN DE LA PRINCIPAL VÍA DE DEGRADACIÓN DE LRP1.....	54
2.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA Y NO TÓXICA DE CICLOHEXIMIDA PARA CÉLULAS HEPG2.....	55
2.8 DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA DE LRP1 Y EL EFECTO DE BAFILOMICINA Y MG132 SOBRE ESTA.....	55
2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSION	57
1. RESULTADOS Y DISCUSION	58
1.1 CULTIVO CELULAR.....	58
1.2 DETERMINACION DE LA PRINCIPAL VIA DE DEGRADACION DE LRP1 EN CELULAS HEPG2.....	59
1.2.1 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	59
1.2.2 DETERMINACIÓN DE LA PRINCIPAL VÍA DE DEGRADACIÓN DE LRP1	60
1.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA Y NO TÓXICA DE CICLOHEXIMIDA PARA CÉLULAS HEPG2.....	69
1.3.1 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR.....	69

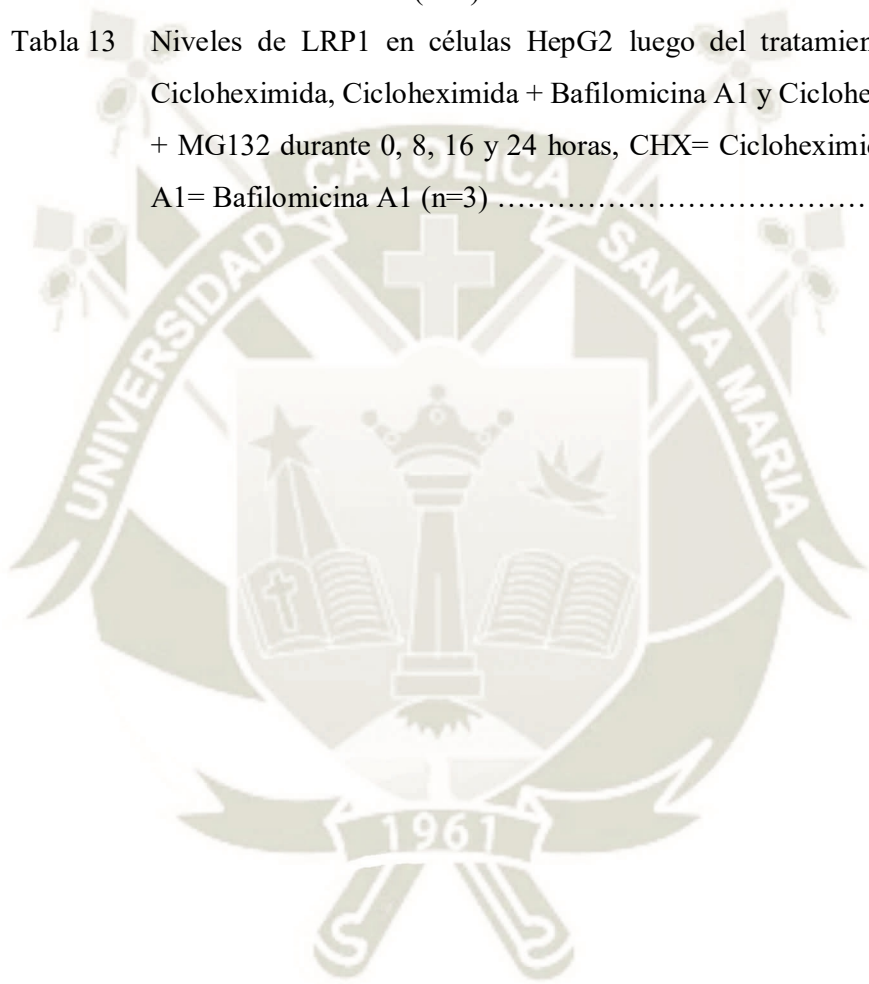
1.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION ÓPTIMA Y NO TÓXICA DE CICLOHEXIMIDA	70
1.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LRP1 Y EFECTOS DE BAFILOMICINA A1 Y MG132 SOBRE ESTE	76
1.4.1 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR	76
1.4.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LRP1.....	77
2. CONCLUSIONES	87
3. SUGERENCIAS.....	88
BIBLIOGRAFÍA	89



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Preparación de los estándares de Albúmina para la curva de calibración	51
Tabla 2	Número de células HepG2 contadas en el Cell Counter para la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	60
Tabla 3	Curva de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego de los tratamientos con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas (n=3)	62
Tabla 4	Cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3)	63
Tabla 5	Niveles de LRP1 expresados en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3)	67
Tabla 6	Número de células HepG2 contadas en el Cell Counter para la determinación de la concentración óptima y no tóxica de Cicloheximida	70
Tabla 7	Curva de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida a 24 horas (n=3)	71
Tabla 8	Cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas (n=3)	72
Tabla 9	Niveles de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida durante 24 horas (n=3)	74
Tabla 10	Número de células HepG2 contadas en el Cell Counter para la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre esta	76
Tabla 11	Curva de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con	

	Cicloheximida, Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas (n=3)	77
Tabla 12	Cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida, Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas, CHX=Cicloheximida, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3)	85
Tabla 13	Niveles de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida, Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas, CHX= Cicloheximida, Baf A1= Bafilomicina A1 (n=3)	91



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Comparación entre un cerebro normal (A) y el cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer (B)	4
Figura 2	Estimación de la incidencia anual de la demencia, específica por edad en diferentes regiones del mundo	5
Figura 3	Hipótesis de la cascada amiloidea	8
Figura 4	Placas neuríticas en la corteza temporal en pacientes de Alzheimer	9
Figura 5	Hipótesis de la proteína Tau	10
Figura 6	Marañas neurofibrilares en pacientes con Alzheimer	11
Figura 7	Hipótesis Colinérgica	12
Figura 8	Hipótesis Glutamatérgica	14
Figura 9	Familia de los receptores de lipoproteína de baja densidad	19
Figura 10	Estructura de LRP1 y principales ligandos	21
Figura 11	LRP1 media la salida de A β del cerebro mediante la barrera hematoencefálica	24
Figura 12	LRP1 como objetivo terapéutico para el Alzheimer	27
Figura 13	Estructura química de Cicloheximida	29
Figura 14	Síntesis de proteínas. Traducción	30
Figura 15	Vía ubiquitina-proteosoma	32
Figura 16	Estructura química de MG132	33
Figura 17	Vía lisosomal-autofágica	34
Figura 18	Estructura química de Bafilomicina A1	34
Figura 19	Células HepG2 a baja y alta densidad	35
Figura 20	Estructura química de azul de tripán	37
Figura 21	Formación del complejo BCA-Cu ⁺¹	39
Figura 22	Electroforesis vertical	40
Figura 23	Método indirecto de detección	41
Figura 24	Procedimiento general de Western Blot	42
Figura 25	Diseño experimental	48
Figura 26	El diseño básico de trabajo en una campana de cultivo celular.....	50
Figura 27	Protocolo de conteo y viabilidad celular	50

Figura 28	Placa de 96 pocillos usado para el BCA	52
Figura 29	Electrotransferencia de proteínas del gel a la membrana	53
Figura 30	Células HepG2 con 80% de confluencia a 40x	59
Figura 31	Graficas de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego de los tratamientos con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas (n=3)	63
Figura 32	Efecto de Bafilomicina A1 y MG132 sobre la concentración de proteínas en células HepG2 a 3, 8, 16 y 24 horas de tratamiento (n=3; p<0.05, ns=no significativo, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet)	64
Figura 33	Western Blot representativo del tratamiento de LRP1 con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3)	66
Figura 34	Efecto de Bafilomicina A1 y MG132 sobre LRP1 en células HepG2 a 3, 8, 16 y 24 horas de tratamiento (n=3; p<0.05, ns=no significativo, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet)	68
Figura 35	Gráfica de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Cicloheximida a 24 horas en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta (n=3)	72
Figura 36	Efecto de Cicloheximida a diferentes concentraciones sobre la concentración de proteínas en células HepG2 con 24 horas de tratamiento para la determinación de la concentración óptima y no tóxica de Cicloheximida (n=3, p<0.05, ns=no significativo, *=diferencia significativa, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet, post t par)	73
Figura 37	Western Blot representativo de los niveles de LRP1 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de Cicloheximida (n=3)	74
Figura 38	Efecto de Cicloheximida a diferentes concentraciones sobre LRP1 en células HepG2 con 24 horas de tratamiento para la determinación de la concentración óptima y no tóxica de Cicloheximida (n=3,	

	p<0.05, ns=no significativo, *=diferencia significativa, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet, post t par)	75
Figura 39	Grafica de calibración de albúmina para la determinación de proteínas en células HepG2 luego de los tratamientos con Bafilomicina A1 y MG132 a 0, 8, 16 y 24 horas (n=3)	78
Figura 40	Efecto del tratamiento con Cicloheximida, Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 sobre la cantidad de proteínas en células HepG2 durante 0, 8, 16 y 24 horas, CHX=Cicloheximida, Baf A1=Bafilomicina A 1(n=3; p<0.05, ns=no significativo, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet)	79
Figura 41	Western Blot representativo de la degradación durante 24 horas de LRP1 con Cicloheximida, tratado con Cicloheximida + Bafilomicina A1 y tratado con Cicloheximida + MG132, CHX=Cicloheximida, Baf A1= Bafilomicina A1 (n=3)	81
Figura 42	Degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepG2	82
Figura 43	Degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepH2 tratadas con Bafilomicina A1	83
Figura 44	Degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepG2 tratadas con MG132	84
Figura 45	Comparación gráfica de degradación de LRP1, tratado con Bafilomicina A1 y tratado con MG132	85

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	111
Anexo 2	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	111
Anexo 3	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	112
Anexo 4	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	112
Anexo 5	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	113
Anexo 6	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	113
Anexo 7	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	114
Anexo 8	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	114

Anexo 9	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	115
Anexo 10	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	116
Anexo 11	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	117
Anexo 12	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1	118
Anexo 13	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta	119
Anexo 14	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta	119
Anexo 15	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta	120
Anexo 16	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 0 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	121
Anexo 17	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la	

	determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	121
Anexo 18	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	122
Anexo 19	Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	122
Anexo 20	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 0 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	123
Anexo 21	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 8 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	123
Anexo 22	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 16 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	124
Anexo 23	Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 24 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este	124
Anexo 24	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 sin tratamiento durante 0, 8, 16 y 24 horas para la determinación del tiempo de vida media de LRP1	125

Anexo 25	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 durante 0, 8, 16 y 24 horas para la determinación del tiempo de vida media de LRP1 afectado por Bafilomicina A1	126
Anexo 26	Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas para la determinación del tiempo de vida media de LRP1 afectado por MG132	127

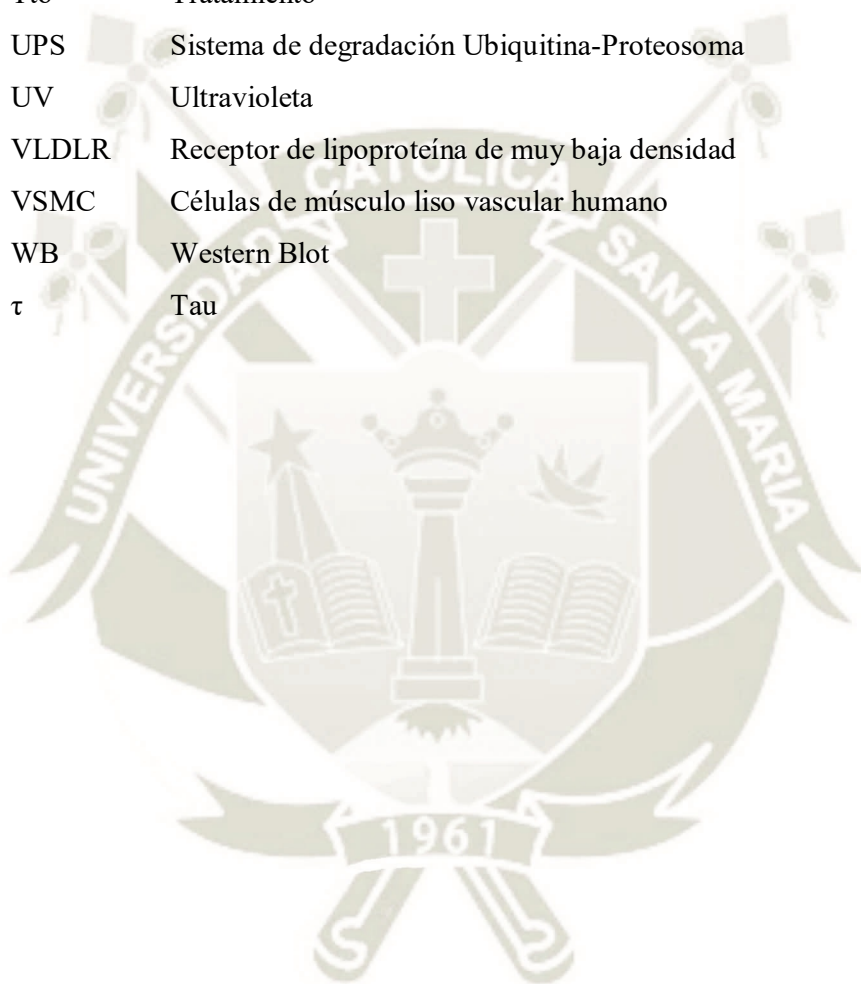


LISTA DE ABREVIATURAS

8HDG	8-hidroxidesoxiguanosina
8HG	8-hidroxiguanosina
A2MR	Receptor de α -2-macroglobulina
ABAD	A β -binding alcohol dehydrogenase
ActD	Actinomicina D
AD	Enfermedad de Alzheimer
ADAM10	Metaloproteinasas que contienen la proteína 10
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ApoE	Apolipoproteína E
APOER	Receptor de la apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloidea
APR	Receptor de la apolipoproteína
ARN-m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN-t	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
A β	Beta amiloide
BAF A1	Bafilomicina A1
BBB	Barrera hematoencefálica
BCA	Ensayo del ácido bicinónico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Enzima colina acetiltransferasa
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CD91	Cluster de diferenciación 91
CHX	Cicloheximida
CIE-10	Clasificación Internacional de Enfermedades, versión 10
CSF	Líquido cefalorraquídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSM-IV	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

FBS	Suero fetal de bovino
FHA	Filamentos helicoidales apareados
FSM	Medio incompleto sin suero
GABA	Acido gamma-aminobutírico
GTP	Guanosín trifosfato
HepG2	Células de carcinoma hepatocelular
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptacion de serotonina
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad
LRP	Proteína relacionada al receptor de lipoproteína
LRP1	Proteína 1 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
LRP2	Proteína 2 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
LRP4	Proteína 4 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
LRP5	Proteína 5 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
LRP6	Proteína 6 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
LRP8	Proteína 8 relacionada al receptor de la lipoproteína de baja densidad
LSM	Medio bajo en suero
MAO-B	Monoaminoxidasa tipo B
MEGF7	Múltiples dominios similares al factor de crecimiento epidérmico 7
MEM	Medio esencial mínimo
MNFs	Marañas Neurofibrilares
M-PER	Reactivo de extracción de proteínas
NMDA	Sistema de receptores N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PBS	Buffer Fosfato Salino
PDFG-R	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta
PN	Placas Neuríticas
PS1	Proteína Presenilina 1
PS2	Proteína Presenilina 2
PSs	Presenilinas
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RAP	Receptor asociado a la proteína
RE	Retículo endoplasmático

RYR	Receptores de rianodina
sLRP1	LRP1 soluble
SOD	Superoxidodismutasa
TBS T	Mezcla de buffer salino tris con Tween 20
tPA	Activador plasminogeno tisular
Tto	Tratamiento
UPS	Sistema de degradación Ubiquitina-Proteosoma
UV	Ultravioleta
VLDLR	Receptor de lipoproteína de muy baja densidad
VSMC	Células de músculo liso vascular humano
WB	Western Blot
τ	Tau





CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. DEMENCIA

1.1 DEFINICIÓN

Es un síndrome clínico en el cual se da una declinación de las funciones superiores, entre ellas la memoria, en relación con un nivel previo de la persona. Adicionalmente se le suma alteraciones psicológicas y de comportamiento, produciéndose así una discapacidad progresiva⁽¹⁾.

1.2 CLASIFICACIÓN

Las demencias se pueden clasificar según la topografía lesional, es decir el lugar donde afecta la demencia, y según la etiología y criterios de la Clasificación Internacional de Enfermedades en su versión 10 (CIE-10) y el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-IV)⁽²⁻⁴⁾.

Según la topografía lesional^(2,5,6):

- Demencias corticales: Aquellas en las cuales se ve afectado la corteza cerebral, dañándose de esta manera las funciones cognitivas que dependen del procesado cognitivo asociado. Entre estas tenemos a la enfermedad de Alzheimer y de Pick.
- Demencias subcorticales: Aquellas en las cuales se ve afectado el estriado, el tálamo, los núcleos del tronco y el cerebelo ya que se da una disminución de la sustancia blanca y gris. Entre las demencias subcorticales más representativas se tiene a la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, lesiones talámicas, encefalopatías, hidrocefalia esclerosis lateral amiotrófica con demencia.
- Demencias mixtas: Aquellas en las cuales se ve afectado tanto la corteza cerebral como las zonas subcorticales. Entre las más importantes se tiene a las demencias multi-infarto, secundaria a infecciones, trauma y anoxia, entre otras.

Según la etiología y criterios de CIE-10 y DSM-IV⁽⁴⁾:

- Demencias degenerativas primarias: Son aquellas demencias que no resultan de otra enfermedad.
 - Demencia tipo Alzheimer
 - ✓ De inicio precoz no complicada
 - ✓ De inicio precoz con ideas delirantes
 - ✓ De inicio precoz con estado de ánimo depresivo
 - ✓ De inicio tardío no complicada
 - ✓ De inicio tardío con ideas delirantes
 - ✓ De inicio tardío con estado de ánimo depresivo
 - Otras demencias degenerativas primarias
 - ✓ Asociada a Enfermedad de Pick
 - ✓ Asociada a Enfermedad de Huntington
 - ✓ Asociada a Enfermedad de Parkinson
 - ✓ Asociada a cuerpos de Lewy
- Demencias secundarias: Son las demencias que ocurren como resultado de otra enfermedad física o lesión.
 - Demencias vasculares
 - ✓ No complicada
 - ✓ Con ideas delirantes
 - ✓ Con estado de ánimo depresivo
 - Otras demencias secundarias
 - ✓ Inducida por el alcohol
 - ✓ Inducida por utilización persistente de inhalantes
 - ✓ Inducida por sedantes, hipnóticos o ansiolíticos
 - ✓ Inducida por utilización persistente de otras sustancias
 - ✓ Asociada a traumatismos craneales
- Demencias combinadas: Son aquellas demencias en las cuales se evidencia una demencia degenerativa primaria y una demencia secundaria.
 - Enfermedad de Alzheimer con enfermedad cerebro vascular asociada.

2. ALZHEIMER

2.1 DEFINICIÓN

Es una enfermedad neurodegenerativa cerebral que es progresiva y que afecta exclusivamente al cerebro. Se caracteriza por presentar lesiones anatomopatológicas típicas; las cuales son las placas neuríticas (PN), formadas por el péptido β -amiloide ($A\beta$) y las marañas neurofibrilares (MNFs), compuestas por fibrillas entrelazadas conocidas como filamentos helicoidales apareados (FHA) donde su mayor constituyente es la proteína tau (τ)^(7,8).

Estas lesiones que son detectadas a nivel microscópico repercuten en la fisiología y anatomía del cerebro como se muestra en la Figura 1 en la cual los surcos cerebrales se encuentran ensanchados al abrir parcialmente las meninges o membranas de cerebro de pacientes que padecieron Alzheimer⁽⁵⁾.

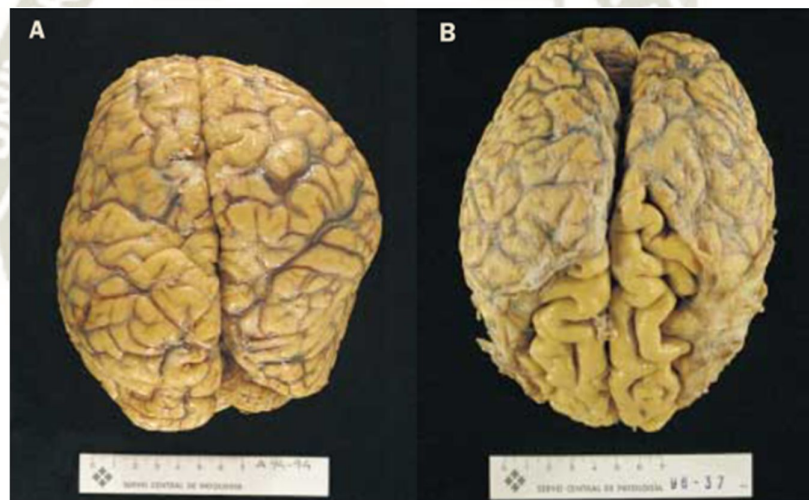


Figura 1. Comparación entre un cerebro normal (A) y el cerebro de un paciente con enfermedad de Alzheimer (B)⁽⁵⁾

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo hay aproximadamente 50 millones de personas que padecen demencia, y cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos. La enfermedad de Alzheimer, que es la forma más común de demencia, tiene una prevalencia entre un 60% y un 70% del total de casos de demencia⁽⁹⁾.

En el año 2013, la OMS publicó la estimación de la incidencia anual de la demencia específica por edad en diferentes regiones del mundo, la cual se puede visualizar en la

Figura 2. Así, se observa una mayor incidencia por parte de países de ingresos altos y una menor incidencia para América Latina y países de bajos ingresos, así como también la mayor incidencia está en un grupo etario mayor a 90 años⁽¹⁰⁾.

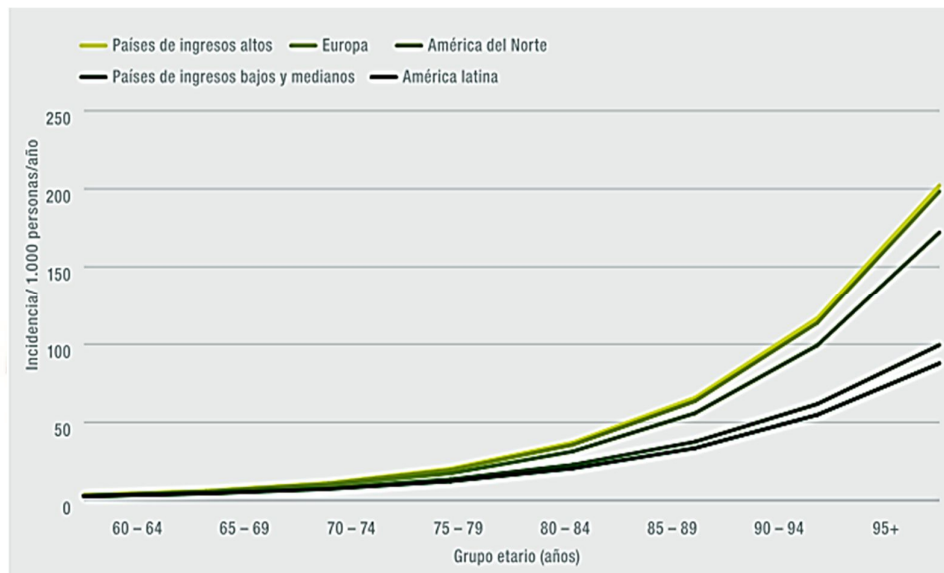


Figura 2. Estimación de la incidencia anual de la demencia, específica por edad en diferentes regiones del mundo⁽¹⁰⁾

Otro estudio estimó que en el 2005, 0.38% de la población mundial padecía de demencia, y que la prevalencia se incrementó a 0.44% en el 2015 y se incrementaría a 0.56% para el 2030⁽¹¹⁾. Otro estima que, en el 2006, el 0.40% de la población mundial fueron afectados con la enfermedad de Alzheimer, y que la prevalencia se triplicará y hasta se cuadruplicará para el 2050⁽¹²⁾.

En abril del 2011, el neurólogo Danilo Sánchez Coronel del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) del Ministerio de Salud del Perú, indicó que esta enfermedad afectaba ya a más de 200 mil peruanos. Asimismo, que el 1% de la población de 60 años padece Alzheimer, en los adultos mayores de 60 a 65 años es el 2%; mientras que en los mayores de 65 años a 70 años es del 4%; porcentaje que sube a 8% si es mayor de 70 años; en tanto que en personas mayores de 75 años llega al 16%⁽¹³⁻¹⁵⁾.

2.2 CLASIFICACIÓN

La clasificación que se maneja en la gran mayoría de laboratorio, hospitales y centros de salud sobre la enfermedad de Alzheimer es la siguiente⁽¹⁶⁾:

2.2.1 INICIO TEMPRANO O FAMILIAR

Representa entre el 5 al 10% del total de casos y se debe principalmente a la mutación o trastornos de tres genes diferentes, que se ubican en los cromosomas 1, 14 y 21, que codifican para la presenilina 2, presenilina 1 y para la proteína precursora de amiloide respectivamente⁽¹⁶⁾.

2.2.2 INICIO TARDÍO O ESPORÁDICO

Representa entre el 90-95% del total de casos, es la forma esporádica (aparición tardía o senil). Se presenta después de los 65 años y responde a una serie de factores de riesgo de diferente naturaleza como son el envejecimiento, susceptibilidad genética y ambiente, entre otros⁽¹⁶⁾.

2.3 ETIOLOGÍA

2.3.1 FACTORES GENÉTICOS

Se han encontrado tres genes directamente implicados para esta enfermedad^(6,16,17):

- El gen que codifica para la proteína precursora de amiloide (APP) que se ubica en el cromosoma 21.
- El gen que codifica para la proteína presenilina 1 (PS1) localizado en el cromosoma 14 (al menos 5 anomalías).
- El gen que codifica para la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1.

La APP está íntimamente relacionado con la producción del $A\beta$. Las mutaciones presentes en el gen se localizarían cerca de los sitios reconocidos por las α , β y γ secretasas, afectando el procesamiento de esta proteína y causando la sobreproducción de fragmentos amiloideos largos con respecto a los cortos, produciendo de esta manera el evento primario desencadenante según la hipótesis de la cascada del $A\beta$ ^(5,18). Las presenilinas (PSs) son proteínas integrales de membranas y se localizan en el cuerpo de las neuronas y dendritas. Ambas presenelinas interactúan con otras proteínas formando un complejo macromolecular que contiene la actividad de la γ -secretasa, que es la que regula, entre otras, la proteólisis intramembranal de la APP, por lo que su mutación termina afectando nuevamente la producción normal de $A\beta$ ^(19,20).

2.3.2 HIPÓTESIS DEL ALZHEIMER

La identificación de los genes implicados en el Alzheimer ha impulsado el establecimiento de diferentes corrientes de opinión científica formalizadas como hipótesis que tratan de explicar las causas y el mecanismo, siendo la hipótesis de la cascada amiloidea la más estudiada y aceptada hasta la actualidad, siendo acompañada de otras hipótesis como la hipótesis de la proteína tau, hipótesis colinérgica, hipótesis glutamatérgica⁽²¹⁾.

2.3.2.1 HIPÓTESIS DE LA CASCADA AMILOIDEA

El A β es un péptido de peso aproximado de 4 kDa que se forma por la proteólisis de la APP, que es una glicoproteína transmembrana. La APP es cortada por la β -secretasa y γ -secretasa sucesivamente para formar el A β . Por lo tanto, existen numerosas especies diferentes de A β , pero las que terminan en la posición 40 (A β 40) son las más abundantes (~80-90%), seguidas por 42 (A β 42, ~5-10%). Las formas ligeramente más largas de A β , particularmente A β 42, son más hidrófobas y fibrilógenas, y son las principales especies depositadas en el cerebro^(22,23).

En estados fisiológico, el A β tiene funciones en el organismo que son importantes tales como la activación de quinasas, protección contra estrés oxidativo, regulación del transporte de colesterol, actuando como un factor de transcripción, en la actividad antimicrobiana, entre otras. Sin embargo en estados patológicos la acumulación excesiva de este péptido produce degeneración de células, degeneración cognitiva, hiperfosforilación de la proteína τ , estrés oxidativo, entre otras⁽²⁴⁻³⁰⁾.

Esta hipótesis se basa en la acumulación del péptido A β insoluble que tiende a agregarse en forma plegada formando las placas neuríticas debido a anomalías genéticas en los genes que codifican para las presenilinas tanto 1 y 2 como la APP y a la deficiente tasa de eliminación. Este desequilibrio es tóxico para el sistema nervioso central y desencadena todos los demás síntomas (como se observa su participación en todo el proceso de la cascada amiloidea en la Figura 3)⁽³¹⁾.

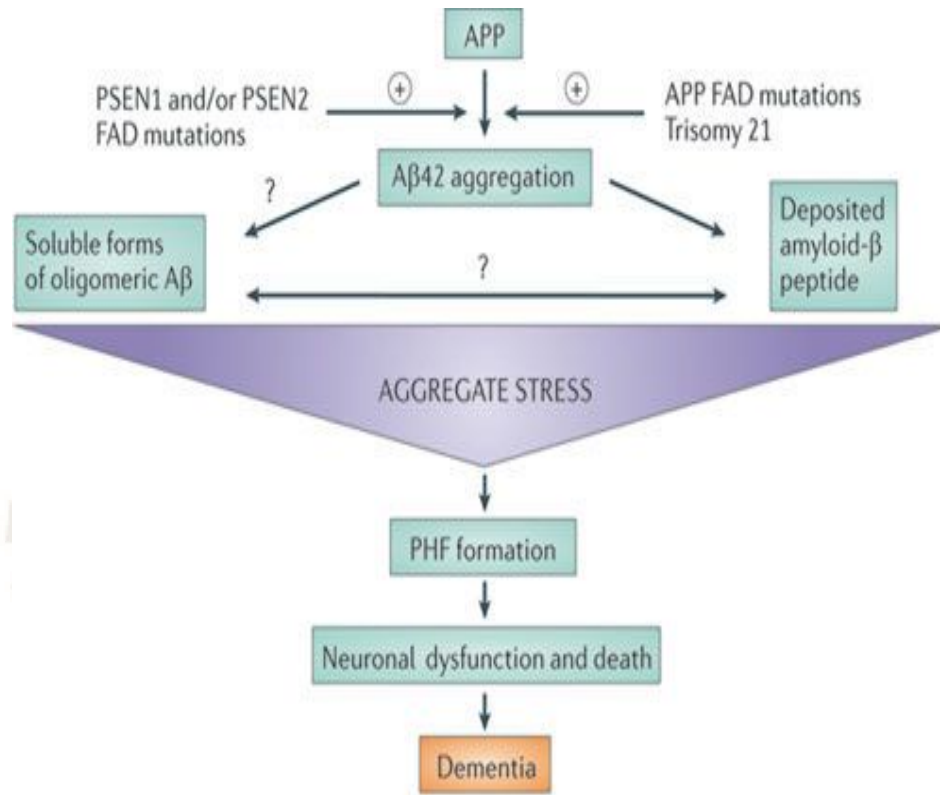


Figura 3. Hipótesis de la cascada amiloidea⁽³²⁾

Las placas neuríticas son aquellas lesiones de ubicación extracelular que se encuentra principalmente en el córtex. Las placas neuríticas están conformadas por un centro compacto de A β y rodeadas por prolongaciones de neuritas distróficas, astrocitos y microglías, que la encapsulan⁽³³⁾.

Los depósitos amiloide sin el componente neurítico se encuentra normalmente en el cerebro de ancianos normales y son las llamadas placas seniles, estas no producen la enfermedad, pero si son un factor de riesgo alto para padecerla⁽³⁴⁾. En la Figura 4, utilizando la técnica de inmunomarcaje, se observan las placas neuríticas en la neocorteza temporal de pacientes con Alzheimer. En la sección A se puede observar las placas seniles en abundancia, en la sección B con una mayor ampliación se puede observar en las flechas la naturaleza fibrilar de los depósitos difusos de A β y en la sección C se muestra placas neuríticas con núcleo (*) teñidas en una combinación de tinción de Gallyas-silver para material neurofibrilar (marrón) e inmunquímica para el depósito amiloideo (negro)⁽³⁵⁾.

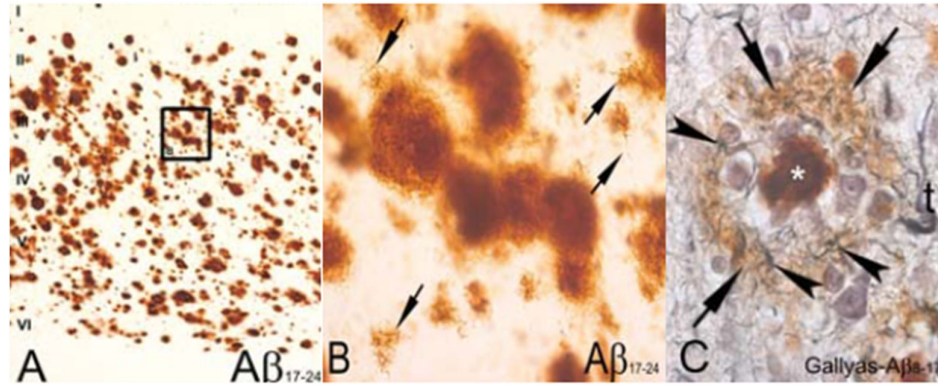


Figura 4. Placas neuríticas en la corteza temporal en pacientes de Alzheimer⁽³⁵⁾

Se desconoce el mecanismo de toxicidad mediante el cual las placas neuríticas podrían hacer daño, pero se cree que podrían darse las siguientes formas para dañar las neuronas⁽³⁶⁾:

- Activar la microglía, ya que esta es un componente importante del sistema inmune del cerebro y se ha comprobado que participa en la inducción de la muerte de numerosas células y en la eliminación de terminales sinápticas, entre otros.
- Activar la respuesta inflamatoria con liberación de citoquinas neurotóxicas, las cuales generarían daño oxidativo (oxidación proteica, peroxidación lipídica, formación de especies reactivas de oxígeno, estimulación de óxido nítrico sintetasa, alteración mitocondrial y otros) que inducen mecanismos de apoptosis en las neuronas por lo cual se pierde las sinapsis interneuronales.
- Interferir en la perfusión normal, afectando los contactos sinápticos interneuronas por los depósitos de A β en los vasos cerebrales.
- El péptido A β también puede unirse a metales, lo cual induciría el cambio conformacional hacia la sábana β -plegada, lo que resultaría en un aumento de su agregación
- Inhibir el sistema glutamatérgico modificando la acción de la glutamina sintetasa, enzima que cataliza la conversión del glutamato a glutamina. A su vez el glutamato potencia la toxicidad del A β .

2.3.2.2 HIPÓTESIS DE LA PROTEÍNA TAU (τ)

Tau es una proteína de unión a microtúbulos, la cual en estado fisiológico se une a otra proteína intracelular, la tubulina, participando en la formación y estabilización de los microtúbulos, los cuales están vinculados con el transporte intracelular y el mantenimiento de la estructura de la célula. La función de la estabilización de los microtúbulos la lleva a cabo mediante un equilibrio entre ciclos de fosforilación y desfosforilación. Además, la proteína tau ayuda en el transporte de vesículas y organelas⁽³⁷⁻³⁹⁾.

Esta hipótesis se basa en que la proteína tau (τ) en estados patológicos se encuentra hiperfosforilada por diferentes razones como son la alteración intracelular de calcio, mutaciones genéticas u otras, lo cual causa una desestabilización en el citoesqueleto y por consecuencia se da una agregación de la proteína tau. Por consiguiente, la proteína tau precipita formando FHA y adoptando una conformación de lámina β para luego formar las MNF que causan un daño sináptico y neuronal. En la Figura 5 se describe la participación de la proteína τ en el desarrollo de MNFs^(40,41).

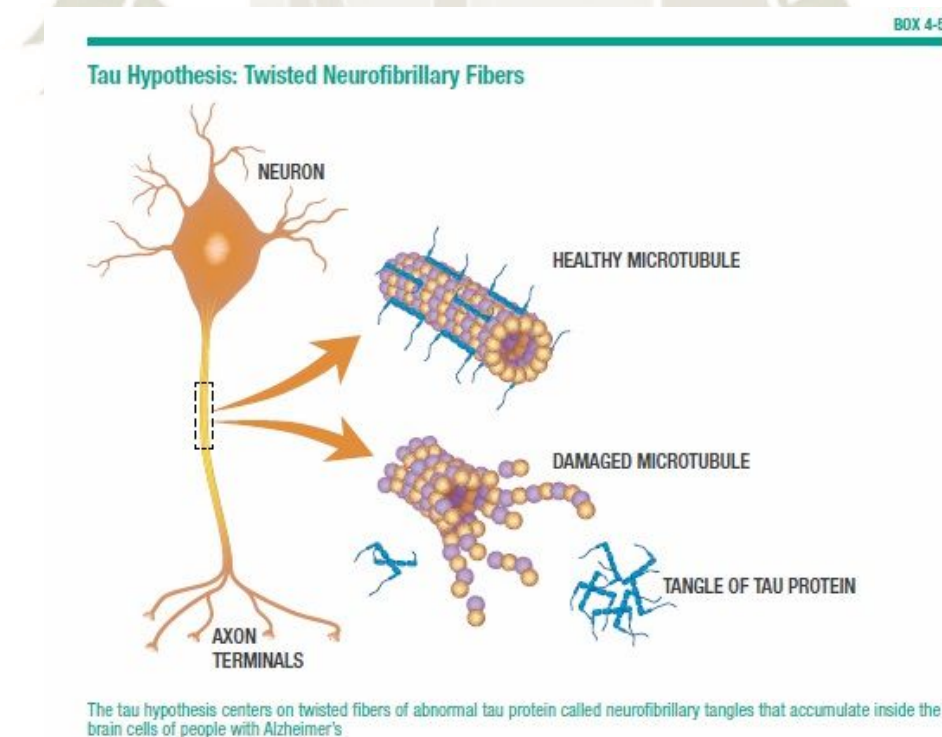


Figura 5. Hipótesis de la proteína Tau⁽⁴²⁾

Las MNF consisten principalmente en FHA precipitados de ubicación intracelular y extracelular (cuando la célula ya está muerta) y afectan principalmente a grandes neuronas piramidales⁽²¹⁾. En la Figura 6 se puede observar la acumulación anormal de la proteína τ y también MNFs en la corteza temporal de pacientes con Alzheimer. En la sección D se observa por la tinción argéntica Gallyas las MNF, habiendo una gran conglomeración en las células piramidales III y V, en la sección E se observa ya a la proteína tau fosforilada, en la sección F y G se observa con las flechas las MNF y con las cabezas de flechas se indican los FHA⁽³⁵⁾.

Los FHA son polímeros organizados como un filamento doble helicoidal enrollado sobre sí mismo y consiste en dos partes⁽⁴³⁻⁴⁷⁾:

- Un núcleo altamente insoluble y que corresponde a la región de segmentos repetidos del extremo carboxilo de la proteína tau que funciona como dominio de unión a los microtúbulos.
- Una cubierta soluble que contiene moléculas de tau completas, muchas de las cuales se encuentran hiperfosforiladas.

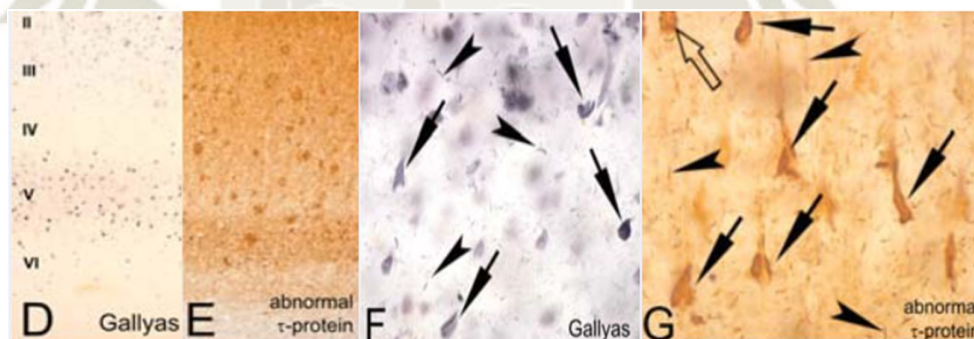


Figura 6. Marañas neurofibrilares en pacientes con Alzheimer⁽³⁵⁾

2.3.2.3 HIPÓTESIS COLINÉRGICA

Esta hipótesis se basa en el déficit colinérgico, específicamente del neurotransmisor acetilcolina, que se da por la disminución de la enzima que la sintetiza la cual es la colina acetiltransferasa (CAT) y receptores colinérgicos alterados, esto hace que no se unan a la acetilcolina. Todo esto provoca un cuadro clínico en el que se evidencia la pérdida de las capacidades cognitivas de las personas que padecen esta enfermedad de Alzheimer. Se puede observar en la Figura 7 una comparación entre la sinapsis de

neuronas normales y neuronas afectadas por la disminución de CAT y receptores alterados^(48,49).

Basándose en los mecanismos bioquímicos de la sinapsis, se están desarrollando las siguientes estrategias terapéuticas: precursores de acetilcolina, agonistas nicotínicos, liberadores de neurotransmisores, agonistas muscarínicos M1 o antagonistas muscarínicos M2 e inhibidores de acetilcolinesterasa. Actualmente los fármacos actúan por este último mecanismo, tal es el caso de tacrina, donepezilo y rivastigmina⁽⁵⁰⁾.

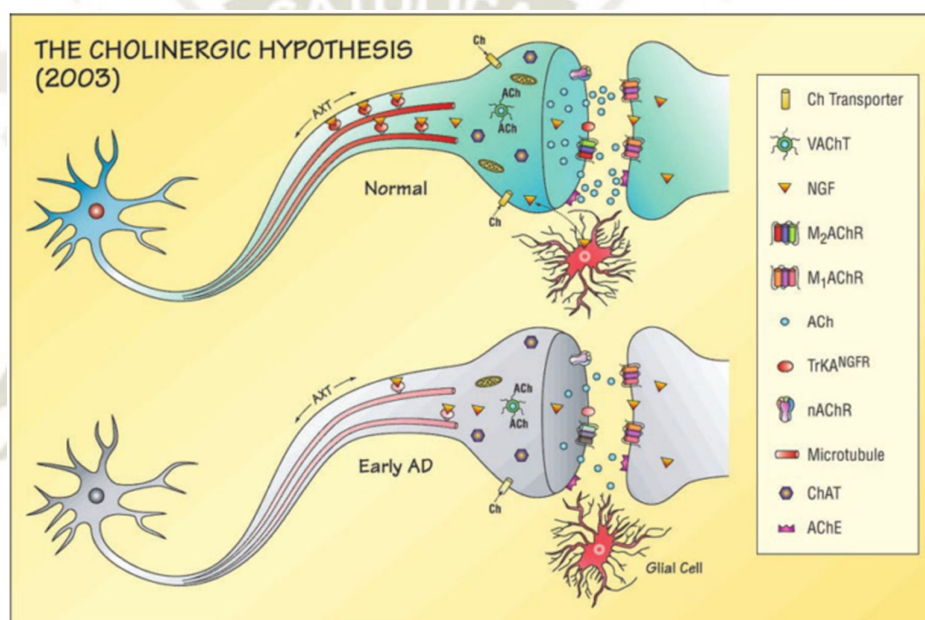


Figura 7. Hipótesis Colinérgica⁽⁵¹⁾

2.3.2.4 HIPÓTESIS GLUTAMATÉRGICA

El sistema de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), se va haciendo marcadamente hipofuncional con la edad ya que se da la pérdida de neuronas glutamatérgicas, disminución del árbol dendrítico y disminución del tamaño celular^(52,53).

Se considera que este estado previo de hipofuncionalidad en el envejecimiento, tiene que ver principalmente con^(54,55):

- El estrés oxidativo, ya que se ha demostrado que afecta la glucólisis.
- Las alteraciones metabólicas vinculadas a la producción de energía celular, debido a que producen hipersensibilidad, ya que interfieren con el

mecanismo voltaje dependiente por el cual el magnesio normalmente inhibe el pasaje de calcio y de sodio a través del canal iónico dependiente del receptor NMDA.

En la enfermedad de Alzheimer, se postula que existen factores adicionales que actuarían como un catalizador o promotor del estado hipofuncional de los receptores NMDA (GLAST, GLT-1, EAAC-1, EEAT4 y EEAT5) con un efecto más devastador. Dentro de estos factores, en el Alzheimer esporádico, puede mencionarse el gen de la apolipoproteína E-4, o en el caso del Alzheimer familiar, las mutaciones amiloideas. Se cree que estos factores aceleran la agregación de los depósitos de β -amiloide y que éste aumenta la sensibilidad de los receptores NMDA, de tal forma que son destruidos llegando al estado de hipofuncionalidad del sistema y por ende a la neurodegeneración (Figura 8)^(53,56).

En condiciones fisiológicas, el glutamato es convertido en ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitorio, por la enzima glutamato descarboxilasa. En el Alzheimer, la neurotransmisión gabaérgica podría estar incrementada por el aumento de la enzima que sintetiza GABA, con la resultante degeneración de los sistemas neuronales⁽⁵⁷⁾.

Primero, se produce el depósito de β -amiloide en bajas concentraciones en el cerebro e interacciona con receptores NMDA, determinándose así un aumento de la sensibilidad por parte de los receptores al glutamato, ya que estas neuronas glutamatérgicas son hiperestimuladas por el glutamato endógeno, y luego se degeneran y se forman placas que incorporan porciones de neuronas, las cuales degeneran otros procesos gliales^(58,59).

Luego, cuando la pérdida de neuronas inhibitorias con receptores NMDA es considerable se desencadena un síndrome de desinhibición excitotóxica, consecuentemente aparecen trastornos cognitivos por la afectación de las neuronas corticolímbicas que sirven a esas funciones. La hiperactivación aberrante inicial, y la degeneración y muerte posterior de estas neuronas con la evolución del proceso, afecta a las funciones cognitivas servidas por ellas. Mientras las neuronas se degeneran, van produciéndose ovillos neurofibrilares sobre la base de excesiva activación de segundos

mensajeros asociados con receptores muscarínicos, glutamatérgicos no NMDA o ambos^(57,60).

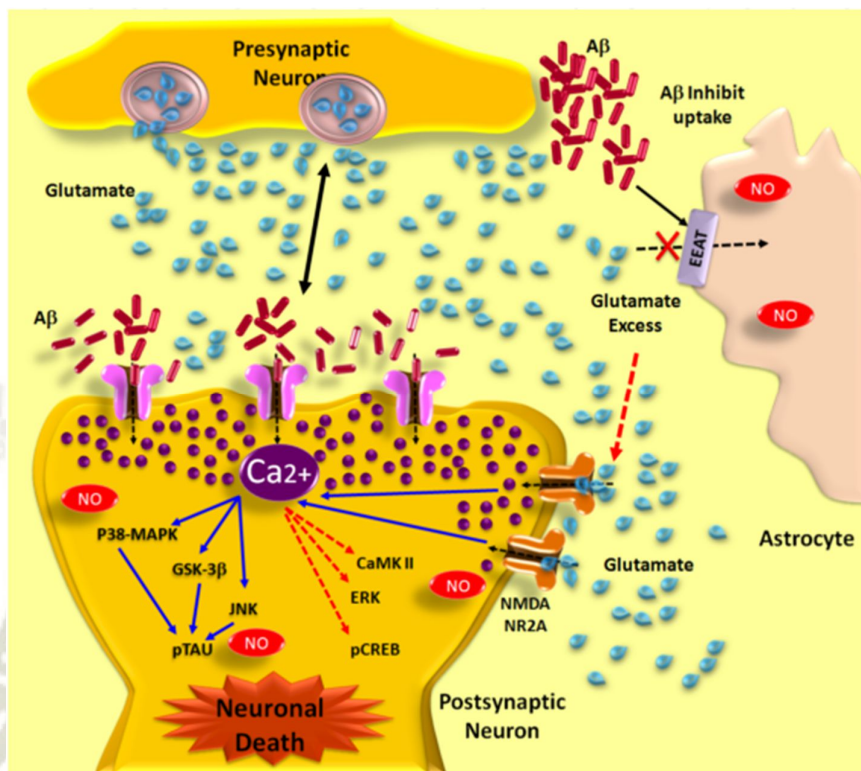


Figura 8. Hipótesis Glutamatérgica⁽⁶¹⁾

2.4 SIGNOS CLINICOS DEL ALZHEIMER

El cuadro clínico que se puede observar en un paciente con Alzheimer tiene como principales signos al deterioro mental, pérdida de memoria, alteración de lenguaje, desorientación temporo-espacial, déficit en la esfera emocional, depresión, ansiedad, disfunción acineto-rígido, trastornos en la marcha, entre otros^(6,62-64).

2.5 TRATAMIENTO DEL ALZHEIMER

Es importante mencionar que actualmente no existe cura para el Alzheimer, y que aún se está estudiando diferentes alternativas para poder dirigir medicamentos a nivel molecular en base a la etiología conocida hasta hoy para que tengan una mejor eficacia y poder disminuir los síntomas. El tratamiento del Alzheimer se da tanto con una terapia farmacológica como con un tratamiento no farmacológico. El objetivo del tratamiento farmacológico es disminuir y amenguar los síntomas y así poder mantener las funciones cognitivas; y el tratamiento no farmacológico va dirigido a dar un soporte

médico, social y afectivo al paciente con Alzheimer, a la familia y a los cuidadores para así evitar la progresión de la enfermedad y la aparición de complicaciones^(6,65).

2.5.1 TRATAMIENTO NO FARMACOLOGICO

El tratamiento no farmacológico para la enfermedad de Alzheimer tiene 2 objetivos principalmente:

- El mantenimiento de las funciones cognitivas, la cual se logra a través de programas enfocados en mantener a la persona con demencia de manera activa (terapia de orientación de la realidad, terapia de reminiscencia, rehabilitación de memoria, ayudas de memoria electrónica y no electrónicas, entre otras), para que de esta manera se estimule aquellas áreas que todavía están conservadas para enlentecer el declive cognitivo⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.
- El crear un ambiente agradable y seguro para mantener la calidad de vida del enfermo. En el tratamiento de los pacientes es recomendable intentar ponerse siempre en su lugar, es decir ser asertivo. Consejos como mantener la comunicación con un tono cuidadoso, usar frases cortas y simples, mantener la seguridad física del paciente, ser comprensivo y tolerante con el paciente, evitar discusiones sin sentido, ser atentos y empáticos, entre otros ayudarán a mantener una muy buena relación con los pacientes^(65,68-70).

2.5.2 TRATAMIENTO FARMACOLOGICO

2.5.2.1 FARMACOS DESTINADOS A MANTENER LAS FUNCIONES COGNITIVAS

- **INHIBIDORES DE LA ACETILCOLINESTERASA:** En la enfermedad de Alzheimer se ha demostrado que existe una relación directa entre el déficit colinérgico cerebral y el deterioro cognitivo. En tal sentido se justifica el uso de fármacos, como son la tacrina, donezepilo, rivastigmina y galantamina, que actúan sobre la acetilcolinesterasa (enzima que degrada la acetilcolina) de manera inespecífica para inhibirla. Otros fármacos actúan sobre la butilcolinesterasa, es decir la inhiben, de manera que consiguen aumentar la concentración de acetilcolina disponible para las sinapsis

y consecuentemente esto mejora la función cognitiva. Sin embargo, estos medicamentos también actúan a nivel periférico, produciendo alteraciones relacionadas como la hiperestimulación muscarínica periférica, que da lugar a efectos adversos como son las náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal e hipersecreción glandular, entre otros⁽⁶⁵⁾.

- **ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES NMDA:** En la enfermedad de Alzheimer se ha demostrado que hay una excesiva concentración de glutamato y una alta sensibilidad de sus receptores lo cual ocasiona una hiperfunción glutamatérgica. Esto a su vez ocasiona una sobrecarga de calcio en el interior de la neurona lo cual ocasiona un daño grave para esta, produciendo su degeneración. Uno de los receptores postsinápticos que estimula el glutamato es el receptor NMDA, el cual interviene en los procesos de formación de la memoria y por lo tanto en la fisiopatología de este tipo de demencia. El fármaco, memantina es un antagonista reversible no competitivo, dependiente del voltaje y de afinidad moderada para el receptor NMDA. Al ser este fármaco dependiente del voltaje, cuando se produce una alta despolarización en la formación de memoria, este se ve desalojado del receptor; no interfiriendo en estos procesos y actuando más bien como neuroprotector y consolidador de la memoria. Pero en despolarizaciones más livianas, es decir patológicas, este fármaco permanece sobre el receptor NMDA, bloqueándolo y así impidiendo la entrada continua de calcio y por consecuente evitando la apoptosis y muerte neuronal^(6,65,71,72).

2.5.2.2 FARMACOS PARA EL CONTROL DE LOS SINTOMAS NEUROPSIQUIATRICOS, AFECTIVOS Y CONDUCTUALES

- **NEUROLEPTICOS:** Se usan estos fármacos para mejorar la hostilidad, excitabilidad, falta de cooperación, alucinaciones, entre otros. Al llegar al cerebro ocupan los receptores del neurotransmisor conocido como dopamina (receptores dopaminérgicos D2) y en algunos casos los receptores serotoninérgicos 5HT2A. La dosis para

usarse se ajusta de acuerdo con el cuadro clínico del paciente, su deterioro mental y emocional, ya que los efectos adversos más comunes de este tipo de fármacos son el deterioro cognitivo y reacciones extrapiramidales. Los neurolépticos más usados son haloperidol, risperidona, olanzapina, levopromazina⁽⁷³⁻⁷⁶⁾.

- **ANTIDEPRESIVOS:** Existe entre un 20-30% de casos en que los pacientes con Alzheimer sufren depresión. Cuando la depresión es leve, se puede tratar con psicoterapia pudiendo ser eficaz y suficiente. Sin embargo, cuando no hay respuesta a este tipo de terapia o es una depresión de mayor grado, se acude a los antidepresivos tricíclicos o inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). Se elige a los ISRS para los pacientes con este tipo de demencia ya que los tricíclicos tienen mayores efectos anticolinérgicos. Entre los más antidepresivos más conocidos tenemos: citalopram, fluoxetina, fluvoxamina, sertralina, paroxetina. Los inhibidores de la MAO no se usan por las potenciales interacciones medicamentosas que posee⁽⁷⁷⁻⁸⁰⁾.
- **ANSIOLITICOS:** Estos fármacos son necesarios para controlar los síntomas de ansiedad psíquica y somática que puedan tener las personas con Alzheimer. Se debe tener en cuenta que su uso prolongado daña las funciones cognitivas y por lo tanto aparecen los efectos adversos.
 - **BENZODIACEPINAS:** Las de elección para el Alzheimer son las de vida media corta como el lorazepam y oxacepam o las de acción intermedia como alprazolam. Estas presentan una alta tasa de efectos adversos como ataxia, confusión, sedación excesiva, y en algunos casos ansiedad⁽⁸¹⁾.
 - **BUSPIRONA:** Es un fármaco bien tolerado, se administra dos veces por semana para obtener una buena eficacia. Como efectos adversos se puede citar: mareos, fatiga, cefalea. Se

debe tener especial cuidado cuando se asocia con ISRS ya que puede aparecer el síndrome serotoninérgico⁽⁸²⁻⁸⁴⁾.

- ANTICONVULSIVANTES: Su uso se justifica debido a la agitación y manías asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Los fármacos de elección son la carbamazepina y ácido valproico. Los efectos adversos que aparecen son las alteraciones hematológicas, sedación, disfunción hepática, y alteraciones hidroelectrolíticas^(8,71,81).
- TRAZODONA: Ha demostrado efectividad en el tratamiento de la agitación en pacientes con demencia. Los efectos adversos que puede provocar son sequedad de boca, hipotensión postural y sedación⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾.

3. PROTEÍNA 1 RELACIONADA AL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD (LRP1)

3.1 DESCRIPCIÓN

También llamado proteína 1 relacionada al receptor de lipoproteína (LRP), LRP1A, receptor de α -2-macroglobulina (A2MR), receptor de la apolipoproteína (APR), receptor de la apolipoproteína E (APOER), o cluster de diferenciación 91 (CD91). Es una proteína-receptor perteneciente a la familia de los receptores lipoproteicos de baja densidad (LDLR, LRP1, LRP1B, megalina/LRP2, MEGF7/LRP4, VLDLR, ApoER2/LRP8, SorLA/LR11, LRP5, LRP6) (Figura 9), que se encuentra en la membrana plasmática de un gran panel de células (fibroblastos, células de músculo liso, neuroglías, neuronas, astrocitos, hepatocitos, macrófagos) envueltas en la endocitosis y otros procesos. Esta proteína-receptor es esencial en el desarrollo embrionario, ya que se comprobó que su delección en animales de experimentación es letal. La proteína-receptor LRP1 está codificado por el gen LRP1 ubicado en el cromosoma 12q13.3⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾.

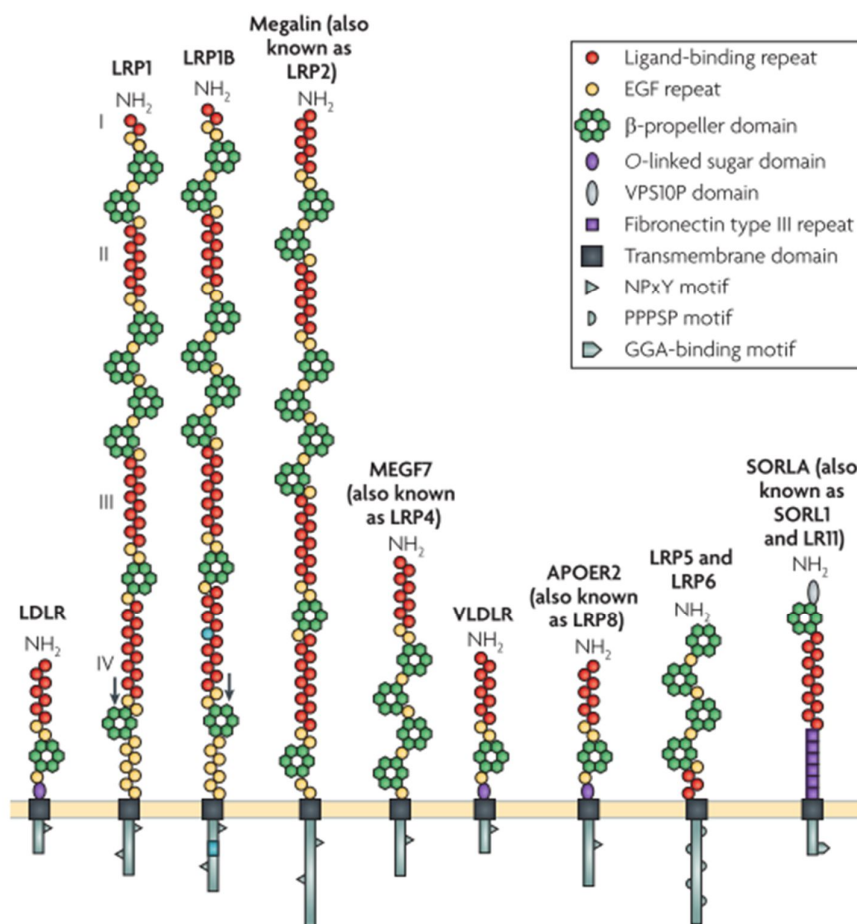


Figura 9. Familia de los receptores de lipoproteína de baja densidad⁽⁹¹⁾

LRP1 es una proteína clave para la señalización de varios procesos como el metabolismo de lípidos, de la glucosa e insulina en algunos tejidos, de complejos entre activadores de plasminógeno y sus inhibidores endógenos, también está implicado en la fagocitosis de células apoptóticas. Puede modular eventos celulares, como el metabolismo de la APP, degradación de A β en el hígado y cerebro, la señalización intracelular dependiente de la quinasa, la señalización neuronal del calcio, así como la neurotransmisión; entre otras funciones que están en actual estudio⁽⁹²⁻⁹⁴⁾.

3.2 ESTRUCTURA

El gen de LRP1 codifica la proteína LRP1 que es sintetizada como una proteína transmembrana glicosilada de 600 kDa. para ser transformada en una molécula de dos partes durante su maduración por una furina en el complejo trans Golgi. Las dos partes

están unidas no covalentemente por medio de la parte extracelular (Figura 10). El receptor maduro incluye⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾:

- Una cadena α extracelular de 515 kDa, la cual comprende cuatro dominios de unión a ligandos (numerados I-IV) que contienen dos, ocho, diez y once repeticiones de tipo complemento enriquecidas con cisteína, respectivamente. Estas repeticiones se unen a proteínas de la matriz extracelular, factores de crecimiento, proteasas, complejos de inhibidores de proteasas y otras proteínas implicadas en el metabolismo de las lipoproteínas. De los cuatro dominios, el II y IV se unen a la mayoría de los ligandos de la proteína.
- Una cadena β de 85 kDa, conteniendo una corta extensión extracelular, el dominio único de transmembrana y un dominio de 100 aminoácidos intracelular (ICD). Este dominio contiene dos motivos NPxY que son responsables de la función de la proteína en la endocitosis y la transducción de señales.

Cabe resaltar que a nivel periférico quien tiene actividad para con el $A\beta$ es el LRP1 soluble (sLRP1), el cual es originado por la escisión mediante la enzima β -secretasa sobre LRP1 como se muestra en la Figura 10. sLRP1 circula en el plasma para que a nivel periférico se pueda unir a los ligandos, en este caso $A\beta$ para llevarlo a la degradación sistémica en el hígado; mientras que LRP1 como receptor se encuentra funcional en los diferentes tejidos mencionados para la internalización del mencionado $A\beta$ para su posterior degradación⁽⁹⁸⁾.

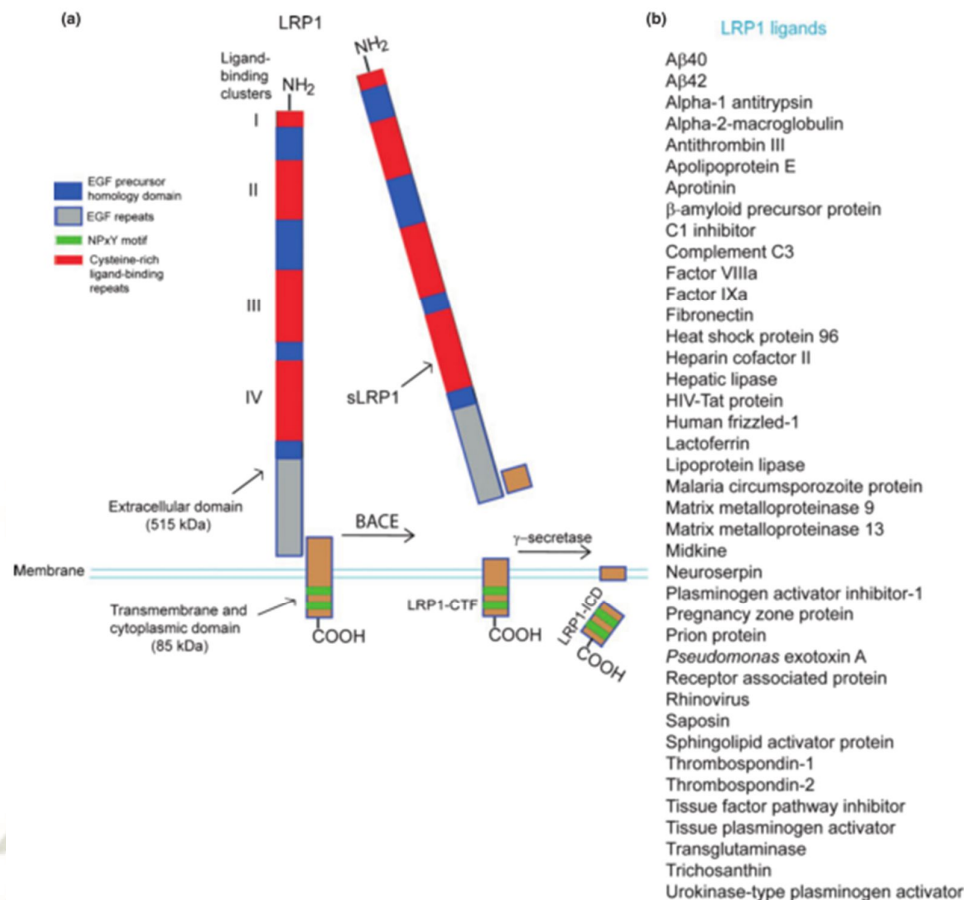


Figura 10. Estructura de LRP1 y principales ligandos⁽⁹⁸⁾

3.3 FUNCIÓN

Entre las principales funciones de esta proteína-receptor tenemos⁽⁹⁹⁻¹⁰⁶⁾:

- Colaboración en la eliminación de proteínas plasmáticas en el hígado a través de la degradación de proteínas a aminoácidos e intermediarios glucogénicos o cetogénicos, que incluyen α 2-macroglobulina, factor VIII y lipoproteínas, como el quilomicron.
- Protección para la vasculatura. Gracias a la endocitosis de PDGF-R (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas) en las células del músculo liso, LRP1 puede modular la vía de señalización de PDGF, que se sabe que está implicada en el desarrollo de la aterosclerosis.
- Desempeño de un papel importante en la regulación de la barrera hematoencefálica (BBB) al permitir la salida de componentes del cerebro hacia la vasculatura periférica.

- LRP1 se une al activador tisular plasminógeno (tPA) y posee propiedades de señalización.
- Regulación de la migración celular y la invasión.
- Participación en la organización del citoesqueleto y el desensamblaje de la adhesión focal, especialmente a través de su interacción con trombospondina-1 (en lugar de trombospondina-1) y calreticulina.
- Desempeño de un papel crucial en la maduración de las proteínas de la superficie celular, especialmente la integrina $\beta 1$, implicada en la adhesión celular.
- Desempeño de un papel clave en la señalización intracelular y endocitosis, que lo implica en muchos procesos como metabolismo de lípidos y lipoproteínas
- Participación en la degradación de proteasas
- Participación en la regulación del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- Participación en el crecimiento celular e inflamación. Media el reconocimiento de células apoptóticas por las células fagocíticas.
- Aclaramiento del $A\beta$ en el cerebro y del mismo modo puede unirse sLRP1 (LRP1 soluble) y LRP1 localizadas en la superficie de células hepáticas para mediar su eliminación sistémica.

3.4 IMPORTANCIA DE LRP1 EN EL ALZHEIMER

LRP1 es importante en la patogénesis del Alzheimer por varias razones como se describen a continuación^(91,94,96,107):

- Las neuronas requieren colesterol para su correcto funcionamiento en la transmisión de los impulsos nerviosos y ya que el colesterol es importado a la neurona por la apolipoproteína E (apoE) a través de los receptores LRP1 en la superficie celular, se cree que su mal funcionamiento o deficiencia pueda ser un factor causal en la enfermedad de Alzheimer.
- LRP1 ubicado en hepatocitos está implicado en la degradación sistémica de $A\beta$.

- LRP1 ubicado en neuronas, astrocitos, microglías está implicado en la absorción y degradación lisosómica del A β y también en la eliminación de A β del cerebro a la periferia a través de la BBB (Figura 11).
- También se mostró que LRP1 media la fagocitosis de células apoptóticas uniéndose a la calreticulina de la superficie celular en macrófagos, lo que sugiere que LRP1 puede desempeñar un papel en la eliminación de células apoptóticas que contienen A β .
- ABCA7, otra proteína de membrana que está implicada en el riesgo de Alzheimer se localiza junto con LRP1 en la superficie celular y mejora la fagocitosis de células apoptóticas a través de LRP1 en macrófagos.
- LRP1 está altamente expresada en la cerebrovasculatura. En las células del músculo liso vascular, el factor de respuesta sérico y la miocardina suprimen el aclaramiento de A β al regular negativamente la LRP1. También se ha demostrado directamente que la delección condicional de LRP1 en células de músculo liso vascular en ratones modelo amiloide exacerbó la deposición de A β como placas amiloideas.
- LRP1 probablemente media el aclaramiento de A β en la barrera del líquido cefalorraquídeo (CSF) y también en la BBB. En un estudio se demostró que después de la administración intracerebroventricular, el A β radiomarcado se eliminó del CSF con una vida media de 17,3 minutos, que se suprimió significativamente en presencia de la proteína asociada al receptor (RAP) o anticuerpo anti-LRP1. Estos hallazgos sugieren que LRP1 está involucrado en la eliminación de A β del CSF en células epiteliales en el plexo coroideo.

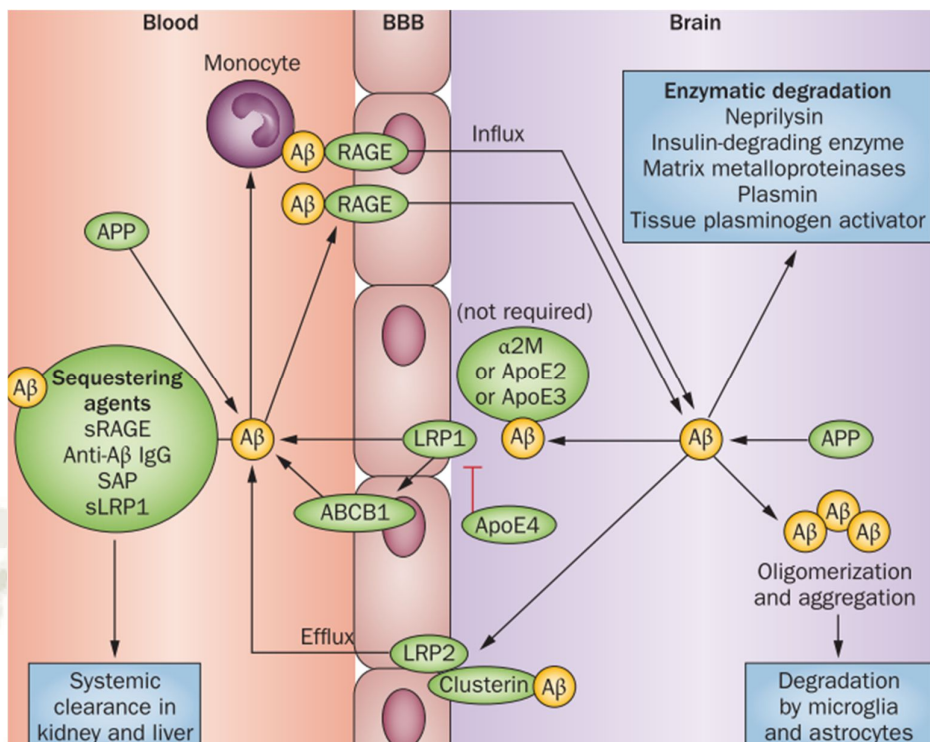


Figura 11. LRP1 media la salida de Aβ del cerebro mediante la barrera hematoencefalica⁽¹⁰⁸⁾

3.5 LRP1 COMO OBJETIVO TERAPÉUTICO PARA ALZHEIMER

Es evidente que LRP1 tiene un papel importante en la regulación del aclaramiento cerebral y sistémico del Aβ y en general en toda la patogénesis de la enfermedad del Alzheimer. Es por ello por lo que se está estudiando este receptor de una manera más profunda para poder desarrollar a futuro una terapia dirigida hacia este receptor para aliviar la enfermedad de Alzheimer. Los avances que se tiene hasta ahora teniendo como objetivo terapéutico a LRP1 son los siguientes^(97,98,109,110):

- Las estrategias de terapia farmacológica y/o genética como cambios de estilos de vida, administración de estatinas, transferencia génica mediante vectores para aumentar los niveles de LRP1 tanto en el sistema cerebrovascular y en la BBB como en órganos periféricos como el hígado, pueden tener el potencial de aliviar el daño vascular y acelerar el aclaramiento y eliminación y/o prevenir la acumulación de Aβ en la enfermedad de Alzheimer.
- El sLRP1 oxidado en el plasma que no se une al Aβ periférico, es un biomarcador temprano importante en individuos que padecen de defectos

cognitivos leves que podrían convertirse en pacientes con Alzheimer, así como en pacientes que ya padecen Alzheimer. Por lo tanto, la terapia sustitutiva del sLRP1 circulante oxidado nativo con clústeres recombinantes de LRP con gran afinidad de unión a A β . Puede ayudar a mantener la actividad periférica ‘sink’ (proporcionar un receptor al A β libre en el plasma) para reducir la afluencia de A β circulante al cerebro.

- Las condiciones de enriquecimiento ambiental como el aprendizaje, memoria, lugar donde se vive, entre otros mejoran la función cognitiva y la patología amiloide en modelos de ratón con Alzheimer. En ratones TgCRND8, que sobreexpresan una forma mutante de APP, el enriquecimiento ambiental probablemente contrarresta la disfunción vascular al aumentar la angiogénesis acompañada de regulación positiva de LRP1, apoE y α -2-macroglobulina, tal que la limpieza de A β se mejora al tener mayor LRP1 funcional.
- La electroacupuntura cerebral también redujo la deposición del A β en el hipocampo y reestableció el deterioro cognitivo en ratones transgénicos APP-V717I que sobreexpresan una forma mutante de APP y PS1, lo cual se asoció con un aumento de LRP1 en el hipocampo.
- El ejercicio físico como correr disminuyó el depósito de A β en el cerebro y declive cognitivo en ratones transgénicos APP/PS1. Se observó una regulación positiva de LRP1, así como neprilisina, enzima degradante de insulina, metalopeptidasa entre otras proteínas envueltas en la limpieza del A β en el cerebro.
- En ratones TgSwDI, que sobreexpresan una forma mutante de APP, oleocantal, un componente secoiridoide fenólico del aceite de oliva virgen extra incrementa la glicoproteína P y LRP1 en la BBB, lo que resulta en un aclaramiento de A β mejorado y una reducción de la neuroinflamación.
- Los experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraron que el tratamiento con cannabinoides también mejoró el tránsito de A β en la BBB, esto se asoció con niveles aumentados de LRP1 en el cerebro y en el plasma.
- El estrés oxidativo e inflamatorio podría estar involucrado en la patogénesis del Alzheimer. Se ha demostrado que el antioxidante N-acetilcisteína protegió

contra la inflamación inducida por la disfunción del aclaramiento de A β mediante LRP1 en la BBB.

- Se sabe que hay una relación directa entre el dominio de desintegrina y metaloproteinasa que contiene la proteína 10 (ADAM10) y el desprendimiento de LRP1 en el endotelio cerebral. La administración de un inhibidor de un ADAM10, GI254023X, podría mejorar el aclaramiento de A β a través de la BBB al reducir el desprendimiento de LRP1.
- Se informó un efecto terapéutico de un péptido similar a sLRP1 modificado, LRPIV-D3674G, que tiene una afinidad de unión más alta a A β , pero menos afinidad de unión a otros ligandos de LRP1. La administración subcutánea de LRPIV-D3674G redujo los niveles de A β 40 y A β 42 en el hipocampo, la corteza y en el CSF entre 60 y 80%, y mejoró las funciones vasculares y neuronales en ratones con mutaciones en APP/PS1. Por lo tanto, el tratamiento con LRPIV-D3674G puede ser un candidato novedoso para la terapia de Alzheimer dirigida directamente a la función de LRP1.
- La administración oral de un medicamento tradicional indio, el cual es un extracto semipurificado de la raíz de *Withania somnifera*, aumentó LRP1 hepático y mejoró la patología amiloide en ratones con mutaciones en APP / PS1 probablemente facilitando el aclaramiento de A β a través de la BBB. Estudios sugieren que aumentar el LRP1 hepático es potencialmente beneficioso contra la acumulación cerebral de A β , lo cual es consistente con la hipótesis del sLRP1 periférico.

Las estrategias farmacológicas antes mencionadas para aumentar la expresión de LRP1 en la vasculatura cerebral pueden ser prometedoras para la terapia del Alzheimer (Figura 12). Pese a ello, el solo aumentar LRP1 puede no ser suficiente para mitigar los efectos sobre los depósitos de A β ya que cofactores como la vitamina E probablemente estén involucrados en estos mecanismos. Se debe tener en cuenta que el desarrollo de terapias basadas en LRP1 para el Alzheimer requiere un estudio cuidadoso de toxicidad y de seguridad de efectos secundarios no deseados potenciales ya que que LRP1 participa en múltiples sistemas de control en el organismo. Sin embargo, hallazgos preliminares en tratamientos basados en LRP1 como los grupos recombinantes de LRP1 sugieren que estos se pueden adaptar mediante ingeniería

genética para que se dirijan específicamente a $A\beta$ con efectos mínimos sobre otros sistemas en el cuerpo y/o como construcciones de LRP1 selectivas de $A\beta$ adaptadas para expresión específica de tejido en cerebro, hígado y/u otros órganos periféricos^(91,107).

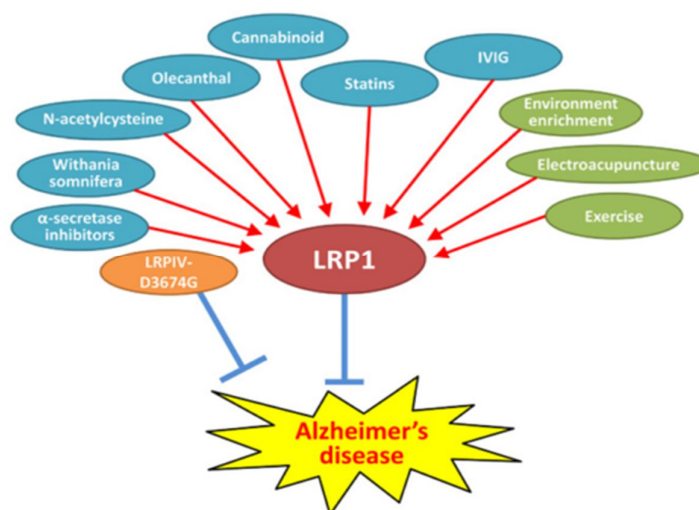


Figura 12. LRP1 como objetivo terapéutico para el Alzheimer⁽¹⁰⁹⁾

3.6 BIOSÍNTESIS

LRP1 al tener una estructura proteica cumple los mismos pasos para su biosíntesis como una proteína en general. La síntesis de proteínas es el proceso anabólico mediante el cual se forman las proteínas en el ribosoma, estas tienen funciones especializadas y pueden servir como hormonas, enzimas, inmunoglobulinas, receptores, neurotransmisores, entre otros^(111,112).

El proceso consta de cinco etapas, la Figura 14 resume las diferentes etapas de síntesis de proteínas. Estas etapas se detallan a continuación:

- Activación de los aminoácidos: Los aminoácidos que pasaran a formar parte de la proteína deben ser activados para poner formar el enlace peptídico. En el citosol, cada aminoácido se une a su ARN-t correspondiente, con ayuda de la enzima aminoacil ARNt sintetasa, siendo este un proceso que consume energía. Es en este momento cuando se dice que el ARNt se encuentra “cargado”^(113,114).

- Inicio de la Traducción: Es en esta fase donde se da la formación de la cadena polipeptídica con el primer aminoácido ya activado (que es escogido por el RNA-m) el cual toma el nombre de “iniciador”. Primero el ARN-m se une a la subunidad menor del ribosoma (40S), luego el ARN-t ya cargado con el aminoácido iniciador se les asocia por medio del anticodón (tripleto de nucleótidos), luego se unirá la subunidad mayor del ribosoma y es así como se forma el complejo de inicio (el ribosoma, RNA-m, RNA-t, el aminoácido iniciador activado y los factores de inicio) Este proceso requiere energía aportada por GTP (guanosin trifosfato) y es regulado y estimulado por los factores de inicio que son proteínas citosólicas (FI1, FI2, FI3). Generalmente el primer codón del ARN-m es AUG, el cual se aparea con el anticodón del ARN-t y esto da la señal del inicio de la formación de la cadena polipeptídica^(115,116).
- Elongación: En el centro P (donde se sitúa el primer aminoacil-ARNt) el carboxilo terminal (-COOH) del aminoácido iniciador se une con el amino terminal (-NH₂) del aminoácido siguiente mediante enlace peptídico, el cual es formado por la peptidil transferasa. Esta unión es catalizada por la enzima peptidil transferasa, por lo tanto, el centro P queda ocupado por un ARNt sin aminoácido, el cual sale del ribosoma y se produce la translocación ribosomal (Figura 14). El dipeptil-ARNt queda ahora en el centro P. Todo este proceso es catalizado por los factores de elongación (FE1, FE2) y requiere de energía en forma de GTP. Según la terminación del tercer codón, aparece el tercer aminoacil-ARNt y ocupa el centro A (el centro aceptor de nuevos aminoacil-ARNt). Posteriormente se forma el tripéptido en el centro A y finalmente el ribosoma realiza su segunda translocación. Estos pasos se repiten múltiples veces según el número de aminoácidos que requiera el polipéptido. La traslocación del ribosoma implica el desplazamiento del ribosoma a lo largo de ARN-m en sentido 5' a 3'^(117,118).
 - Cicloheximida: También llamada naramycina, hizarocin, actidione®, actispray, kaken, U-4527 y con la forma molecular de C₁₅H₂₃NO₄ (Figura 13). Es un inhibidor de la síntesis proteica en células eucariotas y es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Esta droga inhibe

la síntesis de proteínas a nivel del ribosoma 60S y actúa interfiriendo en la actividad de la peptidil transferasa lo cual provoca que no se forme el enlace peptídico entre los aminoácidos. Se usa ampliamente en la investigación científica *in vitro* ya que tiene un efecto rápido y se puede revertir este efecto al retirarlo del medio de cultivo, sin embargo tiene efectos tóxicos incluyendo daño al ADN, teratogénesis, y efectos en la reproducción (toxicidad para los espermatozoides, enfermedades congénitas) entre otros⁽¹¹⁹⁻¹²²⁾.

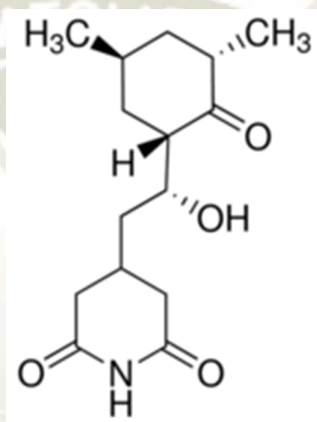


Figura 13. Estructura química de Cicloheximida⁽¹¹⁹⁾

- Terminación: La cadena polipeptídica continua elongandose hasta que se da la señal de paro, los cuales son los codones UAA, UAG y UGA, que no especifican ningún aminoácido ya que no existe ningún ARN-t cuyo codón sea complementario a estos y se conocen como codones de terminación ya que determinan el final de la síntesis proteica. Este proceso viene regulado por los factores de liberación (RF1, RF2, RF3), de naturaleza proteica, que se sitúan en el sitio A y hacen que la peptidil transferasa se separe por medio de hidrólisis de la cadena polipeptídica del ARN-t al romper el enlace peptídico^(123,124).
- Modificación postraducción: Son aquellas modificaciones que requieren algunas proteínas para que puedan ejercer su función (ya que otras proteínas emergen del ribosoma ya preparadas para ejercer su función de inmediato). Este proceso de “maduración” de estas proteínas requiere diferentes plegamientos, procesos de glucosilación, proteólisis parcial y modificación de

aminoácidos hasta que modifique su forma y obtenga una estructura tridimensional^(125,126).

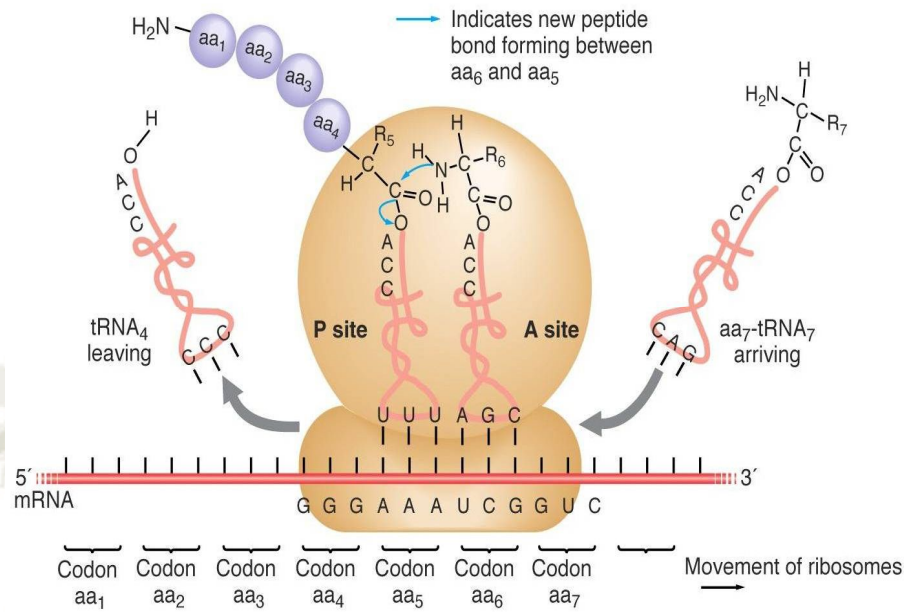


Figura 14. Síntesis de proteínas. Traducción⁽¹²⁷⁾

3.7 DEGRADACIÓN

3.7.1 DEFINICIÓN

LRP1 al ser una proteína intracelular con función endocítica y receptora tiene una vida útil que al finalizar debe ser degradada para mantener la homeostasis. La degradación de proteínas intracelulares es el proceso por el cual las proteínas ya sea por termino de vida útil, modulación de homeostasis, eliminación de proteínas anómalas, entre otras, son metabolizadas pudiendo reutilizarse los productos de degradación⁽¹²⁸⁾.

3.7.2 CLASIFICACIÓN

Actualmente se sabe que en la degradación de determinadas proteínas se encuentra el punto de control de diversos procesos biológicos, algunos tan fundamentales como la progresión del ciclo celular⁽¹²⁹⁾.

Existen evidencias de proteínas degradadas en las mitocondrias, en los cloroplastos, en el lumen del retículo endoplásmico y en endosomas; sin embargo, los dos sistemas principales de proteólisis caracterizados se encuentran en el citosol y en los lisosomas.

Se sabe que las proteínas pertenecientes a membranas intracelulares, así como a la membrana plasmática suelen ser degradadas por el sistema lisosomal⁽¹²⁶⁾.

Existen dos principales vías de degradación de proteínas intracelulares, las cuales son la vía de degradación ubiquitina-proteosoma y la vía de degradación lisosomal-autofágica.

3.7.2.1 SISTEMA DE DEGRADACION UBIQUITINA-PROTEOSOMA

Una de las principales vías de degradación proteica selectiva en células eucarióticas utiliza ubiquitina como un marcador que se dirige a proteínas citosólicas y nucleares para una proteólisis rápida. Ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos que está altamente conservado en todos los eucariotas (levaduras, animales y plantas). Las proteínas son marcadas para la degradación mediante la unión de ubiquitina al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina, así se agregan ubiquitinas adicionales para formar una cadena de multiubiquitina para que dichas proteínas poliubiquitinadas sean reconocidas y degradadas por un gran complejo de proteasa de múltiples subunidades, llamado proteosoma. La ubiquitina se libera en el proceso, por lo que puede reutilizarse en otro ciclo. Es importante mencionar que tanto la unión de ubiquitina como la degradación de proteínas marcadas requieren energía en forma de ATP (adenosín trifosfato)⁽¹³⁰⁾.

La ubiquitinación es un proceso de varios pasos e inicia con la activación de la ubiquitina al unirse a la enzima que activa la ubiquitina (E1). Luego, la ubiquitina se transfiere a una segunda enzima, llamada enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Después, la ubiquitina es transferida a la proteína diana por una tercera enzima, llamada ubiquitina ligasa (E3), que es responsable del reconocimiento selectivo de las proteínas de sustrato apropiadas, para finalmente repetir este proceso varias veces hasta formar una cadena poliubiquitinada y ser conducido al proteosoma y con ayuda de energía (ATP) poder degradar la proteína pudiendo reciclar la ubiquitina para volver a ser usada en este ciclo. En la Figura 15 se esquematiza el proceso de degradación antes descrito^(131,132).

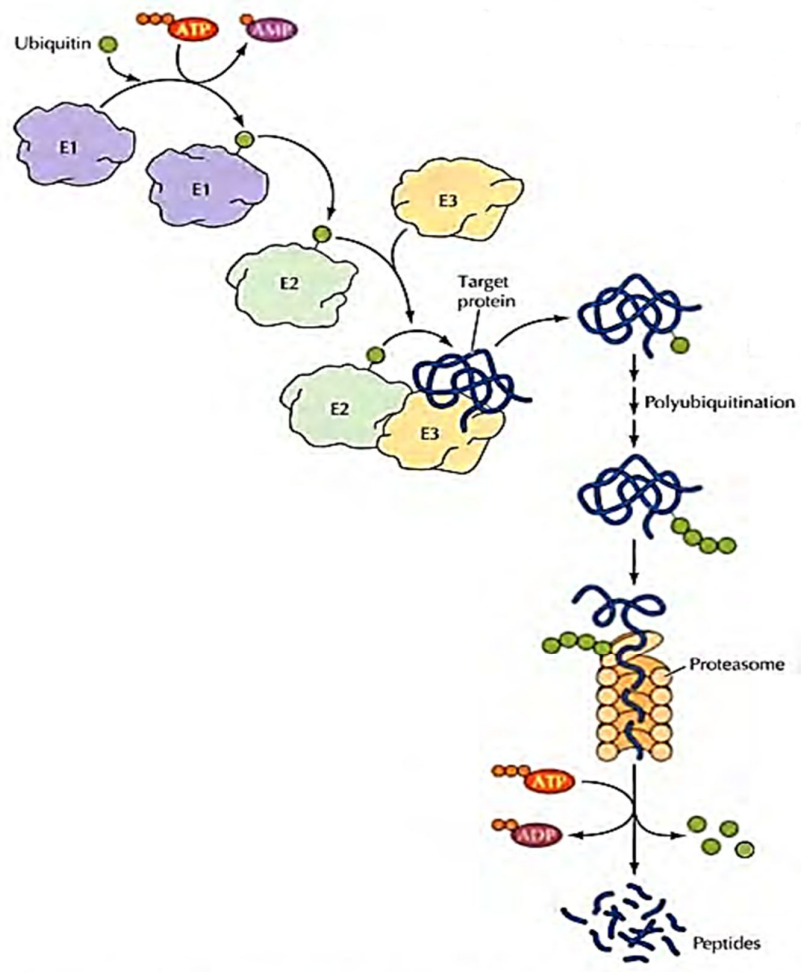


Figura 15. Vía Ubiquitina-Proteosoma⁽¹³³⁾

- MG132: Es una clase de péptido aldehído sintético, en la Figura 16 se muestra su estructura química. Es un inhibidor del proteosoma específico, potente, reversible y permeable a las células. Reduce la degradación de proteínas conjugadas con ubiquitina en células de mamíferos y cepas permeables de levadura mediante el complejo 26S sin afectar sus actividades de ATPasa o isopeptidasa. También activa c-Jun N-terminal quinasa (JNK1), que inicia la apoptosis. MG132 también inhibe la activación de NF- κ B con una CI50 de 3 μ M e impide la escisión de la β -secretasa⁽¹³⁴⁻¹³⁶⁾.

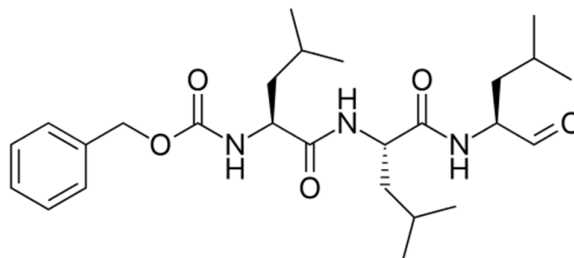


Figura 16. Estructura química de MG132⁽¹³⁷⁾

3.7.2.2 SISTEMA DE DEGRADACION LISOSOMAL-AUTOFAGICA

La otra vía principal de degradación de proteínas en células eucarióticas implica la absorción de proteínas mediante los lisosomas. Los lisosomas son orgánulos encerrados en una membrana que contienen una serie de enzimas digestivas, incluidas varias proteasas. Estas tienen varias funciones en el metabolismo celular, incluida la digestión de proteínas extracelulares absorbidas por endocitosis, así como el recambio gradual de orgánulos citoplasmáticos y proteínas citosólicas^(133,138).

Una vía para esta captación de proteínas celulares, que es la autofagia, implica la formación de vesículas (autofagosomas) en las que pequeñas áreas del citoplasma u orgánulos citoplasmáticos están encerradas en membranas derivadas del retículo endoplásmico. Estas vesículas luego se fusionan con los lisosomas, y las enzimas lisosomales degradantes digieren su contenido. En la Figura 17 se puede observar la formación de un autofagosoma. La absorción de proteínas en autofagosomas parece no ser selectiva, por lo que resulta en la eventual degradación lenta de las proteínas citoplásmicas de larga vida. Sin embargo, no toda la absorción de proteínas por los lisosomas es no selectiva. Por ejemplo, los lisosomas son capaces de absorber y degradar ciertas proteínas citosólicas de forma selectiva como respuesta a la inanición celular. Las proteínas degradadas por las proteasas lisosomales en estas condiciones contienen secuencias de aminoácidos similares a la siguiente secuencia consenso: Lys-Phe-Glu-Arg-Gln, que presumiblemente los dirige a los lisosomas. También se requiere un miembro de la familia de chaperones moleculares Hsp70 para la degradación lisosómica de estas proteínas, actuando presumiblemente para desplegar las cadenas polipeptídicas durante su transporte a través de la membrana lisosómica. Se piensa que las proteínas susceptibles a la degradación por esta vía son normalmente proteínas de larga duración, pero prescindibles⁽¹³⁹⁻¹⁴¹⁾.

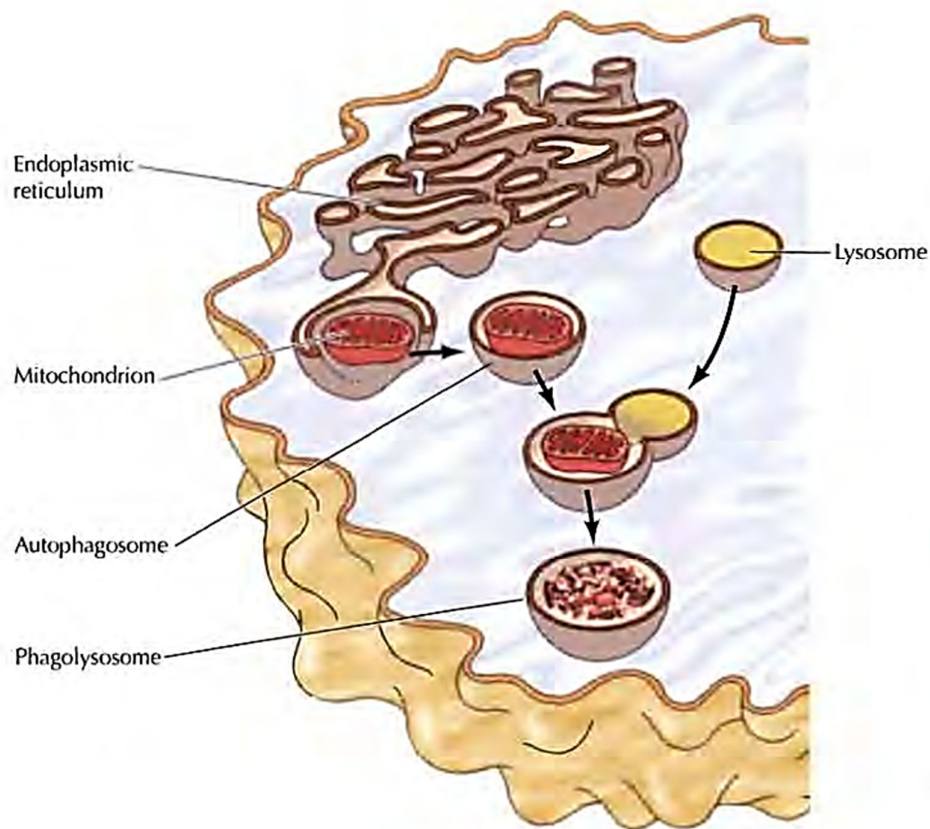


Figura 17. Vía lisosomal-autofágica⁽¹³³⁾

- **BAFILOMICINA A1:** La Bafilomicina A1 es un macrólido (Figura 18) que es producido por *Streptomyces griseus*, este es un inhibidor conocido de la fase tardía de la autofagia. Previene la maduración de las vacuolas autofágicas al inhibir la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas. La Bafilomicina A1 actúa inhibiendo la H^+ ATPasa vacuolar⁽¹⁴²⁾.

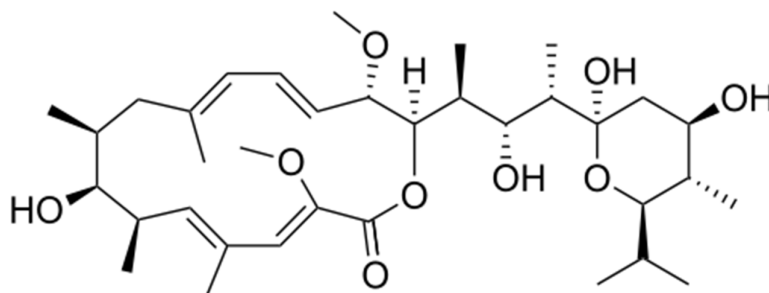


Figura 18. Estructura química de Bafilomicina A1⁽¹⁴³⁾

4. LINEA CELULAR DE CARCINOMA HEPÁTICO (HepG2)

4.1 DESCRIPCIÓN

Son células de la línea celular perpetua de carcinoma hepático (derivado de un varón caucásico de 15 años) (Figura 19). Estas células son epiteliales en morfología y expresan una alta variedad de proteínas, entre las principales tenemos: α -fetoproteína, albúmina; α -2-macroglobulina, α -1-antitripsina, transferrina, α -1-antiquimotripsina, haptoglobina; ceruloplasmina, plasminógeno, componente 4 del complemento, activador de la convertasa C3, fibrinógeno, glicoproteína ácida α -1, α -2-HS-glicoproteína, β -lipoproteína, proteína de unión al retinol, LRP1, entre otros⁽¹⁴⁴⁻¹⁴⁷⁾.

Debido a su alto grado de diferenciación morfológica y funcional *in vitro* (Figura 19), las células HepG2 son un modelo adecuado para estudiar el tráfico y la dinámica intracelular de proteínas de membrana, y lípidos en hepatocitos humanos *in vitro*. Esto puede ser importante para el estudio de enfermedades hepáticas humanas causadas por una distribución subcelular incorrecta de proteínas de la superficie celular o donde estén inmersas las células hepáticas como en el caso de los defectos de transporte hepatocanalicular (síndrome de Dubin-Johnson, colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC) e hipercolesterolemia familiar, entre otros)^(144,148-150).

ATCC Number: HB-8065
Designation: Hep G2

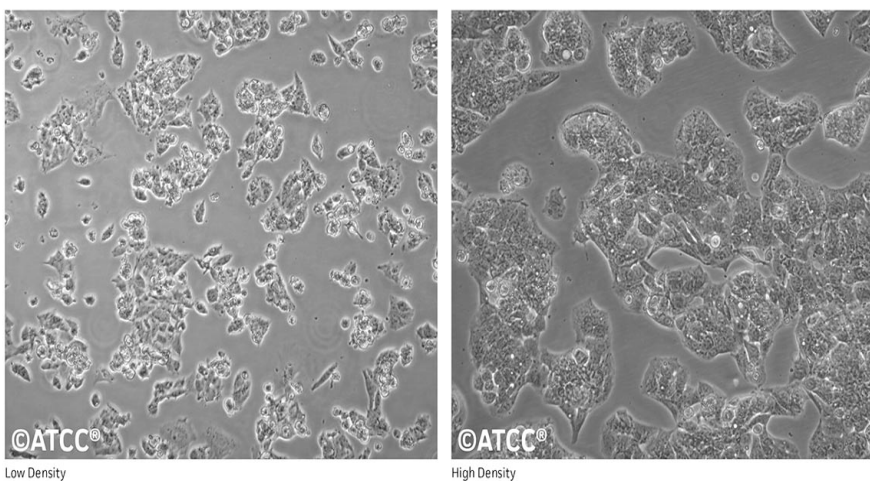


Figura 19. Células HepG2 a baja y alta densidad⁽¹⁴⁵⁾

4.2 HEPG2 Y ALZHEIMER

El $A\beta$ se degrada a nivel cerebral por las células gliales mediante diferentes enzimas degradadoras (neprilisina, catepsina B, enzima convertidora de la angiotensina, enzima degradadora de la insulina, enzima convertidora del endotelio, aminopeptidasa A, entre otras) y otros medios que tiene el cuerpo para limpiar la cerebrovasculatura del $A\beta$. Sin embargo, la acumulación excesiva de $A\beta$ y el desequilibrio del sistema regulador provoca que este atraviese la BBB mediante LRP1. Hay evidencia científica para afirmar que la degradación sistémica de $A\beta$ es en el hígado, siendo internalizados por LRP1 hepático, por lo cual he aquí la importancia que tiene esta investigación al estudiar un modelo *in vitro* de hepatocitos con condiciones de alta proliferación, pero con características propias de hepatocitos para hallar el parámetro farmacocinético de la vida media y su principal vía de degradación. Estos datos permitirán proponer una farmacoterapia dirigida a LRP1 (*in vivo* y posteriormente con pruebas clínicas), pudiendo inhibir su degradación para poder extender su vida útil, para que así en condiciones patológicas pueda internalizar mayor cantidad $A\beta$ y ayude en la degradación de este en el hígado⁽¹⁵¹⁻¹⁵⁶⁾.

Estudios han determinado que el $A\beta$ soluble es segregado por células HepG2 como una apolipoproteína, lo que no está claro es cuál sería la función fisiología de este $A\beta$ en el cuerpo humano. Sin embargo se considera que pudiera estar implicado en el transporte y metabolismo de lípidos, ya que se observó alteración en el metabolismo de los lípidos en pacientes con Alzheimer⁽¹⁵⁷⁻¹⁶¹⁾.

Se ha estudiado también la apoptosis que produce $A\beta$ en otras líneas celulares como es SH-SY5Y, esto demuestra claramente que es muy importante la investigación en modelos *in vitro* sobre la enfermedad de Alzheimer⁽¹⁶²⁾.

5. CULTIVO CELULAR

5.1 DEFINICIÓN

Es el conjunto de técnicas que permiten mantener células *in vitro* en suspensión o en monocapa con una gran aproximación a sus propiedades y funciones *in vivo* por más de 24 horas en condiciones controladas⁽¹⁶³⁾.

6. ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

Los ensayos para medir la proliferación celular, la viabilidad celular o la citotoxicidad se usan comúnmente para controlar la respuesta y la salud de las células en cultivo después del tratamiento con diversos estímulos. Los ensayos de proliferación celular pueden controlar el número de células a lo largo del tiempo, el número de divisiones celulares, la actividad metabólica o la síntesis de ADN en cambio, el recuento de células usando tintes de viabilidad como el azul tripán puede proporcionar tanto la tasa de proliferación como el porcentaje de células viables^(164–167).

6.1 AZUL DE TRIPAN

El azul de tripano, azul de tripán o azul tripán es un colorante azoico (Figura 20) que se utiliza para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla y ya que este compuesto es una molécula grande y de carga aniónica, la membrana no permite su paso, por el contrario, si la célula está muerta, por lo tanto, la membrana celular estará desintegrada por lo cual el colorante azul de tripán podrá ingresar sin problemas a la célula. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio (típicamente, empleando una cámara de Neubauer para contarlas). Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama método de tinción por exclusión^(168–171).

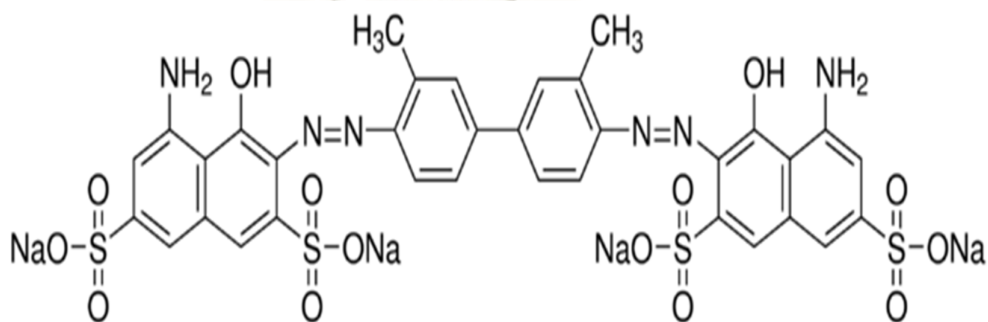


Figura 20. Estructura química de azul de tripán⁽¹⁶⁹⁾

7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas a menudo es necesaria antes de manipular muestras de proteínas para su aislamiento, su caracterización o separación respectiva por cromatográfica, electroforesis e inmunoquímica y para servir procedimientos posteriores. No existe un único método de ensayo de proteínas que arroje resultados absolutamente precisos. Cada método tiene diferentes ventajas y limitaciones. Lo importante es saber cómo seleccionar el ensayo de cuantificación de proteína más apropiado para una aplicación específica. Los métodos de ensayo de proteínas que se usan comúnmente en laboratorios bioquímicos son el ensayo Lowry, el ensayo Bradford, el ensayo del ácido bicinónico (BCA) y espectroscopía UV para determinar la concentración de proteína^(172,173).

7.1 ENSAYO DE BCA

El principio del ensayo del BCA es similar al procedimiento de Lowry, en que ambos dependen de la formación de un complejo de proteína Cu^{+2} en condiciones alcalinas, seguido de la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} . La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. Se ha demostrado que la cisteína, cistina, triptófano, tirosina y el enlace peptídico son capaces de reducir Cu^{+2} a Cu^{+1} . BCA forma un complejo púrpura-azul con Cu^{+1} en ambientes alcalinos, pudiendo correlacionar la coloración (que absorbe luz a 562 nm) con el contenido de proteínas en la muestra (Figura 21). Los ensayos de BCA se desarrollan a 37°C y el color se evidencia rápidamente por la reducción de aminoácidos como tirosina, cistina, triptófano; pero este proceso puede ser acelerado con incubación a altas temperaturas, ya que a altas temperaturas los enlaces peptídicos se reducen y no solamente los aminoácidos mencionados, lo que produce resultados que se correlacionan más con la cantidad de proteína que con la presencia de residuos específicos⁽¹⁷⁴⁻¹⁷⁷⁾.

A continuación, se describen la reacción que se da en el ensayo del BCA:



La diferencia con los otros ensayos es que el ensayo del BCA es más sensible y aplicable que Biuret o Lowry. Además, tiene menos variabilidad que el ensayo de Bradford. El ensayo BCA tiene muchas ventajas sobre la determinación de proteínas

ya que es fácil de usar, el complejo de color es estable, hay menos susceptibilidad a los detergentes y es aplicable en una amplia gama de concentraciones de proteínas⁽¹⁷⁴⁾.

Además de la determinación de proteínas en solución, el análisis de proteínas por BCA tiene otras aplicaciones, que incluyen determinación de proteína unida covalentemente a soportes de agarosa y proteínas adsorbidas a placas de pocillos múltiples^(174,178,179).

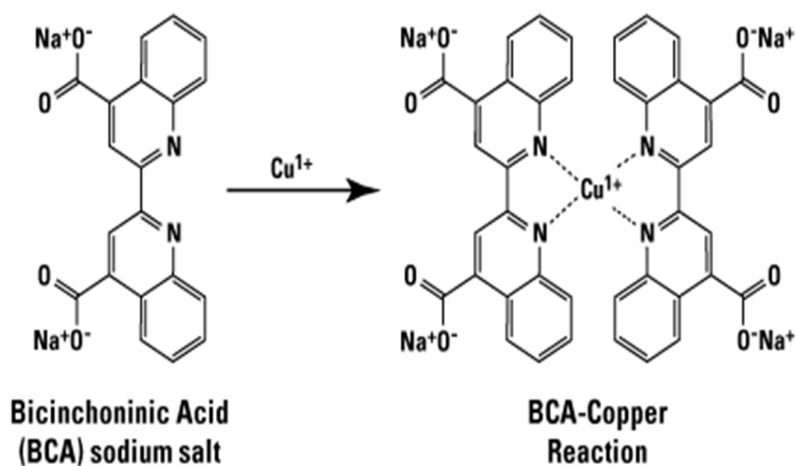


Figura 21. Formación del complejo BCA-Cu⁺¹⁽¹⁸⁰⁾

7.2 WESTERN BLOT

Western Blot (WB) es un método en biología molecular, bioquímica e inmunogenética para identificar una proteína en una muestra dada de homogenizado o extracto de tejido. El término ‘transferencia’ se refiere a la transferencia de muestras biológicas de un gel a una membrana y su detección posterior en la superficie de la membrana. WB se introdujo en 1979 y ahora es una técnica de rutina para el análisis de proteínas. La especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno permite identificar una sola proteína en medio de una mezcla de proteínas. Western Blot se utiliza comúnmente para identificar positivamente una proteína en específico en una mezcla compleja y para obtener datos cualitativos y semicuantitativos sobre esa proteína⁽¹⁸¹⁻¹⁸³⁾.

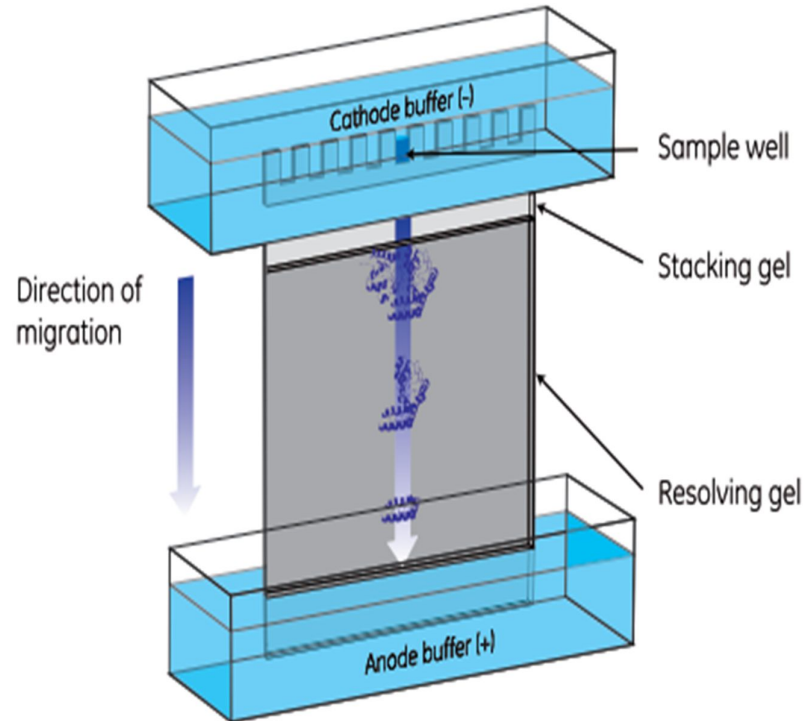


Figura 22. Electroforesis vertical⁽¹⁸⁴⁾

El primer paso en un procedimiento de Western Blot es separar las macromoléculas usando gel de electroforesis (Figura 22). Después de la electroforesis, las moléculas separadas se transfieren sobre una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF).

A continuación, la membrana se bloquea para evitar cualquier unión inespecífica de anticuerpos a la superficie de la membrana. La proteína transferida se compleja con un anticuerpo primario y posterior un anticuerpo secundario marcado con una enzima. Luego se agrega un sustrato apropiado a la enzima (Figura 23) y juntos producen un producto detectable tal como un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana para detección colorimétrica o fluorométrica, respectivamente.

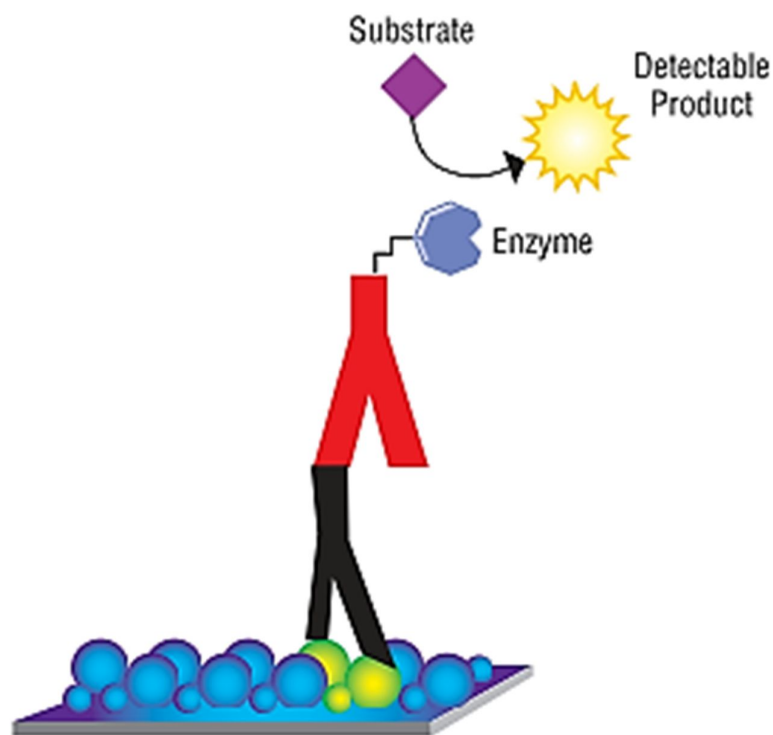


Figura 23. Método indirecto de detección⁽¹⁸¹⁾

En la Figura 23 se puede visualizar los pasos antes descritos en un esquema. Finalmente se realiza la densitometría, para lo cual los métodos de detección más sensibles usan un sustrato quimioluminiscente que, cuando se combina con la enzima, produce luz como subproducto. La salida de luz se puede capturar utilizando una película, una cámara charge coupled device (CCD) o un phosphorimager que está diseñado para la detección de quimioluminiscencia. Para cualquier sustrato que se use, la intensidad de la señal debe correlacionarse con la abundancia del antígeno en la membrana de transferencia, es decir entre mayor cantidad de luz emita mayor será la cantidad de proteína complejada con los anticuerpos. En la Figura 24 se puede observar los pasos generales antes descritos para el desarrollo del protocolo de Western Blot^(181,184-186).

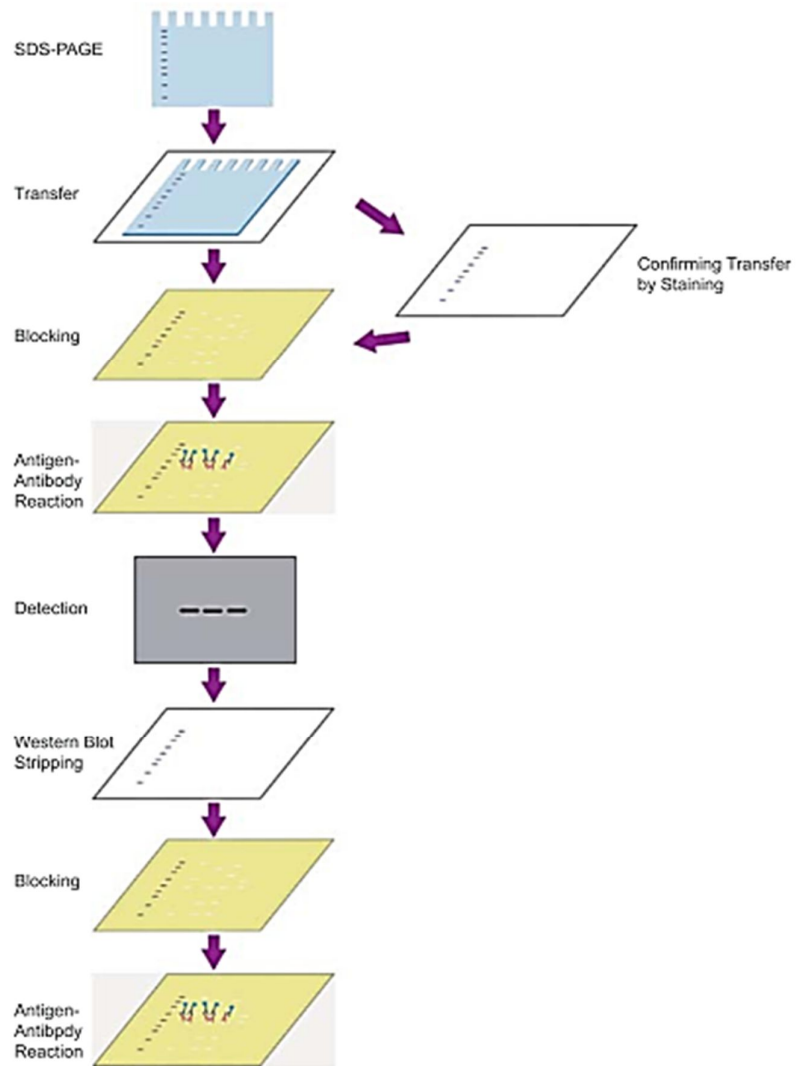


Figura 24. Procedimiento general de Western Blot⁽¹⁸²⁾

A large, faint watermark of the Universidad Católica de Santa María logo is centered on the page. It features a shield with a cross, a book, and a lamp, surrounded by the university's name and the year 1961.

CAPÍTULO II METODOLOGÍA

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Células HepG2: Se utilizó la línea celular perpetua HepG2 (ATCC®) en el pasaje 18, la cual fue proporcionada por el MSc. Alejandro Rondón Ortiz para la investigación. Las células ya se encontraban en uso, almacenadas en una incubadora (VWR® symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubator, Model 5.3^a and 8.5^a) a una temperatura de 37°C con 5% CO₂, en los laboratorios de investigación de Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences University,

1.2 INSTRUMENTOS UTILIZADOS

- Cámaras de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2)
- Incubadora con fuente de CO₂ (VWR® symphony™ Air-Jacketed CO₂ Incubators, Models 5.3^a and 8.5^a)
- Cámara de nitrógeno líquido (VWR® CryoPro® Rack Systems, BR Series Promotion Packages)
- Microscopio invertido (Olympus®, CKX31)
- Contador celular (Nexelom Bioscience®, Cellometer® Auto T4)
- Centrífuga (Clay Adams™ DYNAC® III Centrifuge, Model 420104)
- Baño térmico de perlas metálicas (Lab Armor®, Bead Bath™ Model 74300-706),
- Lector de microplacas (BioTek®, Synergy™ microplates)
- Agitador Vortex (Fisher Scientific Vortex Mixer, Cat # 02215365)
- Fuente de poder para electroforesis (BioRad®, PowerPac™ HC High-Current Power Supply)
- Bloque de calentamiento seco (Thermo Scientific Analog dry block heater EW-36401-05)
- Cámara de electroforesis (Bio-Rad®, Criterion™ Vertical Electrophoresis Cell)
- Sistema de transferencia (Bio-Rad® Trans-Blot®, Turbo™ transfer system)
- Microcentrífuga (Fisher Scientific®, Eppendorf™ 5424R Microcentrifuges)
- Lector de membrana (Li-Cor®, C-DiGit® Blot Scanner)
- Incubadora de microplacas (VWR®, Signature™ Incubating/Cooling Shaker)

1.3 MATERIALES Y REACTIVOS

- Frascos de cultivo de 75 y 25 cm³
- Tubos Falcon
- Tubos Eppendorf
- Pipetas descartables
- Placas de 6 y 96 pocillos
- Micropipetas
- Raspadores celulares
- Membrana de nitrocelulosa (ThermoScientific, Nitrocellulose Membrane, 88018)
- Papel filtro de Western-Blot (ThermoScientific, Western Blotting Filter Paper, 88620)
- Gel de Tris-Glicina 7.5% (BioRad, 7.5% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, 4568024)
- Minimum Essential Medium α (Medio de cultivo para el crecimiento de las células HepG2) (Life Technologies, MEM α , 12561-056)
- Buffer Fosfato Salino (Corning, Corning® Phosphate-Buffered Saline (1X without calcium and magnesium, PH 7.4 \pm 0.1), 21-040-CV)
- Albúmina Sérica Bovina (Boston BioProducts, BSA (Bovine Serum Albumin), P-753)
- Penicilina-estreptomicina (Penicilina 10,000 U/ml - Estreptomicina 10,000 μ g/ml) (Life technologies, Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL), 15140-122)
- Suero fetal de bovino (Complemento de crecimiento para el cultivo celular) (Life Technologies, Fetal Bovine Serum (FBS), 16000-044)
- Tripsina EDTA 0.05% (Reactivo para el pasaje celular) (Life Technologies, Trypsin-EDTA (0.05%) with phenol red, 25300-054)
- Solución Azul de Tripán 0.4% (Reactivo usado para la viabilidad celular) (Sigma-Aldrich, Trypan Blue solution, T8154)
- Solución de Rojo de Ponceau (BioReagent, suitable for electrophoresis, 0.1 % (p/v) in 5% acetic acid, P7170-1L)

- Dimetilsulfóxido (Solvente para las drogas de tratamiento) (Dimethyl sulfoxide $\geq 99.5\%$ (GC) (plant cell culture tested), D4540)
- M-PER (Reactivo para la extracción de proteínas) (ThermoScientific, M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent, 78501)
- Cocktail de Inhibidores de Proteasas (Reactivos para la lisis celular) (ThermoScientific, Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X), 78444)
- Kit de BCA (cuantificación de proteínas) (ThermoScientific, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225) Reactivo A contiene carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido bicinónico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M y Reactivo B contiene sulfato cúprico 4%
- SDS-Sample Buffer 4X reducing (Boston BioProducts, Laemmli (SDS-Sample Buffer, Reducing, 4X), BP110R)
- TBS Tween 20X (Reactivo para inmunoensayos) (ThermoScientific, Pierce™ 20X TBS Tween™ 20 Buffer, 28360)
- Buffer Tris-Glicina SDS 10X (ThermoScientific, Pierce™ 10X Tris-Glycine SDS Buffer, 28362)
- Ladder (Marcador de peso molecular de proteínas) (ThermoScientific, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 26616)
- Buffer de transferencia (ThermoScientific, Pierce™ 1-Step Transfer Buffer, 84731)
- Leche en polvo sin calorías (Boston BioProducts, Non-Fat Powered Milk, P-1400)
- Anticuerpo primario de β -actina (Abcam, Ms mAb to Beta Actin, ab49900)
- Anticuerpo primario de LRP1 (Abcam, Rb mAb to LRP1, ab92544)
- Anticuerpo secundario cabra anti-conejo (Abcam, Goat pAb to Rb IgG (HRP), ab97051)
- Sustrato quimioluminiscente (ThermoScientific, SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, 34578)
- Bafilomicina A1 (inhibidor de la vía lisosomal) (Abcam, Bafilomycin A1, ab120497)

- MG132 (Inhibidor de la vía ubiquitina proteosoma) (Abcam, MG-132, ab141003)
- Cicloheximida (Inhibidor de proteínas) (Abcam, Cycloheximide, ab120093)

1.4 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó en los laboratorios de post-grado del área de Farmacología, Escuela de Farmacia de la Universidad de Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, Boston, Estados Unidos.

2. METODOLOGÍA

El medio se cambió cada 2-3 días, y las células fueron pasadas y/o plaqueadas una vez que se tenía una confluencia razonable (70-90%). El número de células plaqueadas fue de alrededor de 250.000 células/mL.

Los protocolos de cultivo celular, conteo celular, viabilidad celular vía azul de tripan, lisis y extracción de proteínas vía M-PER, ensayo del ácido bicinconínico (BCA) y Western Blot se aplicaron varias veces durante todo el estudio, por lo cual se describirán a continuación una sola vez. Cabe resaltar que cada ensayo se llevó a cabo por triplicado y al final se realizó el análisis estadístico correspondiente con el software GraphPad Prism 6. En la Figura 25 se puede visualizar el diseño experimental. Para la determinación de la principal vía de degradación y tiempo de vida media de LRP1 se hizo uso de las técnicas de cultivo celular de células HepG2, seguidamente de conteo celular y viabilidad celular vía azul de tripan, luego la aplicación del respectivo tratamiento, después lisis celular y extracción de proteínas, finalmente se realizó la cuantificación de proteínas totales por BCA y cuantificación específica de LRP1 por densitometría por WB y el respectivo análisis estadístico para validar los resultados obtenidos.

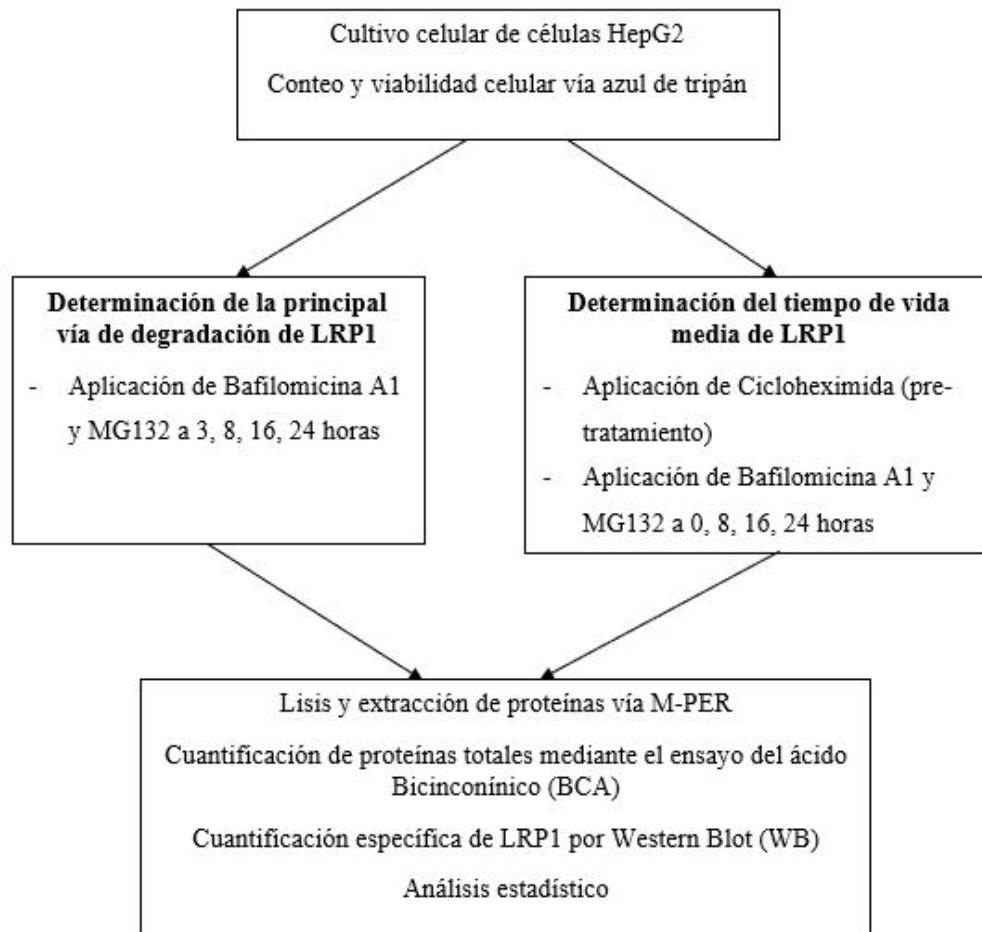


Figura 25: Diseño experimental

2.1 CULTIVO CELULAR

Para el cultivo celular, primero se preparó el medio completo, en la cámara de flujo laminar. Para esto se utilizó una botella de 500 mL de medio MEM a la que se añadió 50 mL de suero fetal de bovino (FBS) como fuente de nutrientes (10%) y 5 mL de la solución de una solución de Penicilina/Estreptomicina (1%), para evitar la contaminación de las células con bacterias tanto gram positivas como gram negativas. Luego de esto, se preparó el medio incompleto (FSM), que se compone de 500 mL de medio MEM y 5mL de solución de Penicilina/Estreptomicina (1%) para evitar contaminación como se indicó antes. Antes del uso de ambos medios, se les coloca en el baño de perlas a 37 °C por 45 minutos.

La investigación se inició con una línea celular HepG2 que estaba en el pasaje 18, almacenada en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Antes de cada ensayo con las células, se desinfectó el área de trabajo (Figura 26) con alcohol al 70%. Inicialmente se desechó el medio de cultivo del frasco de cultivo celular (75 cm²), para luego lavar con 10 mL de una solución salina buffer de fosfato estéril (PBS), la cual se dejó en contacto por dos minutos y luego se deshecho. Después se agregó 5 mL de Tripsina-EDTA (0.25 % tripsina/0.53 mM EDTA) y se incubó por siete minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Culminado el tiempo el frasco fue extraído de la incubadora y se realizó una agitación ligera, se colocó 25 mL de medio incompleto sin suero (FSM) para neutralizar la tripsina y esta fue extraída con una pipeta volumétrica y transferida a un tubo Falcom. A continuación, la suspensión de células fue centrifugada a 1000 rpm durante cinco minutos, terminado este tiempo se decantó el sobrenadante (medio de cultivo), y se resuspendió el pellet de células con 2 mL de medio completo. Seguidamente se realizó el conteo y viabilidad celular mediante la técnica de azul de tripán, cuyo procedimiento se detallará en la siguiente sección.

El medio se cambió cada 48 horas, dependiendo de la confluencia celular. Las células fueron pasadas y/o plaqueadas una vez que se tenía una confluencia razonable (70-90%). Para los tratamientos correspondientes, las células fueron colocadas en placas de 6 pocillos (2.5x10⁵ células/mL) luego del conteo y viabilidad celular. Se les dejó crecer por aproximadamente 2 días y después del período de crecimiento, las células se cambiaron a medio bajo en suero (LSM), el cual contenía MEM con 1% de FBS y 1% de Penicilina-Estreptomicina.

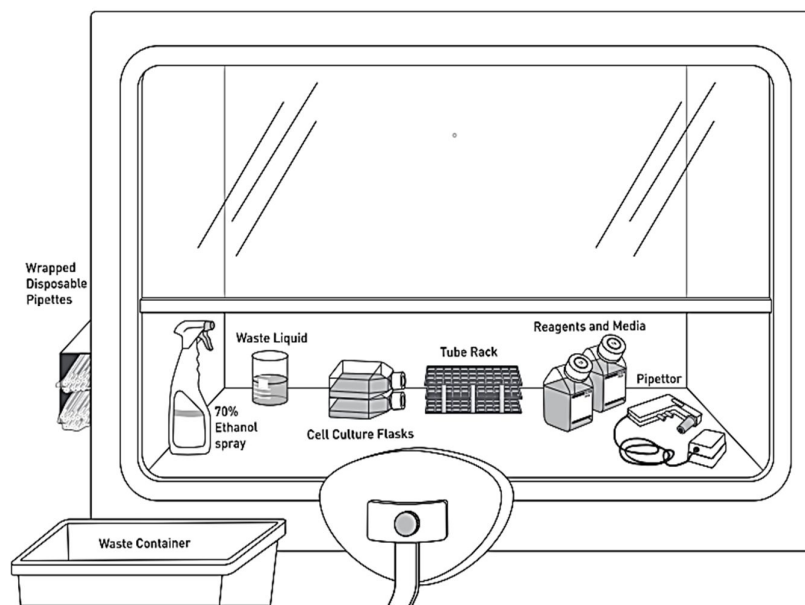


Figura 26. El diseño básico de trabajo en una campana de cultivo celular⁽¹⁸⁷⁾

2.2 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

A partir de la resuspensión del pellet se realizó el recuento celular, para lo cual fueron tomados $30\mu\text{L}$ de la resuspensión y $30\mu\text{L}$ de reactivo Azul de Tripán y se homogenizaron. Posteriormente se tomó $20\mu\text{L}$ del homogenizado y se colocó este a una cámara de conteo, la cual fue insertada al contador celular y por medio del software Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter se obtuvo la cantidad de células vivas/mL junto a un porcentaje de viabilidad entre 70 a 90% en células HepG2 (Figura 27).



Figura 27. Protocolo de conteo y viabilidad celular⁽¹⁸⁸⁾

2.3 LISIS CELULAR Y EXTRACCION DE PROTEINAS

Pasado el tiempo de incubación con los tratamientos, se procedió a retirar el medio de cada frasco de cultivo, y se enjuagó con 1 mL de PBS frío en un baño de hielo. Luego

de descartar el PBS, se procedió a agregar el buffer de lisis y extracción de proteínas (300 μ L de M-PER, 20 μ L de cocktail de inhibidores de proteasas y 20 μ L de EDTA 0.5M), se utilizó una escobilla para raspar la superficie y despegar la capa celular del envase. Posteriormente, se colocó el contenido en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 14000 rpm por 7 minutos, después de este tiempo se extrajo el sobrenadante del lisado y se guardó este en un nuevo tubo Eppendorf a -80°C , para los ensayos de cuantificación de proteínas. Se lisaron las células para extraer las proteínas en los puntos de tiempo 3, 8, 16 y 24 horas.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

Primero se preparó la curva de calibración de proteínas, usando una solución Stock de albúmina a una concentración de 2 mg/mL. Seguidamente se realizó diluciones en cascada tal como se muestra en la Tabla 1. Toda esta preparación se realizó en un baño de hielo para su preservación y para evitar la degradación de las proteínas al pasar el tiempo.

Tabla 1. Preparación de los estándares de albúmina para la curva de calibración

Estándares	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Diluyente PBS (μL)	Albúmina (μL)
1	2000	0	200 (estándar 0)
2	1000	100	100 (estándar 1)
3	500	100	100 (estándar 2)
4	250	100	100 (estándar 3)
5	125	100	100 (estándar 4)
Blanco	0	200	0

La muestra se preparó diluyendo 20 μ L del sobrenadante obtenido de la lisis realizada hasta 60 μ L con PBS. En paralelo, se preparó suficiente reactivo de trabajo en una proporción de Reactivo A: Reactivo B (50:1) del kit de cuantificación de proteínas y se vertió en un envase de reactivo listo para usar. Finalmente, para la preparación de la placa a leer, se resuspendió y se colocó 20 μ L de los estándares y muestras en los pozos (se hizo por triplicado) (Figura 28) y luego se agregó 200 μ l de reactivo de

trabajo. Seguidamente se llevó al agitador de microplacas por 1 minuto y se incubó por 30 minutos a 37° C. Se llevó al lector de placas y se leyó a una longitud de onda de 562 nm.

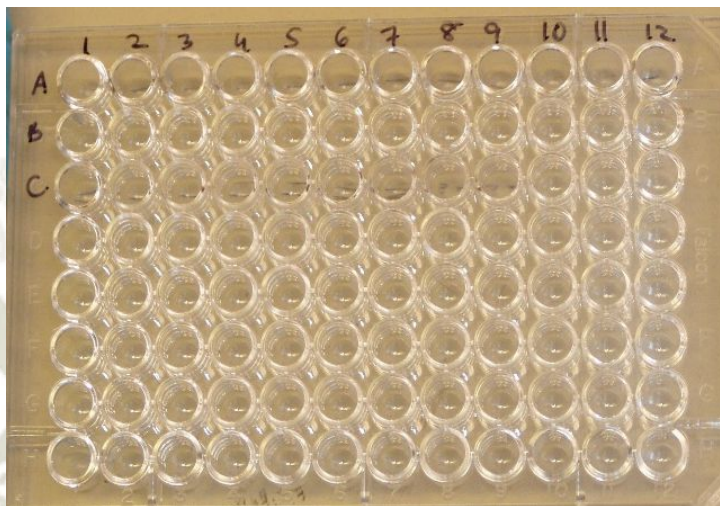


Figura 28. Placa de 96 pocillos usado para el BCA

2.5 CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LRP1 POR WESTERN BLOT

A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Luego de realizado el ensayo de BCA y conocida la concentración de las proteínas totales, se realizó una dilución para tener 40 μ L de 500 μ g/mL de proteínas. Se diluyó en SDS, el cual no debe superar el 25% por lo que se utilizó 10 μ l para el total que es 40 μ l y se completó con PBS. Luego se centrifugó a 15000 rpm por 2 minutos y se llevó al bloque de calentamiento seco a 95°C por 5 minutos para la desnaturalización y reducción de proteínas.

B. ELECTROFORESIS

Se preparó el buffer de corrida que consta de Tris Glycine SDS Buffer 10X. Se hizo una dilución 1/10 ya que se requería una concentración de 1X para lo cual se toma 50 mL del buffer y 450 mL de agua destilada. Se usó gel de agarosa 7.5% Mini Protein TGX. Luego se armó la cuba de electroforesis y se colocó el gel y se agregó el buffer de corrida desde el centro. En uno de los pocillos se agregó stained protein ladder (5 μ L) y en el resto de los pocillos se agregó las muestras (40 μ L). Las condiciones de corrida fueron: Voltaje = 125 V / Intensidad de corriente = 3 A / Potencia = 300 W / T = 50 minutos.

C. ELECTROTRANSFERENCIA

Inicialmente, se cortó moldes de papel filtro y membrana de nitrocelulosa. Después, se les sumergió en un cámara de vidrio con Buffer de transferencia. Luego de terminada la corrida electroforética se retiró el gel y se preparó el sándwich en el orden según la Figura 29.



Figura 29. Electrotransferencia de proteínas del gel a la membrana⁽¹⁸⁵⁾

Finalmente, se colocó en el minirack del TRANS-BLOT (luego de la tercera o cuarta capa se le pasó el rodillo a fin de evitar que queden burbujas) y se agregó buffer de transferencia en la parte inferior y superior del mini rack. Las condiciones de corrida fueron: Voltaje = 25 V / Intensidad de corriente = 1.3 A / T = 7 minutos.

D. BLOQUEO

Se retiró la membrana y se lavó con PBS hasta cubrir la membrana, luego se llevó a agitación suave por 1 minuto y se desechó el líquido para eliminar totalmente el buffer de transferencia. Luego, se agregó colorante rojo de Ponceau hasta cubrir y de nuevo se llevó a agitación suave hasta que aparezcan las bandas y se recicló el contenido. Seguidamente, se lavó con PBS hasta cubrir, se llevó a agitación suave por 1 minuto y se desechó, se repitió este paso 2 veces. Finalmente se añadió leche al 5% (Non-fat powder milk en TBS T) hasta cubrir por 1 hora para bloquear la membrana y se desechó este al acabar el tiempo.

E. INCUBACION CON ANTICUERPOS Y DENSITOMETRIA

Primero se preparó 7 mL de anticuerpo primario (Rb mAb to LRP1) a una dilución de 1:10000 en leche al 5 %, para agregarlo a la membrana y dejarlo en agitación suave

por 12 horas o toda la noche a 4 °C. Luego se lavó con TBS T hasta cubrir y nuevamente se llevó a agitación suave por 5 minutos (se repitió este paso tres veces). Después se preparó 7 mL de anticuerpo secundario (Goat pAb to Rb HRP) a una dilución de 1:2000 en leche al 5%, para agregarlo a la membrana y dejarlo en agitación suave por 1 hora a temperatura ambiente. Posterior a esto se lavó con TBS T hasta cubrir y se llevó a agitación suave por 5 minutos (se repitió este paso por tres veces) y se agregó 6 mL de la solución estable de peróxido y luminol en una proporción de 1:1, se llevó a agitación suave por 5 minutos.

Finalizado el tiempo de incubación de la membrana con los anticuerpos, se desechó este y se procedió a escanear las manchas en el escáner. Posterior a este proceso, se devolvió la membrana escaneada a la cubeta para ser lavada con TBS tres veces durante 5 minutos. Se preparó 7 mL de anticuerpo primario de β -Actina (Ms mAb to Beta Actin) a una dilución de 1:10000 en leche al 5%, para agregarlo a la membrana previamente lavada con TBS T, luego se pasó a agregar directamente 6 mL de la solución estable de peróxido y luminol en una proporción de 1:1, se llevó a agitación suave por 5 minutos. Finalmente se volvió a escanear las manchas, para luego por medio del software cuantificar las manchas y relacionarlo con el control de carga que es β -actina y el control del tratamiento.

2.6 DETERMINACIÓN DE LA PRINCIPAL VÍA DE DEGRADACIÓN DE LRP1

A. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE TRATAMIENTO: BAFILOMICINA A1 Y MG132

Se preparó una solución Stock de 4 μ M en DMSO de Bafilomicina A1 y una solución Stock de 400 μ M (0,4 mM) en DMSO de MG132 en la cabina de cultivo celular con las condiciones asépticas necesarias.

B. APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO DE BAFILOMICINA A1 Y MG132

Para la aplicación del tratamiento, hay que recordar que se cambió el medio de las células de medio completo a medio bajo en suero aproximadamente 24 horas antes del tratamiento con las drogas.

Primero, se disolvió cada solución stock de Bafilomicina A1 y MG132 en LSM para obtener concentraciones de 10 nM para Bafilomicina A1 y 1 μ M para MG132. Seguidamente se retiró el medio de las placas de 6 pocillos que contienen las células

en estudio para después agregar las soluciones de Bafilomicina A1 a 10 nM y MG132 a 1 μ M previamente preparadas. Los grupos control contenían DMSO en LSM para tener en cuenta los efectos del DMSO. Hay que considerar que para todos los grupos de tratamientos la concentración final de DMSO fue menos del 0.5%. Las células se trataron con 2 mL/pocillo. Se detuvieron los tratamientos a diferentes tiempos como son 3, 8, 16, y 24 horas. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas totales y de LRP1, y finalmente se realizó el análisis estadístico.

2.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA Y NO TÓXICA DE CICLOHEXIMIDA PARA CÉLULAS HEPG2

A. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE TRATAMIENTO: CICLOHEXIMIDA

Primero se disolvió alrededor de 33,8 mg de Cicloheximida en 2 mL de DMSO para lograr una concentración de 60 mM (0,06 M). Seguidamente, se hicieron diluciones en cascada con el fin de hacer soluciones de concentraciones de 1,8 mM, 6 mM y 18 mM de Cicloheximida. Cuando se añadieron a LSM, las concentraciones de Cicloheximida fueron de 3, 10, 30 y 100 μ M, respectivamente

B. APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO DE CICLOHEXIMIDA

Al igual que en la primera parte, hay que recordar que 24 horas antes se cambió el medio completo en el que están las células a medio bajo en suero para preparar a las células para el tratamiento. Primero, se retiró el medio de las placas de 6 pocillos que se usó, para luego agregar las diferentes soluciones de Cicloheximida disueltas en LSM previamente preparadas, a los pocillos. El grupo control constaba solo de DMSO en LSM para tener en cuenta los efectos del DMSO. Las células se trataron con 2 mL/pocillo. Hay que considerar que para todos los grupos de tratamientos la concentración final de DMSO fue menos del 0.5%. Se detuvo el tratamiento a las 24 horas, ya que se comprobó que es el mejor tiempo en el cual se ve la expresión de LRP1 en la primera parte, esto será justificado en el capítulo de resultados y discusiones. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas totales y de LRP1, y finalmente se realizó el análisis estadístico.

2.8 DETERMINACIÓN DE LA VIDA MEDIA DE LRP1 Y EL EFECTO DE BAFILOMICINA Y MG132 SOBRE ESTA

A. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRATAMIENTO

- a. CICLOHEXIMIDA: Se usó una solución de 18 mM ya que es la concentración optima no toxica para LRP1 en células HepG2, la cual se justificará en el capítulo de resultados y discusiones.
- b. BAFILOMICINA A1 Y MG132: Se usaron las soluciones Stock de 4 μ M en DMSO de Bafilomicina A1 y 400 μ M (0,4 mM) en DMSO para el caso de MG132.

B. APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO

Al igual que en la primera parte, hay que recordar que 24 horas antes se cambia el medio completo en el que están las células a medio bajo en suero para preparar a las células para el tratamiento. Primero se retiró el medio en el cual estaban las células y se les añadió LSM conteniendo Cicloheximida. Se dejó incubar durante 2 horas para dar lugar a la inhibición de LRP1. Luego se añadió 1 ml más de medio con Cicloheximida y los tratamientos con Bafilomicina A1 o MG132 considerando las cantidades para que se mantenga la concentración usada en la primera parte (10 nM para Bafilomicina A1 y 1 μ M para MG132). El grupo control constaba solo de DMSO en LSM para tener en cuenta los efectos del DMSO. Hay que considerar que para todos los grupos de tratamientos la concentración final de DMSO fue menos del 0.5%. Se detuvieron los tratamientos a diferentes tiempos como son 0, 8, 16 y 24 horas. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas totales y de LRP1, y finalmente se realizó el análisis estadístico.

2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados presentados en este trabajo de investigación fueron expresados como media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm \sigma$). Para las pruebas de significancia estadística fue usado el análisis de varianza ANOVA junto a un posterior análisis con el test de Dunnett, el cual fue utilizado para realizar comparaciones múltiples con el respectivo vehículo a un $p < 0.05$. Todo esto fue analizado con ayuda del software estadístico GraphPad Prisma 6.

A large, faint watermark of the Universidad Católica de Santa María logo is centered on the page. It features a shield with a cross, a book, and a lamp, surrounded by the university's name and the year 1961.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

1. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados están enfocados en dos objetivos, uno de los cuales es la determinación de la principal vía de degradación y la otra es la determinación del tiempo de vida media. Para ello se desarrollaron protocolos similares como son el cultivo celular, cuantificación de proteínas totales (BCA) y cuantificación específica de LRP1 (Western Blot).

1.1 CULTIVO CELULAR

La línea celular HepG2 fue obtenida en el pasaje celular 18 y fue utilizada con los posteriores experimentos hasta el pasaje 28. Este demostró un buen crecimiento utilizando el procedimiento de cultivo celular en esta investigación. El medio MEM (que contiene vitaminas, diferentes aminoácidos, sales inorgánicas y otros componentes) con ayuda del suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina permitió el crecimiento de las células, sin contaminación y con gran rapidez (Figura 30)^(189,190).

Estudios previos realizados por el mismo laboratorio de la MCPHS - Boston en células HepG2 indican que este medio de crecimiento permite un adecuado desarrollo de esta línea celular^(191,192).

Estas células fueron cultivadas en frascos que contenían el medio completo MEM (conteniendo suero fetal bovino 10% y penicilina-estreptomicina 5%), luego de esto se llevaron los frascos a incubar a una temperatura de 37°C y CO₂ al 5% y fueron observadas a diario para comprobar su crecimiento.

Las células llegaban a la confluencia óptima a las 48 horas luego del sembrado y en ese momento se realizaba el pasaje o el cambio de medio completo a medio bajo en suero (para prepararlo para el tratamiento respectivo).

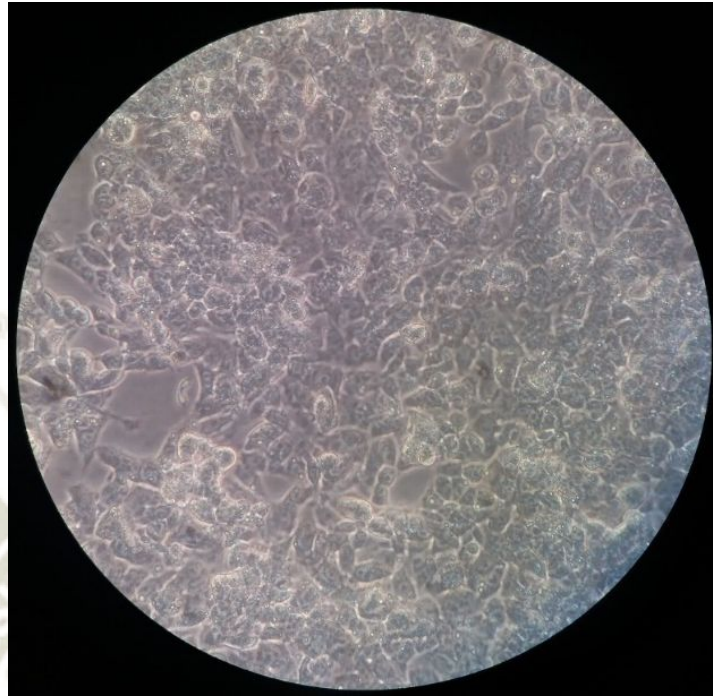


Figura 30. Células HepG2 con 80% de confluencia a 40x

1.2 DETERMINACION DE LA PRINCIPAL VIA DE DEGRADACION DE LRP1 EN CELULAS HEPG2

1.2.1 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

Obtenidas las células, se procedió a realizar el conteo de éstas, donde el desarrollo de la línea celular fue el óptimo. Estos ensayos se realizaron para determinar si la cantidad de células sembradas en los frascos se encontraban en condiciones óptimas de crecimiento. Para el inicio de la determinación de la principal vía de degradación se obtuvo una viabilidad media de 85.43% y una cantidad celular media de 5.03×10^6 células/mL (Tabla 2). El medio y las condiciones de crecimiento fueron correctas para lograr una viabilidad superior a 80 % en esta parte del estudio.

Tabla 2. Número de células HepG2 contadas en el Cell Counter para la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Numero de lectura	Cantidad de células (Células/mL)	Viabilidad (%)
Primera lectura	4.90 x 10 ⁶	84.89
Segunda lectura	5.09 x 10 ⁶	85.30
Tercera lectura	5.10 x 10 ⁶	86.10
Promedio	5.03 x 10 ⁶	85.43
Desviación estándar	0.113	0.615
Coefficiente de variabilidad	2.24	0.72

Algunos autores trabajan con una viabilidad de 70% para su investigación⁽¹⁹³⁾, otros 80%^(90,194,195), también ATTC en una guía publicada sobre cultivo celular para el cuidado de las líneas celulares recomienda de manera general realizar el pasaje celular cuando se tenga una confluencia entre 70-90%⁽¹⁹⁶⁾, bibliografía sobre investigación *in vitro* en hepatocitos recomienda 80%⁽¹⁴⁸⁾ y en el laboratorio donde se realizó la investigación considera una viabilidad adecuada entre 70-95%⁽¹⁹⁷⁾. Por lo cual nuestros resultados están dentro de los rangos tanto de autores externos del laboratorio como del laboratorio mismo. De esta manera garantizamos la expresión correcta de todos los componentes inherentes a esta línea celular en la siguiente generación de células cultivadas tanto para la propagación celular como para los tratamientos realizados. La razón fundamental del resultado de una buena viabilidad se debe a que las condiciones brindadas fueron las adecuadas, además que el medio MEM favoreció la alimentación de éstas y por ende su correcto desarrollo.

1.2.2 DETERMINACIÓN DE LA PRINCIPAL VÍA DE DEGRADACIÓN DE LRP1

Para determinar la principal vía de degradación de LRP1 en células HepG2, se estudió los efectos de dos compuestos capaces de inhibir la degradación de proteínas, Bafilomicina A1 (inhibidor de la vía lisosomal-autofágico) y MG132 (inhibidor de la vía ubiquitina-proteosoma) a diferentes tiempos como son 3, 8, 16 y 24 horas en las

células HepG2; para luego cuantificar el acumulo de LRP1 en el tiempo (por el efecto de la droga que inhiba la misma y así poder determinar cuál es su vía de degradación).

Se usó una concentración de Bafilomicina A1 de 10 nM ya que en estudios anteriores esta concentración era la adecuada para estudiar la degradación proteolítica por la vía lisosomal en células HepG2 en presencia o ausencia de Rosiglitazona⁽¹⁹¹⁾, vale recalcar que esta misma concentración se usó en una investigación de transfección en células HeLa (células de carcinoma cervical) en presencia de cloroquina y Bafilomicina A1⁽¹⁹⁸⁾. También se sabe que esta concentración inhibe la acidificación y la degradación proteolítica en los lisosomas en células A341 (células de carcinoma epidermoide humano)⁽¹⁹⁹⁾. En otra investigación se estudió la hipoxia inducida por autofagia en células CCL39 (células de *Cricetus griseus*, hámster chino) con ayuda de Bafilomicina A1 a 10 nM. Por lo cual, esta concentración es la adecuada para inhibir la vía lisosomal en células HepG2.

Se usó una concentración de MG132 de 1 μ M ya que en estudios anteriores esta concentración era la adecuada para estudiar la degradación proteolítica por la vía ubiquitina-proteosoma en células HepG2 en presencia o ausencia de Rosiglitazona⁽¹⁹¹⁾. Otra investigación estudió la agregación proteica y la citotoxicidad que provoca MG132 en esta concentración en células HepG2^(192,197). Además, en otro estudio se comprobó la viabilidad de 0.25 μ M, 0.5 μ M y 1 μ M de MG132 en células HepG2 resultando que 1 μ M de MG132 reduce la viabilidad celular en un 20%, mientras que 0.5 μ M reduce al 40% la viabilidad celular y 0.25 μ M decrece la viabilidad al 50%⁽²⁰⁰⁾. Otro estudio comprobó la viabilidad en células HeLa a diferentes concentraciones de MG132 como son 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 30 μ M y cómo es que estas concentraciones afectaban a la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno)⁽¹³⁴⁾. Es así que la concentración de 1 μ M estudiada tiene solo una reducción del 20% de viabilidad celular y teniendo precedentes de estudios realizados en el laboratorio con esta concentración es que se eligió esta para los tratamientos en células HepG2 para fines de la inhibición de la vía ubiquitina-proteosoma.

1.2.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

Luego de realizado el tratamiento con las drogas antes mencionadas sobre las células HepG2, se lisaron estas y se extrajeron las proteínas totales vía M-PER a 3, 8, 16 y 24 horas. Posterior a ello se procedió a realizar el ensayo de BCA para cuantificar las proteínas totales en las muestras de los diferentes tiempos. Así, se construyó una curva de calibración de diferentes concentraciones usando albumina como estándar.

Para cada muestra de los diferentes tiempos, se puede visualizar las gráficas de calibración en la Figura 31 (donde el R^2 es siempre superior a 0.9960) y sus absorbancias en la Tabla 3, cuyas absorbancias netas, así como la desviación estándar y coeficiente de variabilidad se encuentran detallados en los Anexos 1, 2, 3 y 4.

Tabla 3. Curva de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego de los tratamientos con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas (n=3)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia			
	3 horas	8 horas	16 horas	24 horas
Blanco	0.085 \pm 0.004	0.074 \pm 0.003	0.063 \pm 0.003	0.064 \pm 0.003
125	0.115 \pm 0.005	0.144 \pm 0.005	0.113 \pm 0.001	0.115 \pm 0.005
250	0.321 \pm 0.013	0.367 \pm 0.010	0.333 \pm 0.013	0.341 \pm 0.010
500	0.481 \pm 0.012	0.501 \pm 0.004	0.491 \pm 0.022	0.506 \pm 0.012
1000	0.938 \pm 0.030	0.925 \pm 0.015	0.921 \pm 0.045	0.894 \pm 0.038
2000	1.802 \pm 0.062	1.775 \pm 0.019	1.876 \pm 0.017	1.769 \pm 0.039

El valor de R^2 de cada gráfica indica que las curvas de calibración son lineales, por lo tanto, pueden ser usadas para extrapolar las concentraciones de proteínas de la muestra. Así, a partir de los datos que nos proporcionó la ecuación respectiva de cada gráfica de calibración se pudo extrapolar los datos para hallar la concentración total de proteínas de las diferentes muestras que corresponden a los diferentes tiempos (Tabla

4) y que cuyas absorbancias netas se encuentran en los Anexos 5, 6, 7 y 8. Recaltar que se realizó la cuantificación de proteínas a 0 horas para asegurarnos que todos los grupos parten de la misma concentración.

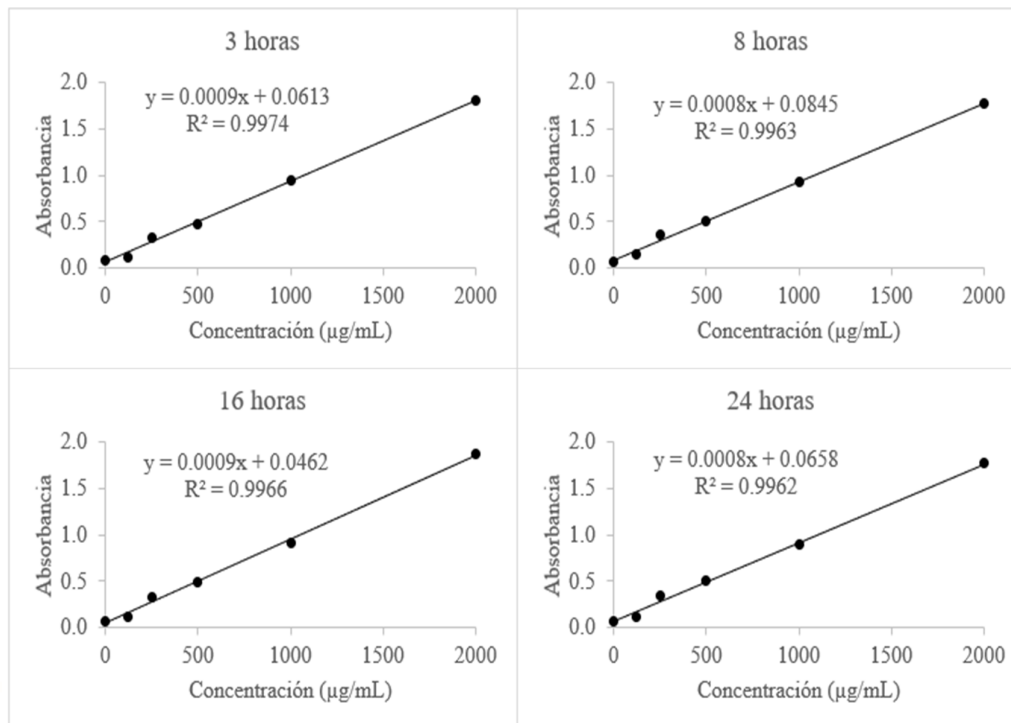


Figura 31. Gráficas de calibración de albúmina para la determinación de proteínas en células HepG2 luego de los tratamientos con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas (n=3)

Tabla 4. Cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas, Baf A1= Bafilomicina A1 (n=3)

Tratamiento	Concentración de proteínas (µg/mL)		
	Control	Baf A1	MG132
3 horas	1240.481±0.018	1241.593±0.019	1252.333±0.008
8 horas	1384.792±0.019	1574.792±0.007	1398.542±0.013
16 horas	1768.593±0.009	1961.556±0.009	1534.148±0.009
24 horas	2111.167±0.012	2347.000±0.017	1334.083±0.005

Como se puede apreciar en la Figura 32 la concentración de proteínas está en aumento en relación directa al paso de las horas. También se observa que hay una disminución significativa de la concentración de proteínas a partir de las 16 horas en células HepG2 tratadas con MG132 en comparación con el grupo control. Por el contrario, se puede apreciar que hay un aumento significativo a partir de las 8 horas en la concentración de proteínas en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1 en comparación con el grupo control, esto pudiera ser porque Bafilomicina A1 muestra efecto significativo inhibiendo la vía lisosomal-autofágica luego de las 3 horas, por ello a las 3 horas no hay una diferencia significativa entre células tratadas con Bafilomicina A1 y el grupo control.

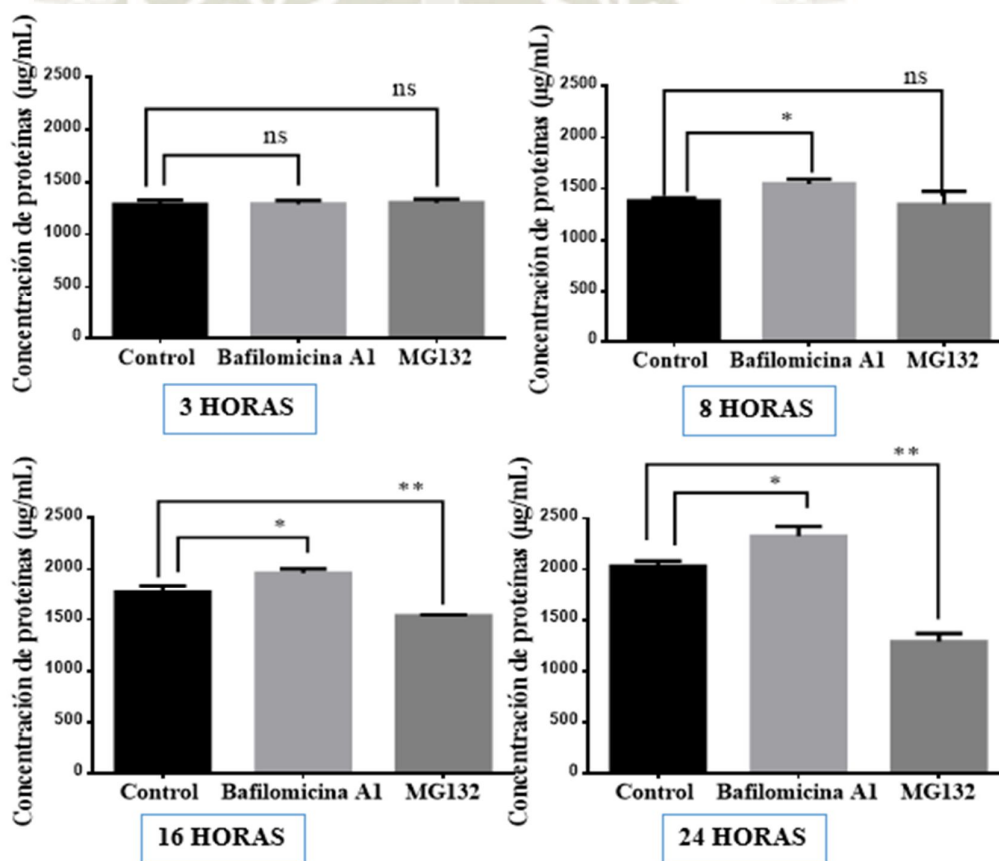


Figura 32. Efecto de Bafilomicina A1 y MG132 sobre la concentración de proteínas en células HepG2 a 3, 8, 16 y 24 horas de tratamiento (n=3; p<0.05, ns=no significativo, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet)

Para realizar el Western Blot es necesario colocar una cantidad específica y conocida de proteínas, para lo cual se realiza el ensayo de BCA. Es común en el diseño de la metodología esta técnica antes del Western Blot, ya que tiene una alta sensibilidad en comparación a Lowry o Biuret y tiene menos variabilidad que Bradford. En una investigación donde se estudió el rol de LRP1 como sustrato competitivo de APP por BACE1, se tuvo que cuantificar LRP1 por medio de Western Blot para lo cual antes tuvieron que cuantificar las proteínas totales en la muestra con la técnica de BCA⁽²⁰¹⁾. Otro estudio sobre el tránsito de β -amiloide bidireccional mediado por LRP1 a través de la barrera hematoencefálica cuantificó las proteínas totales por medio de la técnica de BCA para luego cuantificar LRP1 específicamente por Western Blot⁽¹⁵²⁾. Un estudio realizado en ratones transgénicos que sobreexpresan la APP se evaluó la reducción de LRP1 en las neuronas del hipocampo para ver si este reducía o no proporcionalmente o si alteraba o no la deposición de β -amiloide para lo cual también se hizo uso de la técnica de BCA previo a cuantificar LRP1 por Western Blot⁽²⁰²⁾. Por lo cual se ve necesario su uso previo al Western Blot ya que como se dijo antes tiene características superiores a otras técnicas de ensayo de cuantificación de proteínas.

La técnica de BCA se fundamenta en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} del sulfato cúprico (Reactivo B) por acción de algunos aminoácidos como cisteína o el enlace peptídico en un medio alcalino que se da gracias al NaOH 0.1M (Reactivo A), para luego ser quelado con 2 moléculas del ácido bicinónico lo cual forma un complejo que da una coloración morada proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

1.2.2.2 CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LRP1 POR WESTERN BLOT

Luego se realizó la cuantificación de LRP1 en las diferentes muestras, para ello primero se normalizo la cantidad de proteínas a 500 $\mu\text{g/mL}$ con SDS y PBS e incubándolo durante 5 minutos a 95°C para que así pierdan su conformación nativa las proteínas por acción de la SDS. Posterior a esto, se sembró las muestras en los pocillos del gel de electroforesis sin olvidar el marcador (Ladder), para que se dé la separación de las proteínas por acción de electricidad. Las proteínas con alto peso molecular se quedaron retenidas en la parte superior y las proteínas con un peso molecular menor se abrieron paso hacia abajo. Después se procedió a realizar la electrotransferencia del gel a la membrana, para lo cual se procedió a realizar el “sandwich” en el cual la membrana va posicionada hacia la parte inferior ya que, al ser una migración de cátodo

a ánodo, la fuente de poder permite el desplazamiento de las machas del gel a la membrana.

Luego se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo primario y luego realizar el bloqueo de la membrana con leche, la cual tiene una gran cantidad de proteínas y bloquea todos los espacios libres que no estén ligados al anticuerpo primario, después se incuba con el anticuerpo secundario para finalmente agregarle el reactivo quimioluminiscente, escanearlo y poder cuantificar LRP1.

Luego de realizado el escaneo de las bandas de LRP1 (Figura 33), se obtuvo las densitometrías de los tratamientos a diferentes horas, en la cual se puede observar la disminución de los niveles de LRP1 cuando es tratado con MG132 (inhibidor de la vía ubiquina-proteosoma) luego de las 8 horas, y por el contrario se observa la acumulación de LRP1 cuando es tratado con Bafilomicina A1 (inhibidor de la vía lisosomal-autofágica), luego de las 8 horas también.

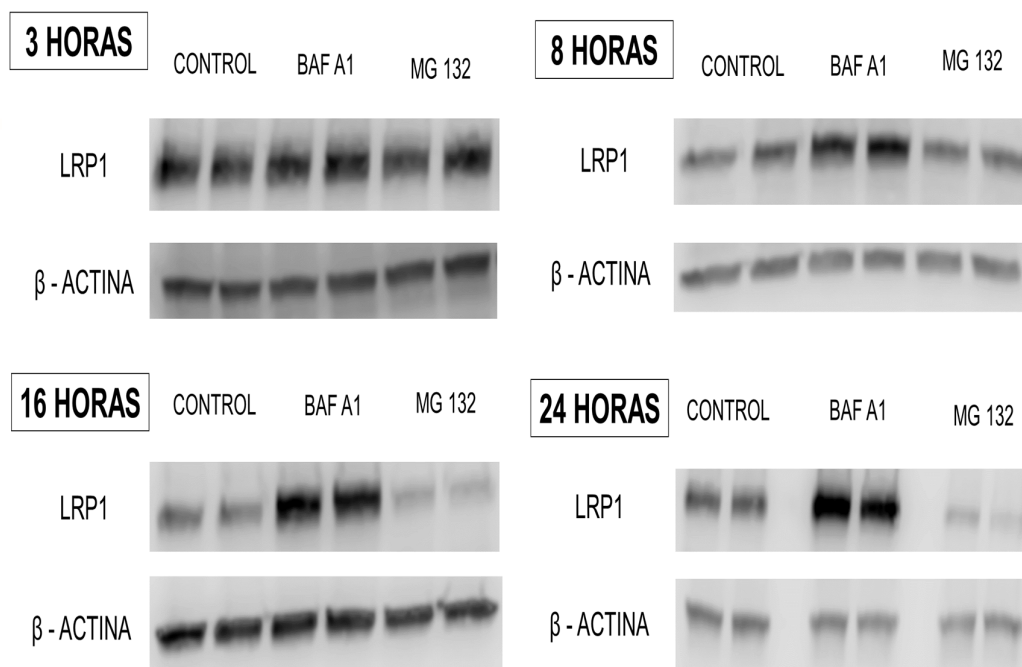


Figura 33. Western Blot representativo del tratamiento de LRP1 con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3)

De acuerdo con la media del factor de corrección (FC) obtenido de la relación entre la densitometría de LRP1 del control con beta-actina para luego relacionar cada muestra con

el control (Tabla 5), se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y a partir de esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína LRP1 en las células expuestas a Bafilomicina A1 y MG132.

La proteína β -actina se usó como control de carga ya que es una proteína que está en las células y tiene función motora, contráctil, entre otras. Este control nos garantiza que la carga de proteína es la misma en todo el gel ya que es usada para normalizar los niveles de proteína detectados, las proteínas de todos los carriles son transferidas a la membrana con la misma eficiencia, la incubación del anticuerpo (primario, y de ser necesario secundario también), y la detección de la señal son uniformes en todos los carriles. Se muestra en la Tabla 5 los niveles de LRP1 de las diferentes muestras y que cuyas densitometrías están en los Anexos 9, 10, 11 y 12.

Tabla 5. Niveles de LRP1 expresados en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3, 8, 16 y 24 horas, Baf A1= Bafilomicina A1 (n=3)

Tratamiento	Control	Baf A1	MG132
3 horas	1.000±0.044	1.094±0.025	1.034±0.030
8 horas	1.000±0.007	2.649±0.054	1.033±0.038
16 horas	1.000±0.023	3.249±0.114	0.744±0.027
24 horas	0.997±0.002	3.327±0.056	0.385±0.005

Las muestras de células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas no mostraron efecto significativo al ser tratados con las drogas comparado con el control (Figura 34, 3 horas). Sin embargo, en las muestras de células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1 durante 8 horas se observó un aumento significativo de los niveles de LRP1 a 2.684 de las células tratadas con Bafilomicina A1 comparado con el control, sin embargo, no se observó diferencia significativa con el tratamiento de MG132 (Figura 34, 8 horas). En las muestras de células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas se observó un aumento significativo de los niveles de LRP1 a 3.249 de las células tratadas con Bafilomicina A1 comparado con el control. Sin embargo, se observó una disminución de los niveles de LRP1 con

una diferencia significativa de 0.744 con el tratamiento de MG132 (Figura 34, 16 horas). En las muestras de células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas se observó un aumento significativo de los niveles de LRP1 a 3.327 de las células tratadas con Bafilomicina A1 comparado con el control. Sin embargo, se observó una disminución aun mayor de los niveles de LRP1 con una diferencia significativa de 0.385 con el tratamiento de MG132 (Figura 34, 24 horas). Esto posiblemente se deba a que MG132 tiene efectos citotóxicos desde 16 horas de tratamiento.

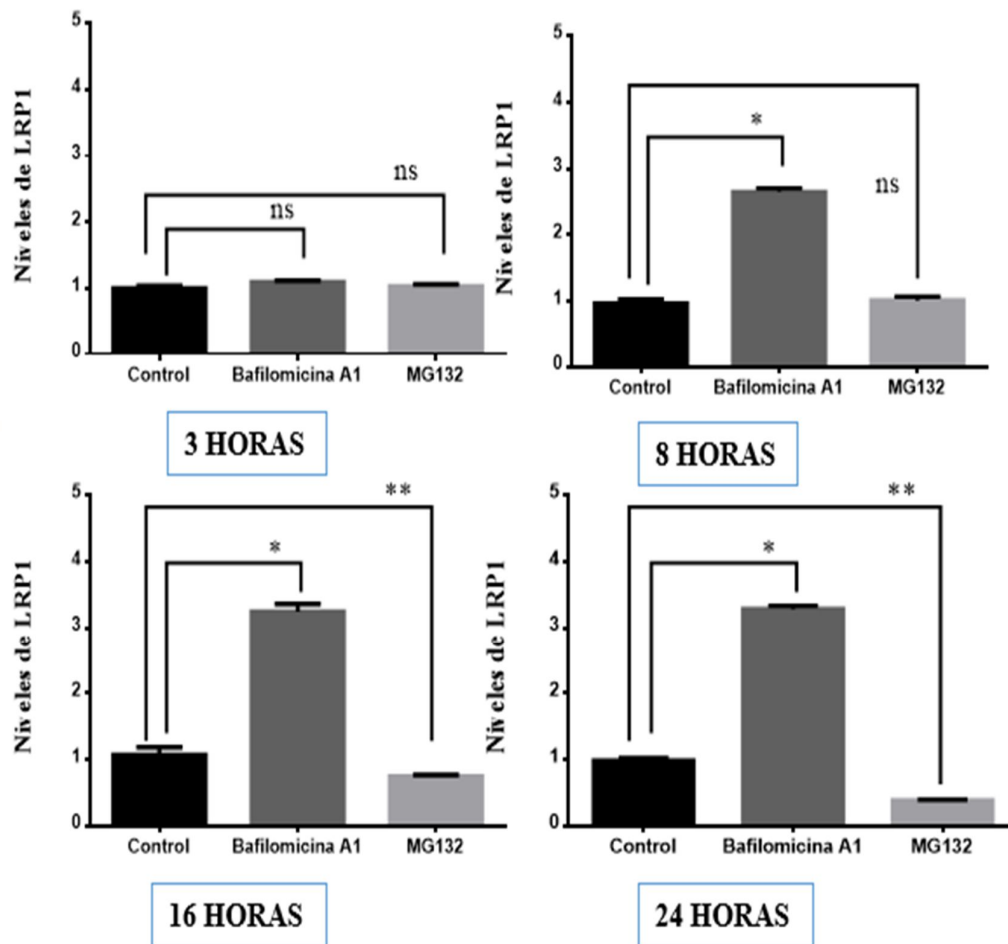


Figura 34. Efecto de Bafilomicina A1 y MG132 sobre LRP1 en células HepG2 a 3, 8, 16 y 24 horas de tratamiento (n=3; p<0.05, ns=no significativo, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet)

En un estudio realizado por Cal R et al, en 2013, se demostró que la agregación de lipoproteínas de baja densidad (agLDL) disminuye la ubiquitinización de LRP1 en células de músculo liso vascular humano (VSMC). A través de este estudio, una de las manchas mostró que MG132 redujo la ubiquitinización de LRP1, y la expresión de la proteína LRP1 aumentó cuando se añadieron 10 μM de MG132 a las células durante 18 horas⁽²⁰³⁾. En otro estudio, se demostró que la vida media de la subunidad 515kDa de LRP4 en células HepG2 se prolongaba con la adición de 20 μM de MG132⁽²⁰⁴⁾. Los datos de estos estudios podrían indicar que LRP1 también sería preservado cuando UPS es inhibido por MG132, pero estudios recientes realizados en el Laboratorio de la Universidad de MCPHS presentaron resultados diferentes, LRP1 no se conservó con la adición de MG132 en células HepG2. Los niveles de LRP1 aumentan significativamente con el tratamiento de Bafilomicina A1, esto indica que la inhibición del sistema de degradación lisosomal preserva la vida media LRP1, por lo tanto, esta es la principal vía de degradación de LRP1 en células HepG2. Esta diferencia podría deberse a que en los estudios citados se usaron en células diferentes de HepG2 u otra proteína de la familia de los receptores de lipoproteína de baja densidad (LRP).

Curiosamente hay una disminución significativa de LRP1 desde las 16 horas hasta las 24 horas en el tratamiento con MG132. El mecanismo por el cual MG132 reduce los niveles de LRP1 al inhibir la vía ubiquitina-proteasoma (UPS) no es claro, por lo que se requiere mayores experimentos para entenderlo. Pero se sabe que se produce agregación proteica, citotoxicidad y por ende muerte celular, la cual fue comprobada en investigaciones pasadas^(192,197,200,205).

1.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA Y NO TÓXICA DE CICLOHEXIMIDA PARA CÉLULAS HEPG2

1.3.1 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

Para el inicio de la determinación de la concentración óptima y no tóxica de Cicloheximida para células HepG2 se obtuvo una viabilidad celular media de 87.567% y una cantidad celular media de 5.260×10^6 células/mL (Tabla 6). El medio y las condiciones de crecimiento fueron correctas para lograr una viabilidad superior a 80% en esta parte del estudio.

Tabla 6. Número de células HepG2 contadas en el Cell Counter para la determinación de la concentración óptima y no tóxica de Cicloheximida

Numero de lectura	Cantidad de células (Células/mL)	Viabilidad (%)
Cuarta lectura	5.15 x 10 ⁶	86.50
Quinta lectura	5.35 x 10 ⁶	88.90
Sexta lectura	5.28 x 10 ⁶	87.30
Promedio	5.260 x 10 ⁶	87.567
Desviación estándar	0.101	1.222
Coefficiente de variabilidad	1.93	1.40

1.3.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION ÓPTIMA Y NO TÓXICA DE CICLOHEXIMIDA

Para determinar la concentración óptima de Cicloheximida (inhibidor de proteínas) para inhibir LRP1 en células HepG2 sin que sea tóxica, se trató las células HepG2 con diferentes concentraciones de Cicloheximida (3, 10, 30 y 100 μ M) durante 24 horas, ya que en los experimentos anteriores (determinación de la principal vía de degradación) se observó que 24 horas es el mejor tiempo para la expresión de LRP1. Al ver la disminución de los niveles de LRP1 después de las 24 horas con las diferentes concentraciones de Cicloheximida, se escogió la concentración óptima.

Las células HepG2 son resistentes a la apoptosis mediada por el receptor de la muerte. Mantener el estado de la resistencia a menudo requiere proteína nueva o síntesis de ARN. Por lo tanto, el tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas, tales como Cicloheximida (CHX), o inhibidores de la síntesis de ARN, tales como Actinomicina D (ActD) puede sensibilizar a las células resistentes. Por lo cual CHX podría inducir a la apoptosis a las células HepG2⁽²⁰⁶⁾. Sin embargo, en una investigación donde se estudió la viabilidad de células HepG2 frente a diferentes concentraciones de CHX desde 0, 0.5, 1, 5, 10 y 40 μ M, se puede observar que el máximo efecto se vio a 10 μ M y que con 40 μ M ya no se obtiene más efecto sino que forma un ‘efecto plateau’, teniendo una viabilidad por encima del 80%⁽¹⁹⁵⁾. Teniendo estos precedentes, se optó

por escoger estas concentraciones de Cicloheximida (3, 10, 30 y 100 μM) para ver cuál era el mejor en células HepG2 para nuestro estudio en específico.

1.3.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

Luego de realizado el tratamiento con las diferentes concentraciones de Cicloheximida sobre las células HepG2 se lisaron y se extrajeron las proteínas totales vía M-PER a las 24 horas de tratamiento. Posterior a esto, se procedió a realizar el ensayo de BCA para la cuantificación de proteínas totales, para lo cual se realizó una curva de calibración de diferentes concentraciones usando albumina como estándar para la muestra de 24 horas, su gráfica de calibración se puede observar en la Figura 35 (donde el R^2 es superior a 0.9985) y sus absorbancias en la Tabla 7, cuyas absorbancias netas se encuentran en el Anexo 13.

Tabla 7. Curva de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida a 24 horas (n=3)

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia
	24 horas
Blanco	0.082 \pm 0.001
125	0.205 \pm 0.002
250	0.334 \pm 0.000
500	0.569 \pm 0.013
1000	0.931 \pm 0.009
2000	1.819 \pm 0.002

El valor de R^2 de la gráfica de calibración indica que la curva de calibración es lineal, por lo tanto, su ecuación puede ser usada para extrapolar las concentraciones de proteínas de la muestra. Así, a partir de los datos que nos proporcionó la ecuación respectiva de la gráfica de calibración se pudo extrapolar los datos para hallar la concentración total de proteínas de la muestra (Tabla 8) y que cuyas absorbancias netas se encuentran en el Anexo 14.

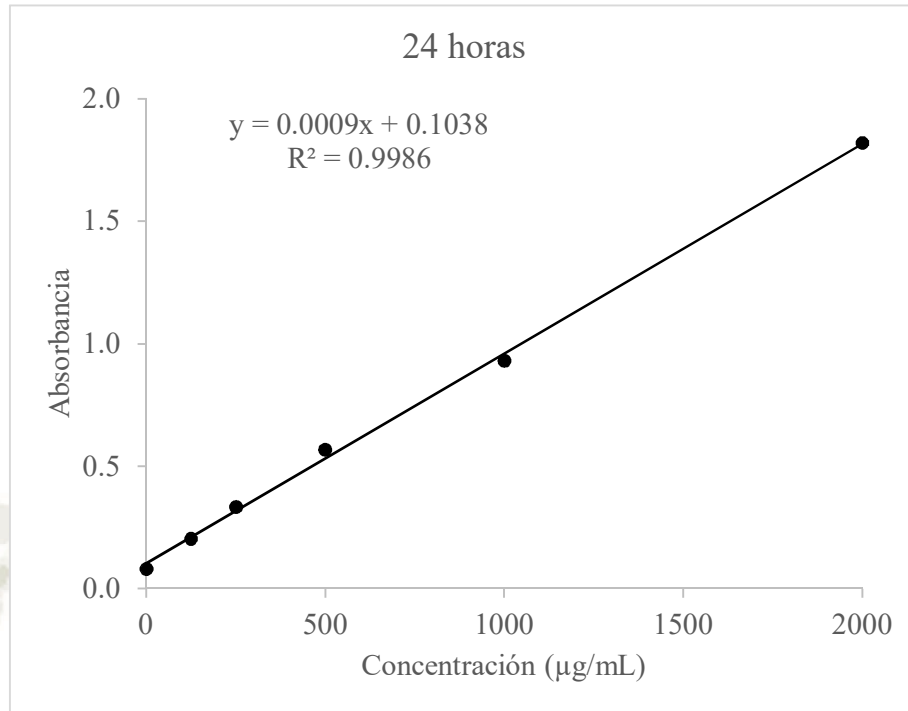


Figura 35. Gráfica de calibración de albúmina para la determinación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Cicloheximida a 24 horas (n=3)

Tabla 8. Cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas (n=3)

Tratamiento	Concentración de proteínas ($\mu\text{g/mL}$)
	24 horas
Control	1322.889 \pm 0.006
3 μM	1275.852 \pm 0.002
10 μM	1044.741 \pm 0.004
30 μM	918.074 \pm 0.005
100 μM	951.407 \pm 0.004

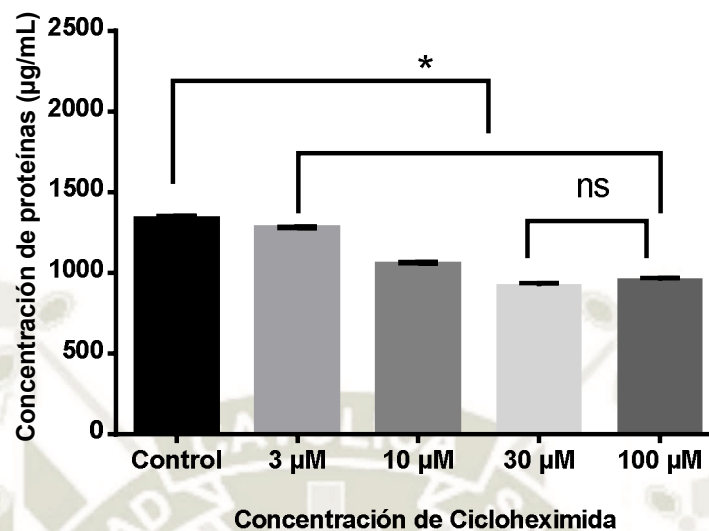


Figura 36. Efecto de Cicloheximida a diferentes concentraciones sobre la concentración de proteínas en células HepG2 con 24 horas de tratamiento (n=3, p<0.05, ns=no significativo, *=diferencia significativa, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet, post t par)

En la Figura 36 se puede apreciar la disminución de la cantidad de proteínas dependiente de la concentración de Cicloheximida, esto quiere decir que Cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas al nivel de los ribosomas, específicamente inhibe a la peptidiltransferasa, la cual formaría el enlace peptídico. Al no formarse el enlace peptídico, no se forma la proteína^(207,208). Es por ello que se observa una disminución en la cantidad de proteínas al aumentar la concentración de Cicloheximida. Sin embargo, se observa que 30 y 100 µM tienen el mismo efecto inhibitorio sobre las células HepG2.

Por lo tanto, la solución de 30 µM puede usarse para inhibir las proteínas totales en células HepG2, sin ser tóxico para estas, teniendo su máximo efecto a esta concentración ya que a una concentración de 100 µM el efecto es el mismo.

1.3.2.2 CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LRP1 POR WESTERN BLOT

Realizado el escaneo de las bandas de LRP1, se obtuvo la densitometría del tratamiento a diferentes concentraciones de Cicloheximida (Figura 37), en la cual se puede observar la disminución de los niveles de LRP1 a medida que aumenta la

concentración de Cicloheximida. Se muestran en la Tabla 11 los niveles de LRP1 de la muestra y que cuya densitometría está en el Anexo 15.

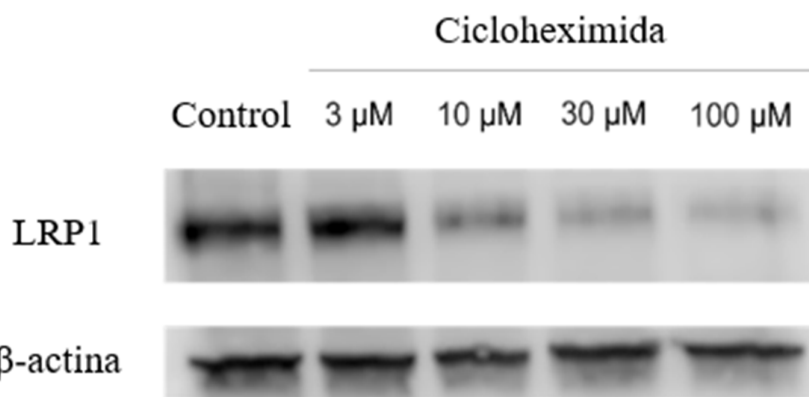


Figura 37. Western Blot representativo de los niveles de LRP1 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas (n=3)

De acuerdo con la media del FC obtenido de la relación entre la densitometría de LRP1 del control con β -actina para luego relacionar cada muestra con el control (Tabla 9) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 y a partir de esto se tomó en cuenta si había incremento o disminución de la proteína LRP1 en las células expuestas a las diferentes concentraciones de Cicloheximida (100, 30, 10 y 3 μ M).

Tabla 9. Niveles de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida durante 24 horas (n=3)

Tratamiento	Niveles de LRP1
Control	1.000±0.000
3 μ M	0.881±0.028
10 μ M	0.268±0.009
30 μ M	0.122±0.005
100 μ M	0.105±0.002

Como se muestra en la Figura 38, hay cada vez un menor nivel de LRP1 durante 24 horas con una concentración creciente de Cicloheximida en células HepG2 y esto debido a que la Cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas en las células HepG2. No

se encontró diferencia significativa entre los niveles de LRP1 de células HepG2 tratadas con 3 μM de Cicloheximida (0.881) y el control, pero se encontró diferencia significativa entre niveles de LRP1 de células HepG2 tratadas con 10 μM de Cicloheximida (0.268) en comparación con el control, es decir disminuyó en un 73.2%. Para la comparación entre 30 μM de Cicloheximida (0.122) y el control se encontró que disminuyó significativamente en un 87.8% y para la comparación entre 100 μM de Cicloheximida (0.109) con el control se encontró también que disminuyó significativamente, pero esta vez en un 89.1%. Además, no hay diferencia significativa entre los niveles de LRP1 en células HepG2 tratadas con 30 μM y 100 μM , de Cicloheximida esto quiere decir que el efecto es el mismo (se realizó un test t-pareado).

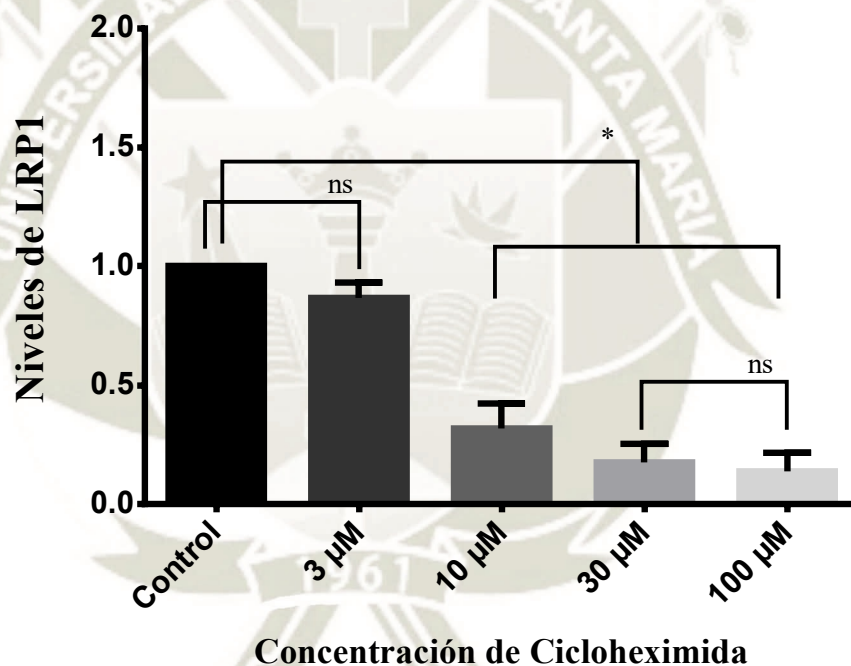


Figura 38. Efecto de Cicloheximida a diferentes concentraciones sobre LRP1 en células HepG2 con 24 horas de tratamiento ($n=3$, $p<0.05$, ns=no significativo, *=diferencia significativa, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet, post t par)

Por lo tanto, se encontró que la concentración de 30 μM para Cicloheximida era la mejor concentración para las células HepG2, ya que era la menor concentración a la cual el efecto de Cicloheximida tenía la mayor significancia. La solución madre de Cicloheximida 30 μM se usó en los ensayos de tiempo de vida media.

En estudios realizados por Dolfi et. al en el departamento de Medicina de la Universidad de New Jersey uso una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de Cicloheximida, es decir 71 μM para realizar los ensayos del tiempo de vida media para la proteína MDM2, evitando así los efectos tóxicos de Cicloheximida⁽²⁰⁹⁾. Otra investigación realizada por Barodia et. al también usa la misma concentración de Cicloheximida, es decir 20 $\mu\text{g/mL}$ para los ensayos del mismo para la determinación del tiempo de vida media de la proteína DISC1⁽²¹⁰⁾. Es así, que en nuestra investigación incluso hemos disminuido esta concentración de Cicloheximida, garantizando el efecto de Cicloheximida sin su toxicidad.

1.4 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LRP1 Y EFECTOS DE BAFILOMICINA A1 Y MG132 SOBRE ESTE

1.4.1 CONTEO Y VIABILIDAD CELULAR

Para el inicio de la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este se obtuvo una viabilidad media de 88.133 y una cantidad celular media de 5.817×10^6 (Tabla 10). El medio y las condiciones de crecimiento fueron correctas para lograr una viabilidad superior a 80% en esta parte del estudio.

Tabla 10. Número de células HepG2 contadas en el Cell Counter para la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre esta (n=3)

Numero de lectura	Cantidad de células (Células/mL)	Viabilidad (%)
Séptima lectura	5.86×10^6	89.60
Octava lectura	6.08×10^6	90.20
Novena lectura	5.51×10^6	84.60
Promedio	5.817×10^6	88.133
Desviación estándar	0.287	3.075
Coefficiente de variabilidad	4.94	3.49

1.4.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA DE LRP1

Se determinó el tiempo de vida media de LRP1 y los efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este, en células HepG2 durante 8, 16 y 24 horas, no se usó 3 horas ya que no hay efecto significativo de Bafilomicina A1 y MG132 sobre LRP1. Se procedió a incubar previamente las células con Cicloheximida para inhibir la síntesis de LRP1 y luego se inhibió las principales vías de degradación para así determinar el tiempo de vida media y comparar este con el efecto de Bafilomicina y MG132.

1.4.2.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES MEDIANTE EL ENSAYO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

Luego de realizado el tratamiento con las diferentes drogas sobre las células HepG2 se lisaron y se extrajeron las proteínas totales vía M-PER a los diferentes tiempos indicados anteriormente. Posterior a ello se realizó el ensayo de BCA con su respectiva grafica de calibración la cual se puede observar en la Figura 39 y las absorbancias de las diferentes concentraciones de albúmina en la Tabla 11 y sus absorbancias netas se puede visualizar en el Anexo 16, 17, 18 y 19.

Tabla 11. Curva de calibración de albúmina para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida, Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas (n=3)

Concentración (µg/mL)	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
Blanco	0.091±0.003	0.089±0.002	0.093±0.000	0.090±0.004
125	0.233±0.008	0.233±0.008	0.246±0.001	0.212±0.008
250	0.349±0.010	0.350±0.011	0.376±0.011	0.327±0.006
500	0.587±0.000	0.587±0.001	0.634±0.004	0.633±0.012
1000	0.995±0.017	0.993±0.016	1.065±0.021	0.951±0.001
2000	1.634±0.016	1.635±0.017	1.864±0.036	1.720±0.011

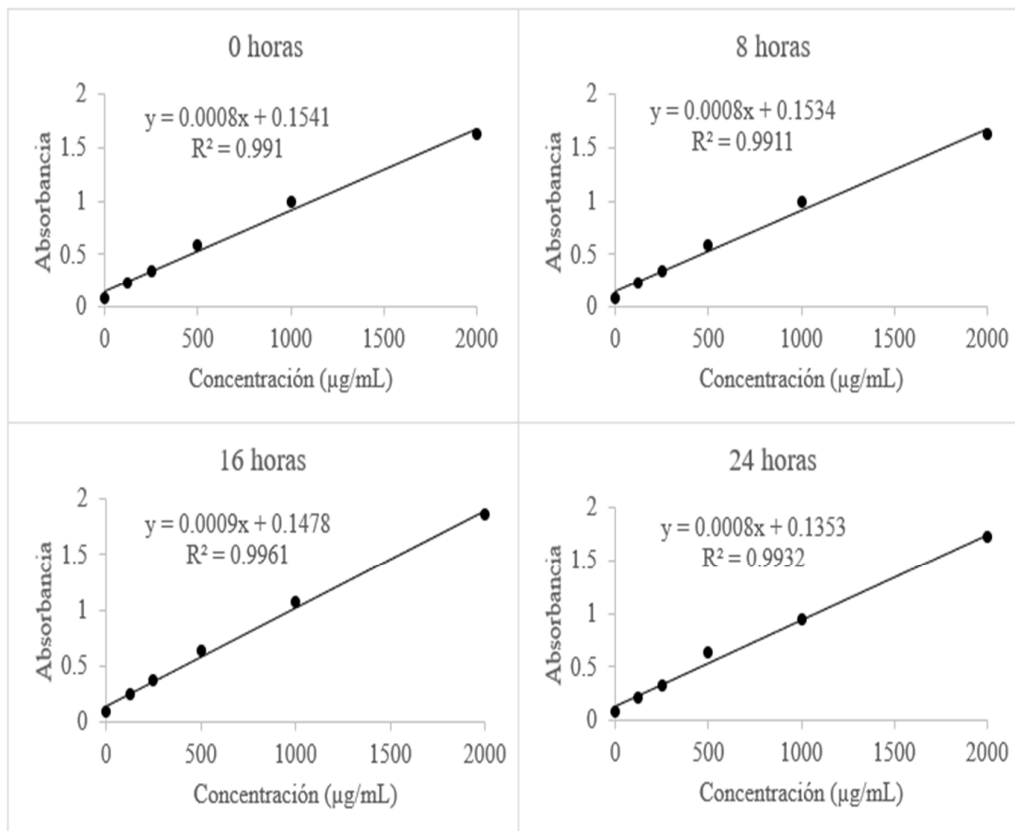


Figura 39. Gráficas de calibración de albúmina para la determinación de proteínas en células HepG2 luego de los tratamientos con Bafilomicina A1 y MG132 a 0, 8, 16 y 24 horas (n=3)

Los valores de R^2 (superiores a 0.9910) de cada gráfica de calibración indican que las curvas de calibración son lineales, por lo tanto, sus ecuaciones pueden ser usadas para extrapolar las concentraciones de proteínas de la muestra. Así, a partir de los datos que nos proporcionó la gráfica de calibración se pudo extrapolar los datos para hallar la concentración total de proteínas de las muestras de los diferentes tiempos a partir de las absorbancias que se muestra en la Tabla 12 y que cuyas absorbancias netas se encuentran en el Anexo 20, 21, 22 y 23.

Tabla 12. Cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas, CHX=Cicloheximida, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3)

Cantidad de proteínas (µg/mL)				
Tto.	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
Control	1218.917±0.008	1211.833±0.002	1219.185±0.003	1211.792±0.006
CHX+ Baf A1	1220.167±0.009	1373.083±0.003	1542.519±0.010	1753.875±0.007
CHX+ MG132	1217.250±0.010	1159.750±0.006	1330.296±0.009	1644.292±0.002

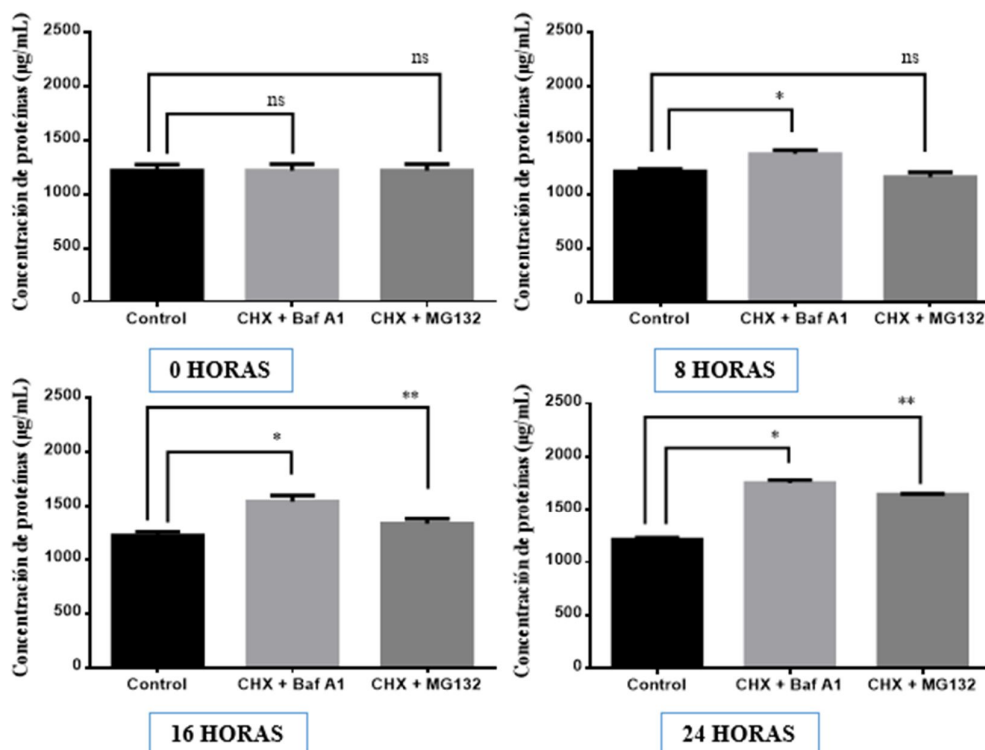


Figura 40. Efecto del tratamiento con Cicloheximida, Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 sobre la cantidad de proteínas en células HepG2 durante 0, 8, 16 y 24 horas, CHX=Cicloheximida, Baf A1=Bafilomicina A1 (n=3; p<0.05, ns=no significativo, ANOVA de una vía, post-hoc Dunnet)

El objetivo de agregar Cicloheximida como pre-tratamiento fue para inhibir la producción de proteínas en las células, para que de esta manera poder ver claramente el efecto de Bafilomicina A1 y MG132 en las proteínas intracelulares. Se evidenció

que la concentración de proteínas en células HepG2 donde solo fueron tratadas con Cicloheximida no cambió durante 0, 8, 16 y 24 horas, esto garantiza que Cicloheximida inhibió la síntesis de proteínas durante por lo menos 24 horas, el cual fue el máximo tiempo de tratamiento. Esto quiere decir que no hubo interferentes como la producción de proteínas nuevas durante todo el tratamiento y que solo las proteínas intracelulares que tenían las células antes de agregarles Cicloheximida se vieron afectadas por Bafilomicina A1 y MG132. En la Figura 40 se puede apreciar que a 0 horas no hay un efecto significativo de las drogas sobre la concentración de proteínas totales en células HepG2, sin embargo, con el tratamiento durante 8, 16 y 24 horas hay un aumento significativo en las células tratadas con CHX + Baf A1 y a 16 y 24 horas hay un aumento significativo en las células tratadas con CHX + MG132 en comparación con las células con CHX. El aumento significativo con Bafilomicina A1 a partir de las 8 horas de tratamiento podría demostrarnos que en células HepG2 hay una gran cantidad de proteínas intracelulares que tienen una vía de degradación lisosomal-autofágico, y el aumento significativo por parte del tratamiento de MG132 podría significar que aunque MG132 está induciendo a apoptosis a las células HepG2, estas se ven protegidas mediante la inhibición de receptores de la muerte por parte de Cicloheximida^(195,206).

1.4.2.2 CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LRP1 POR WESTERN BLOT

Realizado el escaneo de las bandas de LRP1, se obtuvo la densitometría del tratamiento de LRP1 sin tratamiento, tratado con Bafilomicina A1 y con MG132 (Figura 41), en la cual se puede observar la degradación en los diferentes tiempos con las distintas drogas. Se muestran en la Tabla 13 los niveles de LRP1 de las diferentes muestras y que cuyas absorbancias netas están en el Anexo 24, 25 y 26.

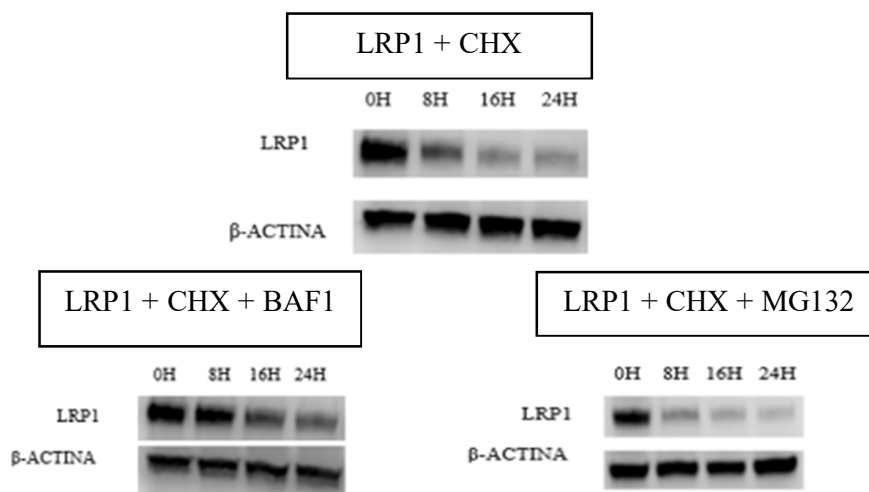


Figura 41. Western Blot representativo de la degradación durante 24 horas de LRP1 con Cicloheximida, tratado con Cicloheximida + Bafilomicina A1 y tratado con Cicloheximida + MG132, CHX= Cicloheximida, Baf A1= Bafilomicina A1 (n=3)

Tabla 13. Niveles de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida + Bafilomicina A1 y Cicloheximida + MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas, CHX= Cicloheximida, Baf A1= Bafilomicina A1 (n=3)

Tratamiento	Tiempo (h)			
	0	8	16	24
Control	1.060±0.007	0.499±0.004	0.269±0.007	0.188±0.007
CHX + Baf A1	1.009±0.017	0.876±0.024	0.718±0.020	0.431±0.017
CHX + MG132	1.052±0.005	0.467±0.015	0.267±0.010	0.198±0.006

De acuerdo con la media del FC obtenido de las muestras (Tabla 13) se consideró que el vehículo estaba en relación a 1 o próximo a 1 y a partir de esto se tomó como 100% este, para sacar en porcentaje de acuerdo a como se degradaba LRP1 durante las 24 horas en las células expuestas tanto a Cicloheximida como a Cicloheximida mas Bafilomicina A1 y Cicloheximida mas MG132.

En la Figura 42 se muestra la gráfica de degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepG2, y que uniendo los diferentes puntos se formó una línea, la cual sería la degradación que sigue esta. Gracias a esta gráfica, se pudo extrapolar el tiempo en el cual hay 50% de LRP1 y se obtuvo 7.67 ± 0.05 horas, este es su tiempo de vida media.

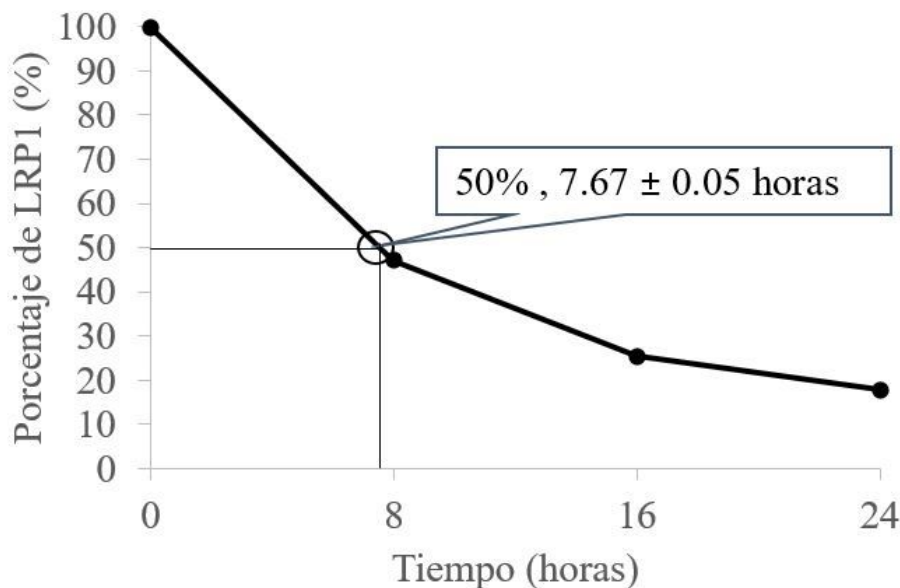


Figura 42. Degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepG2

En la Figura 43 se muestra la gráfica de degradación de LRP1 tratado con Bafilomicina A1 durante 24 horas en células HepG2, y que uniendo los diferentes puntos se formó una línea, la cual sería la degradación que sigue esta proteína al ser tratado con Bafilomicina A1. Gracias a esta gráfica pudimos extrapolar el tiempo en el cual hay 50% de LRP1 tratado con Bafilomicina A1 y se obtuvo 22.03 ± 0.05 horas, como tiempo de vida media al inhibir la vía lisosomal-autofagia. Esto quiere decir que reafirmamos que la vía de degradación lisosomal juega un papel importante en la degradación de LRP1.

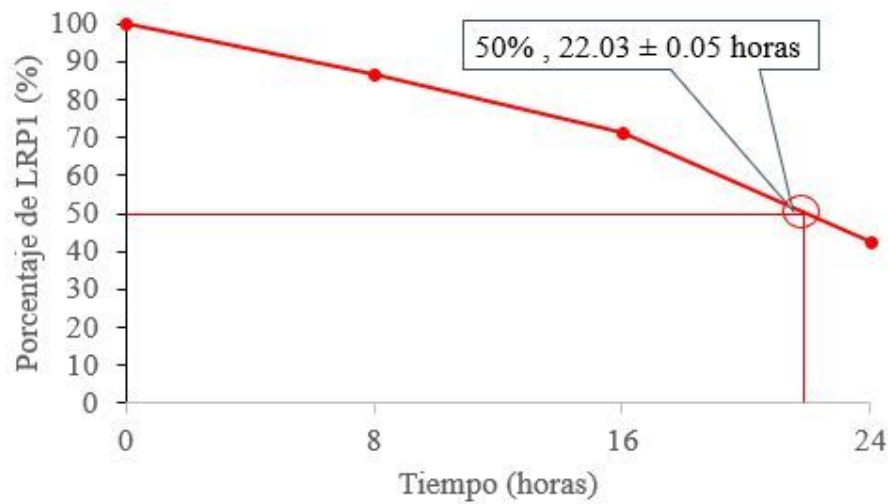


Figura 43. Degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepH2 tratadas con Bafilomicina A1

En la Figura 44 se muestra la gráfica de degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepG2 tratadas con MG132, y que uniendo los diferentes puntos se formó una línea, la cual sería la degradación que sigue esta proteína al ser tratado con MG132. Gracias a esta gráfica pudimos extrapolar el tiempo en el cual hay 50% de LRP1 tratado con MG132 y se obtuvo 7.1 ± 0.1 horas, este es tu tiempo de vida media al inhibir la vía ubiquitina-proteosoma. Esto quiere decir que LRP1 no es degradada por la vía de ubiquitina-proteosoma.

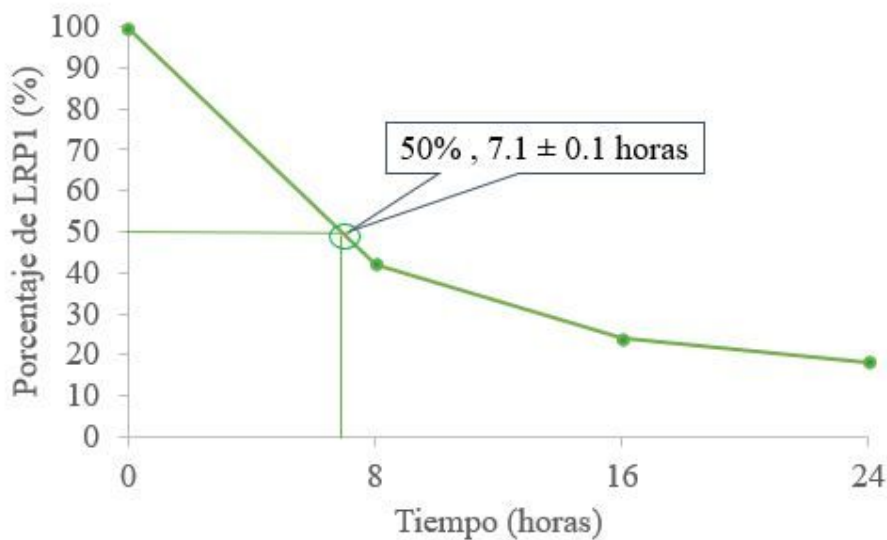


Figura 44. Degradación de LRP1 durante 24 horas en células HepG2 tratadas con MG132

En la Figura 45 se muestra en simultaneo tanto la degradación de LRP1 como cuando es tratado con Bafilomicina A1 y cuando es tratado con MG132. Se puede apreciar que el tiempo de degradación de LRP1 se alarga cuando es tratado con Bafilomicina A1 en comparación al LRP1 sin tratamiento (2.87 veces mayor), sin embargo, en LRP1 tratado con MG132 se puede observar un declive significativo (0.93 veces menor) y esto debido a la agregación de lipoproteínas y/o citotoxicidad de MG132. En la Figura también se puede observar que no hay una diferencia sustancial entre el tiempo de vida media de LRP1 y LRP1 tratado con MG132, esto se puede deber a que Cicloheximida protege a las células de la apoptosis inducida por MG132 al inhibir los receptores de la muerte (CD95-Fas, TNF-R), adaptadores de receptor de muerte (FADD, TRADD), caspasas, miembros de la familia Bcl-2 y otras proteínas) o también podría activar la señalización antiapoptotica^(195,206).

Los valores del tiempo de vida media de LRP1 sin ser tratado y al ser tratado por los inhibidores de las principales vías de degradación son una fuente de conocimiento para la investigación básica, sin embargo, también podría servir como una diana terapéutica para alargar la vida útil de LRP1 y que este pueda internalizar el A β n la enfermedad de Alzheimer.

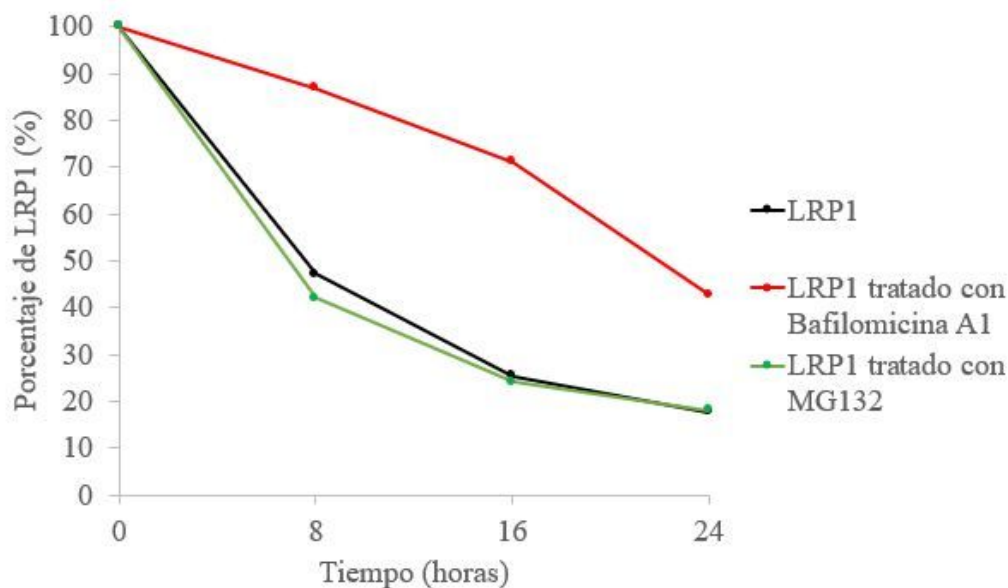
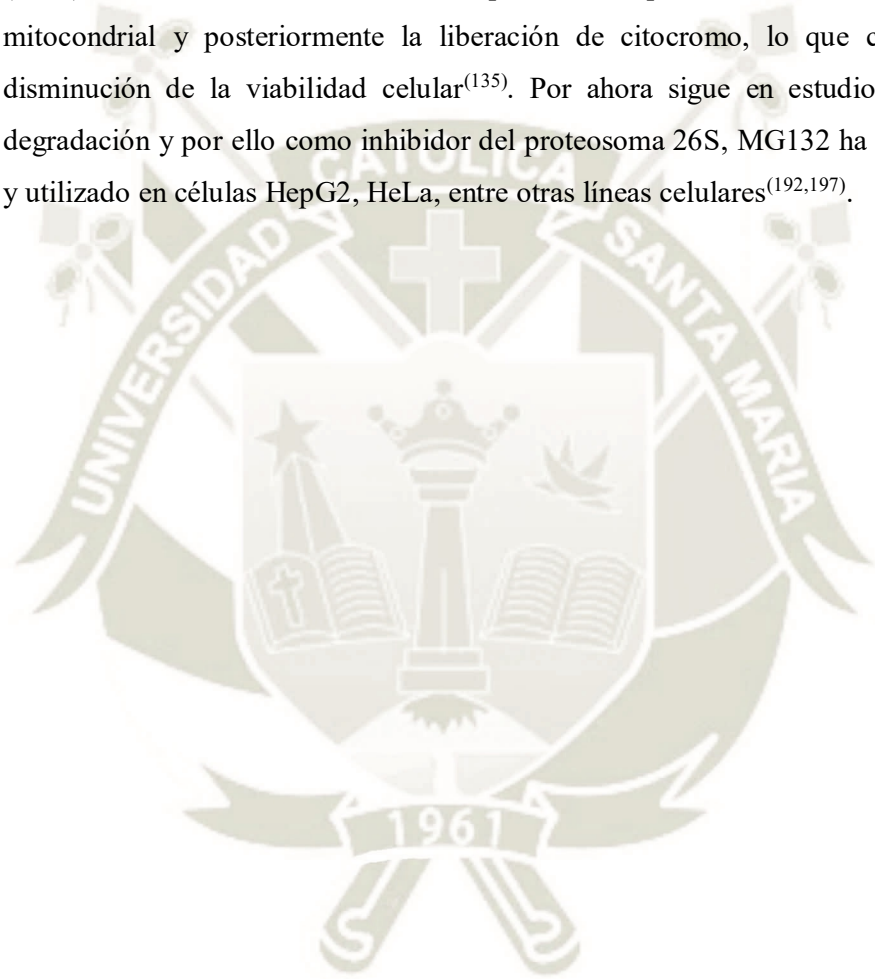


Figura 45. Comparación gráfica de degradación de LRP1, tratado con Bafilomicina A1 y tratado con MG132

El método utilizado para determinar la vida media de LRP1 en los diferentes casos fue el ploteo⁽²⁰⁹⁾, sin embargo se sabe que otros autores usaron la ecuación propia del tiempo de vida media como parámetro farmacocinético⁽²¹¹⁾. La razón por la cual se eligió usar este método para determinar el tiempo de vida media fue porque la ecuación al ser graficada reduce de gran manera los posibles errores, sin embargo, para este caso en especial no hay una diferencia sustancial en el perfil de la gráfica al determinar el tiempo de vida media por ambos métodos.

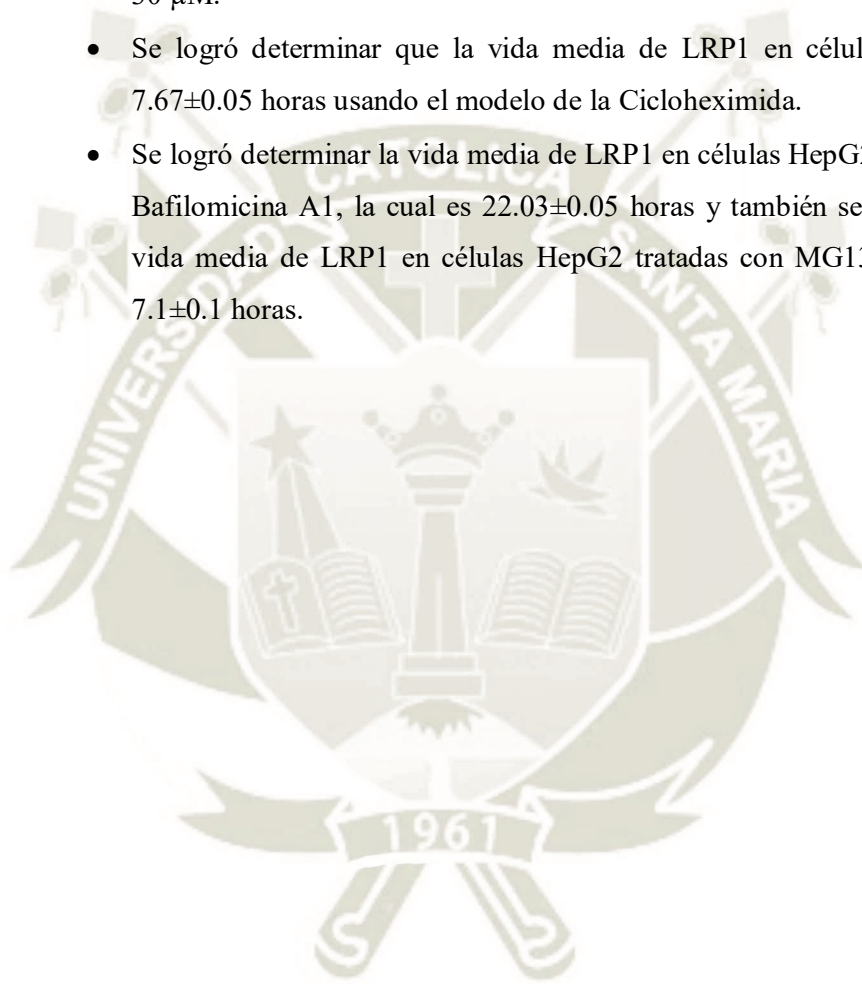
Bafilomicina A1, inhibidor de la vía lisosomal, demostró tal efecto también en células A431 (células de carcinoma epidérmica humano), en células BNL CL.2 (células epiteliales del hígado de ratón)⁽¹⁹⁹⁾, y también en células de H-4-II-E (células de carcinoma hepático en ratas)⁽²¹²⁾. Bafilomicina A1 a una concentración de 10 nM redujo la viabilidad celular HepG2 hasta en un 30% vía caspasas en células HepG2 luego de un tratamiento de 72 horas, inclusive con 48 horas de tratamiento se reduce la viabilidad a 50% aproximadamente⁽²¹³⁾. En esta investigación se usó esta concentración solo como máximo por un periodo de 24 horas, por lo cual garantizamos que no hubo muerte celular provocada por Bafilomicina A1.

MG132, entre otros inhibidores de la vía ubiquitina proteosoma comenzaron a ser sintetizados para reducir la excesiva degradación de proteínas musculares como en estados caquéticos⁽²¹⁴⁾. Sin embargo, se sabe que MG132 también es tóxico, lo cual ha sido demostrado en experimentos que evidencian que su mecanismo es la formación de especies reactivas de oxígeno. La formación de ROS y el agotamiento del glutatión (GSH) debido a los inhibidores del proteosoma pueden causar una disfunción mitocondrial y posteriormente la liberación de citocromo, lo que conduce a la disminución de la viabilidad celular⁽¹³⁵⁾. Por ahora sigue en estudio esta vía de degradación y por ello como inhibidor del proteosoma 26S, MG132 ha sido probado y utilizado en células HepG2, HeLa, entre otras líneas celulares^(192,197).



2. CONCLUSIONES

- Se logró determinar que la principal vía de degradación de LRP1 es la vía lisosomal-autofágica.
- Se determinó que la concentración adecuada a la cual la Cicloheximida inhiba la síntesis proteica en células HepG2 sin que sea tóxico para estas es $30 \mu\text{M}$.
- Se logró determinar que la vida media de LRP1 en células HepG2 es 7.67 ± 0.05 horas usando el modelo de la Cicloheximida.
- Se logró determinar la vida media de LRP1 en células HepG2 tratadas con Bafilomicina A1, la cual es 22.03 ± 0.05 horas y también se determinó la vida media de LRP1 en células HepG2 tratadas con MG132, la cual es 7.1 ± 0.1 horas.



3. SUGERENCIAS

- Realizar mayores estudios sobre LRP1, ya que esta proteína está envuelta en la fisiopatología del Alzheimer y otras enfermedades como arterioesclerosis, entre otros. Por ejemplo, la determinación del tiempo de vida media de sLRP1, vectorización de un antioxidante para sLRP1, entre otros.
- Expandir los estudios realizados en la presente investigación a otras líneas celulares que expresen LRP1.
- Realizar estudios para identificar cual es la vía por la cual MG132 reduce los niveles de LRP1 al inhibir el sistema ubiquitina-proteosoma, es decir el mecanismo por el cual MG132 es citotóxico y lleva a la apoptosis a células HepG2.
- Realizar estudios para identificar el tiempo de latencia de Bafilomicina A1, ya que no hay un efecto sobre las células HepG2 durante un tratamiento de 3 horas, sin embargo, muestra un efecto a las 8 horas de tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gregorio PG, Martín Sánchez J. Demencia. Tratado Geriatr para Resid. 2004;173-88.
2. Pradilla G. Demencia : La epidemia silenciosa del III Milenio. 2004;138-45.
3. Peña-Casanova J. Intervención cognitiva en la enfermedad de Alzheimer. Fundamentos y principios generales. Act la mente. 1999;4:105.
4. López-Pousa S, Garre-Olmo J. Demencia. Concepto. Clasificación. Epidemiología. Aspectos socioeconómicos. Med - Programa Form Médica Contin Acreditado. 2007;9(77):4921-7.
5. Peña-Casanova J, Palau González J. Enfermedad de Alzheimer. Neurobiol Aging. 2010;1(1):1-14.
6. Donoso A. La enfermedad de Alzheimer. Rev Chil Neuropsiquiatr. noviembre de 2003;41:13-22.
7. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. Nat Rev Dis Prim. 2015;1:1-18.
8. Custodio N, Montesinos R. Enfermedad de Alzheimer. 2015;274.
9. Organización Mundial de la Salud. Demencia [Internet]. [citado 25 de enero de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
10. OMS, Alzheimer's Disease International (ADI), OPS. Demencia: Una prioridad pública. 1.^a ed. Organización Panamericana de Salud, editor. Demencia. Washington DC: Organización Mundial de la Salud; 2013. 103 p.
11. World Health Organization. Global Burden of Disease cause categories, sequelae and case definitions for neurological disorders. Neurological disorders: public health challenges. 2006. 40 p.
12. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-graham K, Arrighi HM. Forecasting the Global Burden of Alzheimer ' s Disease. Sel Work. 2007;130.

13. Sawada Benavides C. Diseño de sistema de ubicación para personas con Alzheimer vía web. Pontificia Universidad Católica del Perú; 2013.
14. El 10 por ciento de la población adulta sufre de Alzheimer | LaRepublica.pe [Internet]. [citado 3 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://larepublica.pe/sociedad/420959-el-10-por-ciento-de-la-poblacion-adulta-sufre-de-alzheimer>
15. Más de 200 mil personas sufren de Alzheimer en el Perú | Lima | Sociedad | El Comercio Peru [Internet]. [citado 3 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://archivo.elcomercio.pe/sociedad/lima/mas-200-mil-personas-sufren-alzheimer-peru-noticia-743861>
16. Bazzocchini VS. Mecanismos etiopatogénicos , fisiopatológicos y moleculares de la Enfermedad de Alzheimer. Bionátesis. 2007;4(1):6-13.
17. Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. Cell. 2012;148(6):1204-22.
18. Barber RC. The Genetics of Alzheimer ' s Disease. 2012;2012(5):14.
19. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. J Geriatr Psychiatry Neurol. 2010;23(4):213-27.
20. Angulo López JM. Prevalencia de los niveles de depresion en la demencia de tipo alzheimer en personas mayores de 60 años de IECN y del albergue San Vicente de Paul de la ciudad de Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
21. Huete J, Sentis E. Bases moleculares de la enfermedad de Alzheimer. Perspectivas de nuevos enfoques terapéuticos. Simp sobre la Enferm Alzheimer. 2007;121-34.
22. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacol Sin. 2017;38(9):1205-35.
23. Murphy MP, Iii HL. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. J

- Alzheimer's Dis. 2010;19(1):1-17.
24. Lahiri DK, Maloney B. Beyond the signaling effect role of amyloid- β 42 on the processing of APP, and its clinical implications. *Exp Neurol*. 2010;225(1):51-4.
 25. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci*. 2009;12(12):1567-76.
 26. Tabaton M, Zhu X, Perry G, Smith MA, Giliberto L. Signaling Effect of Amyloid-B on the Processing of ABPP. *Exp Neurol*. 2011;221(1):18-25.
 27. Zou K, Gong J, Yanagisawa K, Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid β -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci*. 2002;22(12):4833-41.
 28. Spitzer P, Condic M, Herrmann M, Oberstein TJ, Scharin-Mehlmann M, Gilbert DF, et al. Amyloidogenic amyloid- β -peptide variants induce microbial agglutination and exert antimicrobial activity. *Sci Rep*. 2016;6(May):1-11.
 29. Baruch-Suchodolsky R, Fischer B. A β 40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry*. 2009;48(20):4354-70.
 30. Yao Z, Papadopoulos V. Function of β -amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J*. 21 de agosto de 2002;16(12):1677-9.
 31. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* (80-). 2002;297(5580):353-6.
 32. Karran E, Mercken M, Strooper B De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(9):698-712.
 33. Guimerà A, Gironès X, Cruz-sánchez FF. Actualización sobre la patología de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Patol*. 2002;35:21-48.

34. García S, Coral Vázquez RM, Dávalos EM, Castillo JL, Silva BM, Ortiz ADJV. Enfermedad de Alzheimer: Una panorámica desde su primera descripción hacia una perspectiva molecular. *Med Interna Mex.* 2009;25(4):300-12.
35. Thal DR, Griffin WST, Braak H. Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2008;12(5B):1848-62.
36. Von Bernhardt M. R. Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuropsiquiatr.* 2005;43(2):123-32.
37. García T, Jay D. Fosforilación de tau y enfermedad de Alzheimer. *Gac Med Mex.* 2004;140(3):329-33.
38. Wadman M. Alzheimer's protein may spread like an infection, human brain scans suggest. *Science* (80-). 5 de enero de 2018;1:5-18.
39. Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 2004;84(2):361-84.
40. Moya Rico M. Principales hipótesis neurodegenerativas de la Enfermedad de Alzheimer. 2015.
41. Pedrosa Serrano M. Mecanismos bioquímicos de la Enfermedad de Alzheimer : Aproximaciones terapéuticas. Universidad Complutense; 2001.
42. Alzheimer's Disease – Sense of Urgency! [Internet]. [citado 3 de junio de 2018]. Disponible en: <http://souforum.com/2016/11/23/4-alzheimers-disease/>
43. María Pérez IS. Estudios sobre la fosforilación y agregación de la proteína Tau y su posible relación con la enfermedad de Alzheimer. Universidad Autónoma de Madrid; 2008.
44. Troncoso JC, Kawas CH, Pardo CA, Rebolledo FA. Lesiones precoces en la enfermedad de Alzheimer. *Plast y Restaur Neurol.* 2006;5:129-35.
45. Pérez JM. La descripción de los ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer. *Rev Española Patol.* 2007;40(1):60-5.
46. Mena LR, Luna MJ, Sierra GF, Hernández AM. Histopatología Molecular De

- La Enfermedad De Alzheimer. Rev Digit Univ. 2003;4-7.
47. Wischik CM, Harrington CR, Mena R. Molecular determinants of paired helical filament assembly and its therapeutic implications in Alzheimer's disease. *Int Rev Psychiatry*. 1995;7(3-4):299-338.
 48. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. *Revista cubana de medicina general integral*. 2.^a ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1985. 48 p.
 49. La Enfermedad Alzheimer : Bases Moleculares y Aproximaciones Terapeuticas [Internet]. [citado 6 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/alzheimer/alzheimer.htm#colinergica>
 50. Gandía L, Álvarez J. Anticolinesterásicos en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. *Revisión Rev Neurol*. 2006;42(8):471-7.
 51. Terry Jr AV, Buccafusco JJ. The Cholinergic Hypothesis of Age and Alzheimer's Disease- Related Cognitive Deficits: Recent Challenges and Their Implications for Novel Drug Development. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(3):821-7.
 52. Wenk GL. Neuropathologic Changes in Alzheimer's Disease: Potential Targets for Treatment. *Clin Trials*. 2006;67 Suppl 3:3-7.
 53. Maragos WF, Greenamyre JT, Penney JB, Young AB. Glutamate dysfunction in Alzheimer's disease: an hypothesis. *Trends Neurosci*. 1987;10(2):65-8.
 54. Palmer AM, Psychiatric S. Is the neuronal cholinergic of Alzheimer ' s disease or glutamatergic ? *Faseb*. 1990;4(10):2745-52.
 55. Danysz W, Parsons CG. The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: Preclinical evidence. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003;18(SUPPL. 1).
 56. Butterfield DA, Pocernich CB. The Glutamatergic System and Alzheimer ' s Disease Therapeutic Implications. *CNS Drugs*. 2003;17(9):641-52.

57. Schaeffer EL, Gattaz WF. Cholinergic and glutamatergic alterations beginning at the early stages of Alzheimer disease: Participation of the phospholipase A2 enzyme. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;198(1):1-27.
58. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci*. 2013;38(1):6-23.
59. Francis PT. Glutamatergic systems in Alzheimer ' s disease. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2003;18(March):S15-21.
60. Danysz W, Parsons CG, Mobius HJ, Stoffler a, Quack G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox Res*. 2000;2:85-97.
61. Campos-Peña V, Meraz-Ríos MA. Alzheimer Disease : The Role of A β in the Glutamatergic System. En: *Neurochemistry*. 1.^a ed. New York: Intech; p. 150.
62. Alzheimer's Society. What is Alzheimer ' s disease ? United Kingdom; 2014. p. 11.
63. Signos y Síntomas | BrightFocus Foundation [Internet]. [citado 1 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.brightfocus.org/espanol/la-enfermedad-de-alzheimer-y-la-demencia/enfermedad-de-alzheimer-sintomas-y-etapas>
64. Callapiña Farfan V. Efecto neuroprotector de extracto de *Lepidium meyenii* «MACA» en células de neuroblastoma (SH-SY5Y) con estres oxidativo inducido por peróxido de hidrogeno. Universidad Católica de Santa María; 2017.
65. Pérez, Elisa Paredes. Laura, Tuneu Valls. Miquel, Rojas Cano. Montse, Sardans Marquillas. Ana GF. Guía De Seguimiento Farmacoterapéutico De Los Pacientes Con Alzheimer. 2005. 57 p.
66. Miranda-Castillo C, Tapia FM, Herrera AR, Ghigliotto FM, Guerra LS. Implementación de un programa de estimulación cognitiva en personas con demencia tipo alzheimer: Un estudio piloto en chilenos de la tercera edad*.

- Univ Psychol. 2013;12(2):445-56.
67. García-Alberca JM. Las terapias de intervención cognitiva en el tratamiento de los trastornos de conducta en la enfermedad de Alzheimer. Evidencias sobre su eficacia y correlaciones neurobiológicas. *Neurología*. 2015;30(1):8-15.
 68. Torres Aguirre, A.; Castellví Sampol M. Abordajes no farmacológicos en la enfermedad de Alzheimer. Vol. IXVII, *Demencia: Una epidemia en el Siglo XXI*. España; 2004.
 69. Jiménez-Palomares M, Rodríguez-Mansilla J, González-López-Arza MV, Rodríguez-Domínguez MT, Prieto-Tato M. Beneficios de la musicoterapia como tratamiento no farmacológico y de rehabilitación en la demencia moderada. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2013;48(5):238-42.
 70. Tratamiento no farmacológico de la demencia | INECO - Instituto de Neurología Cognitiva [Internet]. [citado 3 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.ineco.org.ar/tratamiento-no-farmacologico-de-la-demencia/>
 71. Locanto OL. Pharmacological therapy of Alzheimer's disease and other dementias. *Arch Med Interna*. 2015;37(1):61-7.
 72. CADIME. Enfermedad de Alzheimer: Tratamiento farmacológico. *Bta*. 2014;29(Ddd):9.
 73. Hereu P, Vallano A. Uso de antipsicóticos en pacientes con demencia. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2011;46(1):50-3.
 74. Fernández CF. Dolor en el Adulto mayor. 2013;(587):49-52.
 75. Nitrini R, Caramelli P, Bottino CM de C, Damasceno BP, Brucki SMD, Anghinah R. Recommendations and suggestions of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2005;63(4):1104-12.
 76. INFAC. Tratamiento farmacológico de la Demencia. *Osakidetza*. 2015;2007(4):1-9.
 77. Medicamentos para Enfermedad de Alzheimer - Cancer Care of Western New

- York [Internet]. [citado 4 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.cancercarewny.com/content.aspx?chunkiid=122662#Antidepress>
78. Medicamentos para la enfermedad de Alzheimer [Internet]. [citado 4 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.nia.nih.gov/health/medicamentos-enfermedad-alzheimer>
 79. Fuentes Cuenca S, Mérida Casado E. Protocolo terapéutico de la depresión en el anciano. *Medicine (Baltimore)*. 2011;10(86):5851-4.
 80. Guerra-cazorla LM, Sánchez-pastor L, Navío-acosta M, Agüera-ortiz LF. Antidepresivos y deterioro cognitivo en el anciano. 2010;2(4):201-6.
 81. Jacquier M. Tratamiento de las demencias. *Medicina (B Aires)*. 2013;36(1):157-74.
 82. La Bupirona. [Internet]. [citado 4 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://psiquiatria.com/farmacos-152/la-bupirona/>
 83. Sobre C, Tratamiento EL, En G, Paciente EL, Parkinson CON. Consideraciones sobre el tratamiento farmacológico en el paciente con parkinson. 2015;26:68-75.
 84. Llibre Rodríguez J de J, Hernández Guerra MA. Enfermedad De Alzheimer. Situación Actual Y Estrategias Terapéuticas. *Rev Cubana Med*. 1999;38(2):134-42.
 85. Cochrane Collaboration., Centro Cochrane Iberoamericano. La Biblioteca Cochrane plus. Update Software; 2005.
 86. Martín-Torres G, Fioravanti M, Grimley Evans J. Trazodone for agitation in dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 19 de julio de 2004;
 87. Alcántara-López MG, Gutiérrez-García AG, Hernández-Lozano M, Contreras CM. Trazodona, un antidepresivo atípico con propiedades ansiolíticas y sedantes. *Arch Neurociencias*. 2009;14(4):249-57.
 88. Lin L, Hu K. LRP-1: Functions, signaling and implications in kidney and other diseases. *Int J Mol Sci*. 2014;15(12):22887-901.

89. Myklebost O, Arheden K, Rogne S, Kessel AG van, Mandahl N, Herz J, et al. The gene for the human putative apoE receptor is on chromosome 12 in the segment q13-14. *Genomics*. 1989;5(1):65-9.
90. Takayama Y, May P, Anderson RGW, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β). *J Biol Chem*. 2005;280(18):18504-10.
91. Bu G. Apolipoprotein e and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(5):333-44.
92. Emonard H, Théret L, Bennasroune AH, Dedieu S. Regulation of LRP-1 expression: Make the point. *Pathol Biol*. 2014;62(2):84-90.
93. Au DT, Strickland DK, Muratoglu SC. The LDL Receptor-Related Protein 1: At the Crossroads of Lipoprotein Metabolism and Insulin Signaling. *J Diabetes Res*. 2017;2017:10.
94. Kanekiyo T, Bu G. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 2014;6(MAY):1-12.
95. Strickland DK, Au DT, Cunfer P, Muratoglu SC. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: Role in the regulation of vascular integrity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):487-98.
96. Gonias SL, Wu L, Salicioni AM. Low density lipoprotein receptor-related protein: Regulation of the plasma membrane proteome. *Thromb Haemost*. 2004;91(6):1056-64.
97. Sagare A, Deane R, Zlokovic B. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological A β homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. 2012;76(October 2009):211-20.
98. Zlokovic B V., Deane R, Sagare AP, Bell RD, Winkler EA. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: A serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid β -peptide elimination from the

- brain. *J Neurochem.* 2010;115(5):1077-89.
99. Etique N, Verzeaux L, Dedieu S, Emonard H. Lrp-1: A checkpoint for the extracellular matrix proteolysis. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
 100. Kang HS, Kim J, Lee HJ, Kwon BM, Lee DK, Hong SH. LRP1-dependent pepsin clearance induced by 2'-hydroxycinnamaldehyde attenuates breast cancer cell invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;53:15-23.
 101. Kang DE, Pietrzik CU, Baum L, Chevallier N, Merriam DE, Kounnas MZ, et al. Modulation of amyloid β -protein clearance and Alzheimer ' s disease susceptibility by the LDL receptor – related protein pathway. 2000;106(9):1159-66.
 102. Smeijers L, Willems S, Lauwers A, Thiry E, Van Leuven F, Roebroek AJM. Functional expression of murine LRP1 requires correction of Lrp1 cDNA sequences. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 2002;1577(1):155-8.
 103. Kinchen JM, Cabello J, Kilngele D, Wong K, Felchtinger R, Schnabel H, et al. Two pathways converge at CED-10 to mediate actin rearrangement and corpse removal in *C. elegans*. *Nature.* 2005;434(7029):93-9.
 104. Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, et al. LRP/amyloid β -peptide interaction mediates differential brain efflux of A β isoforms. *Neuron.* 2004;43(3):333-44.
 105. Chen D, Xiao H, Zhang K, Wang B, Gao Z, Jian Y, et al. Retromer Is Required for Apoptotic Cell Clearance by Phagocytic Receptor Recycling. Vol. 2. 2010.
 106. Binder RJ, Han DK, Srivastava PK. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol.* 2000;1(2):151-5.
 107. Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein e and Alzheimer disease: Risk, mechanisms and therapy. Vol. 9, *Nature Reviews Neurology.* 2013. p. 106-18.
 108. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain—implications for Alzheimer disease.

- Nat Rev Neurol. 2015;11(8):457-70.
109. Shinohara M, Tachibana M, Kanekiyo T, Bu G. Role of LRP1 in the pathogenesis of Alzheimer's disease: evidence from clinical and preclinical studies. *J Lipid Res.* 2017;58(7):1267-81.
 110. Deane R, Sagare A, Zlokovic B V. The role of the cell surface LRP and soluble LRP in blood-brain barrier Abeta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2008;14(16):1601-5.
 111. Koolman J, Rhoem K-H. *Color Atlas of Biochemistry.* 2.^a ed. New York: Thieme; 2005. 467 p.
 112. Stryer L. *Biochemistry.* 2.^a ed. Barcelona: Editorial Reverté S.A.; 1982. 871 p.
 113. Menoscal A. *Bioquímica Médica.* 4.^a ed. Manabi: Manta; 2010. 363 p.
 114. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. *Biochemistry.* 5.^a ed. New York: W.H. Freeman; 2002. 894 p.
 115. Berg J, Stryer L, Tymoczko J, Gatto G. *Biochemistry.* 8.^a ed. New York: W.H. Freeman; 2015. 1260 p.
 116. Pacheco D. *Bioquímica estructural y aplicada a la medicina.* 1.^a ed. Mexico: Instituto Politecnico Nacional; 1996. 582 p.
 117. Alberts B, Lewis J, Roberts K, Bray D, Raff M, Watson J. *Biología Molecular de la Célula.* 3.^a ed. Barcelona: OMEGA S.A.; 1996. 240 p.
 118. Rodwell V, Bender D, Botham K, Kennelly P, Weil A. *Harpe's Illustrated Biochemistry.* 30.^a ed. New York: Mc Graw Hill Education; 2015. 817 p.
 119. *Cell Signaling. Cycloheximide.* 2002. p. 10.
 120. Alessenko A V., Boikov, Filippova GN, Khrenov A V., Loginov AS, Makarieva ED. Mechanisms of cycloheximide-induced apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.* 1997;416(1):113-6.
 121. Cycloheximide | Abcam [Internet]. [citado 24 de abril de 2018]. Disponible en: <http://www.abcam.com/cycloheximide-ab120093.html>

122. Ennis HL, Lubin M. Cycloheximide: Aspects of Inhibition of Protein Synthesis in Mammalian Cells. *Science*. 1964;146(3650):1474-6.
123. Baynes J. *Bioquímica Médica*. 4.^a ed. Barcelona: Elsevier; 2015. 637 p.
124. Laguna J, Piña E, Martínez Montes F, Pardo Vazquez JP, Rivero Rosas H. *Bioquímica de de Laguna*. 6.^a ed. México: Edición Manual Moderno; 2009. 581 p.
125. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, et al. *Biología Celular y Molecular*. 5.^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2005. 1088 p.
126. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology*. 3.^a ed. Mexico: Editorial Médica Panamericana; 2011. 900 p.
127. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS O TRADUCCIÓN | Desde Mendel hasta las moléculas [Internet]. [citado 7 de abril de 2018]. Disponible en: <https://genmolecular.com/sintesis-de-proteinas-o-traduccion/>
128. Berg J, Tymoczko J, Stryer L, Tymoczko J, Gatto G. *Biochemistry*. 5.^a ed. New York: W.H. Freeman; 2002. 1260 p.
129. Campbell N, Reece J. *Biology*. 7.^a ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2007. 1392 p.
130. Cascales Angosto M. Vía de la ubiquitina-proteosoma. *An la Real Acad Nac Farm*. 2005;71(1):45-82.
131. Tuoc TC, Stoykova A. Roles of the ubiquitin-proteasome system in neurogenesis. *Cell Cycle*. 2010;9(16):3174-80.
132. Ilyinskii PO, Meriin AB, Gabai VL, Usachev E V, Prilipov AG, Thoidis G, et al. The proteosomal degradation of fusion proteins cannot be predicted from the proteasome susceptibility of their individual components. *Protein Sci*. 2008;17(6):1077-85.
133. Cooper G, Hausman R. *The cell: A Molecular Approach*. 4.^a ed. Washington DC: ASM Press; 2007. 848 p.

134. Hwan Han Y, Jin Moon H, Ra You B, Hyun Park W. The effect of MG132, a proteasome inhibitor on HeLa cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and GSH. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4163-8.
135. Guo N, Peng Z. MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2013;9(1):6-11.
136. Brand T a biotechne. *Europe Middle East Africa.* Vol. 86. 2016.
137. MG-132 | Abcam [Internet]. [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.abcam.com/mg-132-ab141003.html>
138. Ciechanover A. Proteolysis: From the lysosome to ubiquitin and the proteasome. Vol. 6, *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005. p. 79-86.
139. Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2009;1793(4):664-73.
140. Hu Y-B, Dammer EB, Ren R-J, Wang G. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener.* 2015;4(1):18.
141. Dunn WA. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 1994;4(4):139-43.
142. Tocris a biotechne brand. Bafilomycin A1. 2008;86(August):1-6.
143. Bafilomycin A1 | Abcam [Internet]. [citado 8 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.abcam.com/bafilomycin-a1-ab120497.html>
144. Hep G2 [HEPG2] ATCC® HB-8065™ [Internet]. [citado 3 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/HB-8065.aspx>
145. ATCC. Hep G2 [HEPG2] (ATCC ® HB --8065). :1-3.
146. ATCC. TransfeX™ Transfection of Plasmid DNA into HepG2 Cells. Vol. 2. 2013. p. 3-5.
147. HepG2 (liver hepatocellular carcinoma): cell culture and transfection protocol

- [Internet]. [citado 3 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.hepg2.com/>
148. Walker JM. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. 2.^a ed. Walker JM, editor. Vol. 2, Media. Reino Unido: Universidad de Hertfordshire; 2000. 120 p.
 149. Rnaimax L. Transfecting Stealth™ RNAi or siRNA into HT1080 Cells Using RNAiMAX. *Culture*. 2006;(page 3):25-7.
 150. Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu XJ, Darroudi F, Kassie F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*. 2004;198(1-3):329-40.
 151. Mohamed LA, Qosa H, Kaddoumi A. Age-related decline in brain and hepatic clearance of amyloid-beta is rectified by the cholinesterase inhibitors donepezil and rivastigmine in rats. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(5):725-36.
 152. Pflanzner T, Janko MC, André-Dohmen B, Reuss S, Weggen S, Roebroek AJM, et al. LRP1 mediates bidirectional transcytosis of amyloid- β across the blood-brain barrier. *Neurobiol Aging*. 2011;32(12):2323.e1-2323.e11.
 153. Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL, et al. Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-B peptide: Implications for therapeutic design and diagnostic tests. *Mol Psychiatry*. 2009;14(5):469-86.
 154. Sagare A, Deane R, Bell RD, Johnson B, Hamm K, Pendu R, et al. Clearance of amyloid- β by circulating lipoprotein receptors. *Nat Med*. 2007;13(9):1029-31.
 155. Zlokovic B V. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(12):723-38.
 156. Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T. Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide (1 40) by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes. *Mol Pharmacol*. 2007;72(4):850-5.
 157. Koudinov AR, Berezov TT, Koudinova N V. Alzheimer's amyloid beta and lipid metabolism: a missing link? *FASEB J*. 1 de septiembre de

- 1998;12(12):1097-9.
158. Koudinova N V, Berezov TT, Koudinov AR. Multiple inhibitory effects of Alzheimer's peptide Abeta1-40 on lipid biosynthesis in cultured human HepG2 cells. *FEBS Lett.* 1996;395(2-3):204-6.
 159. Koudinov AR, Koudinova N V. Alzheimers Soluble Amyloid β Protein Is Secreted By Hepg2 Cells As an Apolipoprotein. *Cell Biol Int.* 1997;21(5):265-71.
 160. Shoji M, Golde T, Ghiso J, Cheung T, Estus S, Shaffer L, et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* (80-). 1992;258(5079):126-9.
 161. Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992;359(6393):322-5.
 162. Li YP, Bushnell AF, Lee CM, Perlmutter LS, Wong SKF. β -Amyloid induces apoptosis in human-derived neurotypic SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 1996;738(2):196-204.
 163. García J. Introducción al cultivo de tejidos. 2002;1-32.
 164. Cell viability, proliferation & apoptosis assays guide [Internet]. [citado 28 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.abcam.com/kits/a-guide-to-cell-viability-proliferation-and-apoptosis-assays>
 165. Walker JM. *Mammalian Cell Viability: Method and Protocols.* Switzerland: Library of Congress; 2002. 253 p.
 166. Cell Viability and Proliferation Assays | Sigma-Aldrich [Internet]. [citado 27 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>
 167. Devanaryan V, V. Hass J, Iversen P. *Assay Guidance Manual.* Assay Guid Man. 2016;(Md):305-36.
 168. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.*

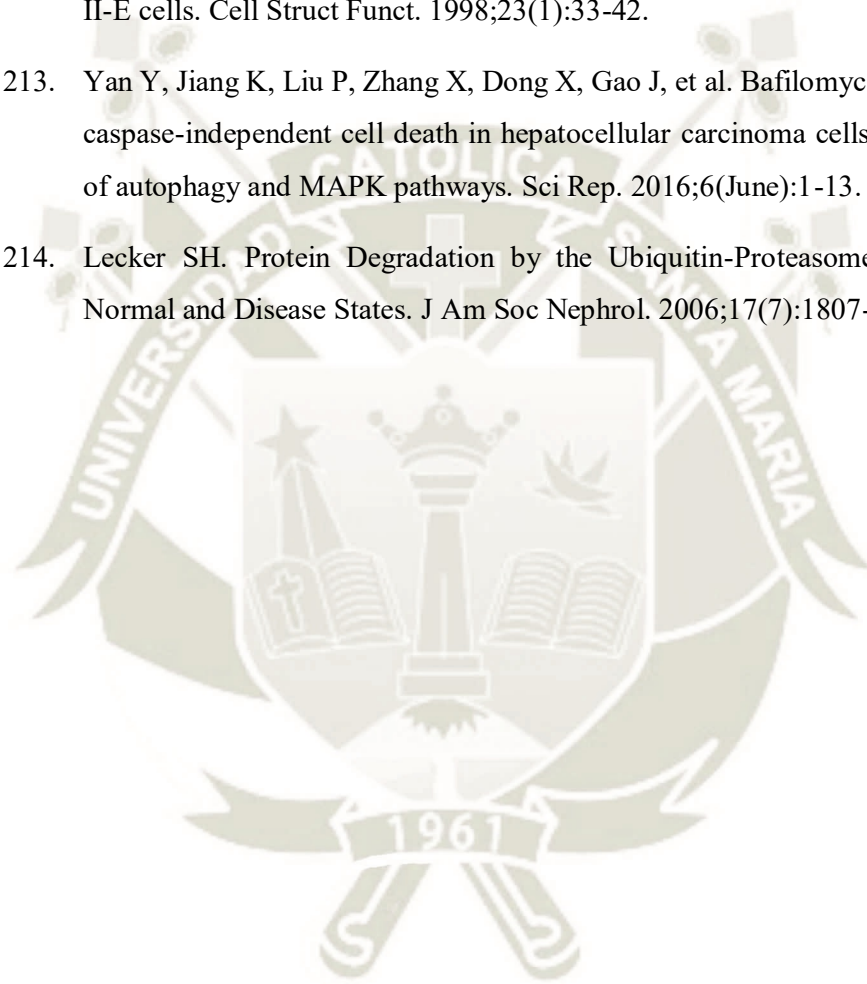
- 2001;Appendix 3:Appendix 3B.
169. Trypan Blue solution 0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture | Sigma-Aldrich [Internet]. [citado 27 de febrero de 2018]. Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=en®ion=PE#cited_1
 170. Trypan Blue Dye content 60 % | Sigma-Aldrich [Internet]. [citado 27 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/302643?lang=en®ion=PE>
 171. Khamis M. Azo dyes interactions with surfactants. Determination of the critical micelle concentration from acid?base equilibrium. Dye Pigment. 2005;66(3):179-83.
 172. Thermo Fischer scientific Inc. Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook. 2004. 44 p.
 173. Olson BJSC, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. Curr Protoc Protein Sci. 2007;Chapter 3:Unit 3.4.
 174. Sigma-Aldrich. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit. Technical Bulletin. 2012;1-6.
 175. Biotechnology SC. BCA Protein Assay Protocol.
 176. Publication manual of Thermo Fischer scientific Inc. User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit (MAN0011430 Rev. A).
 177. Abcam. BCA Protein Quantification Kit Assay. Estados Unidos; 2012. 12 p.
 178. Bibby Scientific. Bicinchoninic Acid Protein Assay. Jenway. 2001;2(1):5.
 179. Scientific T. Pierce BCA Protein Assay Kit. Test. 2011;0747(23225):1-7.
 180. Chemistry of Protein Assays - PE.
 181. Pierce. Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide. Pierce. 2004;1-52.

182. Nacalai Tesque. Western Blot Protocol. 2011;4:32.
183. Abcam. General Western Blot Protocol. 2013;7.
184. GE Healthcare. Western blotting: Principles and Methods. 2011;10(1):1-181.
185. Abcam. Protocols Book. 2014. 1-82 p.
186. Yang Y, Ma H. Western Blotting and ELISA Techniques. Researcher. 2009;1(2):67-86.
187. Invitrogen. Cell Culture Basics Handbook. ThermoFisher Scientific Inc. 2010. 1-61 p.
188. Cellometer Auto T4 Bright Field Cell Counter | Nexcelom [Internet]. [citado 9 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.nexcelom.com/Cellometer-Auto-T4/index.html>
189. Thermo Fischer scientific Inc. MEM [Internet]. [citado 6 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.thermofisher.com/pe/en/home/technical-resources/media-formulation.92.html>
190. MEM - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [citado 6 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/11095080>
191. Rondón-Ortiz AN, Gugnani K, Maher TJ, Pino-Figueroa A. High Concentration of Rosiglitazone Reduces Low-density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Levels Via Lysosomal Degradation in HepG2 Cells. FASEB J. 1 de abril de 2017;31(1_supplement):990.9-990.9.
192. Rondón-Ortiz AN, Gonzales-Urday AL, Martínez-Málaga JA, Carr OC, Maher TJ, Pino-Figueroa A. Ubiquitin Proteasome System Inhibition Reduces LRP1 Protein Levels in HepG2 Cells. FASEB J. 1 de abril de 2017;31(1_supplement):996.6-996.6.
193. Lin C-L, Huang H-C, Lin J-K. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. J Lipid Res. 2007;48(11):2334-43.
194. ATTC. SOP: Propagation of HepG2 (ATTC HB-8065) [Internet]. Vol. 2,

- HepG2 cell culture conditions. 2003 [citado 4 de mayo de 2018]. p. 3-4.
Disponible en: [https://www.encodeproject.org/documents/d9ecf994-5e1d-4efd-918e-6a3cb57b4328/@@download/attachment/Snyder_HepG2 Cell Growth Protocol.pdf](https://www.encodeproject.org/documents/d9ecf994-5e1d-4efd-918e-6a3cb57b4328/@@download/attachment/Snyder_HepG2_Cell_Growth_Protocol.pdf)
195. Bai J, Cederbaum AI. Cycloheximide protects HepG2 cells from serum withdrawal-induced apoptosis by decreasing p53 and phosphorylated p53 levels . *J PharmacolExpTher* . 2006;319(3):1435-43.
 196. ATCC. Animal Cell Culture Guide. Tips and techniques for continuous cell lines. Vol. 39, American Type Culture Collection. Estados Unidos: University Blvd; 2014. NP.
 197. Gonzales Urdy AL, Martínez Málaga AJ. Efecto del inhibidor MG132 sobre el sistema ubiquitina proteosoma, la citotoxicidad, agregación proteica y los niveles de proteína LRP1 en células HEPG2. Universidad Católica de Santa María; 2017.
 198. Gabrielson NP, Pack DW. Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells. *J Control Release*. 2009;136(1):54-61.
 199. Yoshimori T, Yamamoto a, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin-a1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-Type H⁺-Atpase, Inhibits Acidification and Protein-Degradation in Lysosomes of Cultured-Cells. *J Biol Chem*. 1991;266(26):17707-12.
 200. Emanuele S, Calvaruso G, Lauricella M, Giuliano M, Bellavia G, D'Anneo A, et al. Apoptosis induced in hepatoblastoma HepG2 cells by the proteasome inhibitor MG132 is associated with hydrogen peroxide production, expression of Bcl-XS and activation of caspase-3. *Int J Oncol*. 2002;21(4):857-65.
 201. von Einem B, Schwanzar D, Rehn F, Beyer AS, Weber P, Wagner M, et al. The role of low-density receptor-related protein 1 (LRP1) as a competitive substrate of the amyloid precursor protein (APP) for BACE1. *Exp Neurol*. 2010;225(1):85-93.

202. Xu G, Green CC, Fromholt SE, Borchelt DR. Reduction of low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) in hippocampal neurons does not proportionately reduce, or otherwise alter, amyloid deposition in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Alzheimer's Res Ther.* 2012;4(2):1-14.
203. Cal R, García-Arguinzonis M, Revuelta-López E, Castellano J, Padró T, Badimon L, et al. Aggregated low-density lipoprotein induces LRP1 stabilization through E3 ubiquitin ligase CHFR downregulation in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(2):369-77.
204. Melman L, Geuze H, Li Y, McCormick L, Kerkhof P van, Schwartz A, et al. Proteasome Regulates the Delivery of LDL Receptor-Related Protein into the Degradatin Pathway. *Mol Biol Cell.* 2002;13(February):2372-84.
205. Alba Zayas L, Giovanna Pereira R, Betancourt Aguilar A. Lipoproteína (A): estructura, metabolismo, genética y mecanismos patogénicos. *Investig Biomédica.* 2003;22(1):32-40.
206. Sigma-Aldrich. CHX-ACT APOPTOSIS MADE EASY KIT. *Technical Bulletin.* Estados Unidos; 2001.
207. Feduchi Canosa E, Romero Magdalena C, Yañez Conde E, Blasco Castiñeyra I, Jimenez C. *Bioquímica: Conceptos esenciales.* 2.^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2014. 456 p.
208. Voet D, Voet J. *Bioquímica.* 3.^a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006. 1776 p.
209. Dolfi SC, Jäger A V., Medina DJ, Haffty BG, Yang JM, Hirshfield KM. Fulvestrant treatment alters MDM2 protein turnover and sensitivity of human breast carcinoma cells to chemotherapeutic drugs. *Cancer Lett.* 2014;350(1-2):52-60.
210. Barodia SK, Park SK, Ishzuka K, Sawa A, Kamiya A. Half-life of DISC1 protein and its pathological significance under hypoxia stress. *Neurosci Lett.* 2015;2(74):1-6.

211. Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O'Shea EK. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. PNAS. 2006;103(35):13004-9.
212. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct Funct. 1998;23(1):33-42.
213. Yan Y, Jiang K, Liu P, Zhang X, Dong X, Gao J, et al. Bafilomycin A1 induces caspase-independent cell death in hepatocellular carcinoma cells via targeting of autophagy and MAPK pathways. Sci Rep. 2016;6(June):1-13.
214. Lecker SH. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. J Am Soc Nephrol. 2006;17(7):1807-19.



ANEXOS

Anexo 1. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

	Albúmina (µg/mL)					
	Blanco	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.089	0.120	0.333	0.468	0.908	1.857
	0.084	0.114	0.322	0.485	0.938	1.814
	0.082	0.111	0.307	0.491	0.968	1.735
Promedio	0.085	0.115	0.321	0.481	0.938	1.802
Desviación estándar	0.004	0.005	0.013	0.012	0.030	0.062
Coefficiente de variabilidad (%)	4.414	3.939	4.018	2.423	3.180	3.417

Anexo 2. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

	Albúmina (µg/mL)					
	Blanco	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.075	0.148	0.374	0.504	0.941	1.754
	0.075	0.145	0.356	0.496	0.923	1.780
	0.071	0.138	0.372	0.502	0.912	1.791
Promedio	0.074	0.144	0.367	0.501	0.925	1.775
Desviación estándar	0.003	0.005	0.010	0.004	0.015	0.019
Coefficiente de variabilidad (%)	3.431	3.319	2.716	0.896	1.605	1.071

Anexo 3. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

	Albúmina (µg/mL)					
	Blanco	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.062	0.114	0.338	0.515	0.972	1.859
	0.062	0.112	0.342	0.484	0.898	1.892
	0.066	0.113	0.317	0.474	0.893	1.877
Promedio	0.063	0.113	0.333	0.491	0.921	1.876
Desviación estándar	0.003	0.001	0.013	0.022	0.045	0.017
Coefficiente de variabilidad (%)	3.978	0.902	4.002	4.394	4.846	0.880

Anexo 4. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

	Albúmina (µg/mL)					
	0	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.062	0.113	0.335	0.492	0.938	1.742
	0.063	0.112	0.336	0.508	0.876	1.750
	0.067	0.120	0.353	0.516	0.868	1.814
Promedio	0.064	0.115	0.341	0.506	0.894	1.769
Desviación estándar	0.003	0.005	0.010	0.012	0.038	0.039
Coefficiente de variabilidad (%)	4.445	3.932	2.940	2.389	4.242	2.225

Anexo 5. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
	0.427	0.429	0.440
Absorbancias	0.454	0.455	0.443
	0.419	0.418	0.428
Promedio	0.433	0.434	0.437
Desviación estándar	0.018	0.019	0.008
Coefficiente de variabilidad (%)	4.218	4.348	1.875
Proteínas (µg/mL)	413.494	413.864	417.444
Proteínas totales (µg/mL)	1240.481	1241.593	1252.333

Anexo 6. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
	0.465	0.496	0.460
Absorbancias	0.458	0.507	0.469
	0.432	0.510	0.443
Promedio	0.452	0.504	0.457
Desviación estándar	0.017	0.007	0.013
Coefficiente de variabilidad (%)	3.767	1.439	2.919
Proteínas (µg/mL)	458.819	524.931	466.181
Proteínas totales (µg/mL)	1384.792	1574.792	1398.542

Anexo 7. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
	0.568	0.641	0.516
Absorbancias	0.577	0.625	0.504
	0.585	0.639	0.499
Promedio	0.577	0.635	0.506
Desviación estándar	0.009	0.009	0.009
Coefficiente de variabilidad (%)	1.476	1.374	1.698
Proteínas (µg/mL)	589.531	653.852	511.383
Proteínas totales (µg/mL)	1768.593	1961.556	1534.148

Anexo 8. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
	0.618	0.703	0.426
Absorbancias	0.642	0.672	0.417
	0.627	0.700	0.422
Promedio	0.629	0.692	0.422
Desviación estándar	0.012	0.017	0.005
Coefficiente de variabilidad (%)	1.924	2.472	1.079
Proteínas (µg/mL)	703.722	782.333	444.694
Proteínas totales (µg/mL)	2111.167	2347.000	1334.083

Anexo 9. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 3 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
LRP1	332917.375	295344.250	303226.125
	315750.875	338162.000	371922.375
	312926.340	311545.000	315898.000
β-actina	286892.125	232075.313	256245.813
	258228.750	258157.000	298141.625
	278915.110	248945.000	264875.000
	Control	Bafilomicina A1	MG132
	0.993	1.089	1.013
	1.047	1.121	1.068
	0.960	1.071	1.021
Promedio	1.000	1.094	1.034
Desviación estándar	0.044	0.025	0.030
Coefficiente de variabilidad (%)	4.354	2.315	2.869

Anexo 10. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
LRP1	226486.500	376187.750	142284.000
	161684.250	370640.250	151796.688
	349093.438	687251.125	261131.875
β-actina	246075.313	154242.250	142889.750
	173286.250	147609.125	170548.375
	331521.250	250822.500	248292.375
	Control	Bafilomicina A1	MG132
	0.993	2.632	1.074
	1.007	2.710	1.024
	1.001	2.606	1.000
Promedio	1.000	2.649	1.033
Desviación estándar	0.007	0.054	0.038
Coefficiente de variabilidad (%)	0.687	2.037	3.676

Anexo 11. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
LRP1	181411.750	609547.875	137912.875
	206344.563	549757.875	99527.313
	214289.375	618256.625	100779.438
β-actina	176167.250	175094.750	173072.625
	344432.125	281868.250	224531.875
	341939.375	316903.625	224140.563
	Control	Bafilomicina A1	MG132
	1.000	3.381	0.774
	0.977	3.182	0.723
	1.023	3.183	0.734
Promedio	1.000	3.249	0.744
Desviación estándar	0.023	0.114	0.027
Coefficiente de variabilidad (%)	2.252	3.516	3.592

Anexo 12. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación de la principal vía de degradación de LRP1

Tratamiento	Control	Bafilomicina A1	MG132
LRP1	124092.094	334100.250	42699.563
	136109.594	386710.938	38094.234
	499999.250	1410522.500	118738.375
β-actina	250762.000	203062.063	221742.625
	274818.688	232026.188	202488.359
	264793.625	230095.375	164804.250
	Control	Bafilomicina A1	MG132
	1.000	3.323	0.389
	1.000	3.367	0.380
	1.003	3.255	0.383
Promedio	1.001	3.315	0.384
Desviación estándar	0.002	0.056	0.005
Coefficiente de variabilidad (%)	0.154	1.700	1.203

Anexo 13. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Cicloheximida en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta

	Albúmina ($\mu\text{g/mL}$)					
	0	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.082	0.206	0.334	0.583	0.941	1.817
	0.083	0.203	0.334	0.566	0.931	1.820
	0.081	0.206	0.334	0.558	0.922	1.821
Promedio	0.082	0.205	0.334	0.569	0.931	1.819
Desviación estándar	0.001	0.002	0.000	0.013	0.009	0.002
Coefficiente de variabilidad (%)	1.026	0.897	0.058	2.220	1.009	0.120

Anexo 14. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta

	Cicloheximida				
	Control	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
Absorbancias	0.496	0.489	0.416	0.382	0.390
	0.499	0.485	0.414	0.374	0.385
	0.507	0.486	0.421	0.382	0.392
Promedio	0.501	0.487	0.417	0.379	0.389
Desviación estándar	0.006	0.002	0.004	0.005	0.004
Coefficiente de variabilidad	1.155	0.377	0.898	1.272	0.974
Proteínas ($\mu\text{g/mL}$)	440.963	425.284	348.247	306.025	317.136
Proteínas totales ($\mu\text{g/mL}$)	1322.889	1275.852	1044.741	918.074	951.407

Anexo 15. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de Cicloheximida durante 24 horas en la determinación de la concentración óptima y no tóxica de esta

		Cicloheximida				
		Control	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
LRP1		207969.375	159378.750	51715.750	25731.500	25412.344
		124787.875	89190.000	24357.813	14073.125	12284.938
		340286.875	210928.500	87619.375	42030.188	48987.188
β-actina		499206.875	423348.500	470518.250	512043.250	570935.875
		84975.500	71422.063	63458.250	75502.563	71014.250
		241571.313	168277.625	223884.438	254985.000	335405.938
		Control	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
		1.000	0.904	0.264	0.121	0.107
		1.000	0.850	0.261	0.127	0.103
		1.000	0.890	0.278	0.117	0.104
Promedio		1.000	0.881	0.268	0.122	0.105
Desviación estándar		0.000	0.028	0.009	0.005	0.002
Coefficiente de variabilidad (%)		0.000	3.139	3.315	4.127	1.871

Anexo 16. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 0 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de

Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Albúmina (µg/mL)					
	0	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.092	0.240	0.355	0.587	1.014	1.640
	0.088	0.234	0.355	0.587	0.984	1.616
	0.093	0.224	0.337	0.587	0.987	1.646
Promedio	0.091	0.233	0.349	0.587	0.995	1.634
Desviación estándar	0.003	0.008	0.010	0.000	0.017	0.016
Coefficiente de variabilidad (%)	2.991	3.538	2.949	0.033	1.669	0.983

Anexo 17. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 8 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de

Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Albúmina (µg/mL)					
	0	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.091	0.240	0.354	0.588	1.011	1.643
	0.088	0.234	0.358	0.586	0.984	1.616
	0.089	0.224	0.337	0.587	0.983	1.646
Promedio	0.089	0.233	0.350	0.587	0.993	1.635
Desviación estándar	0.002	0.008	0.011	0.001	0.016	0.017
Coefficiente de variabilidad (%)	2.053	3.474	3.152	0.114	1.571	1.022

Anexo 18. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 16 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de

Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Albúmina (µg/mL)					
	0	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.093	0.247	0.388	0.632	1.049	1.824
	0.093	0.245	0.375	0.631	1.089	1.874
	0.092	0.247	0.366	0.638	1.056	1.895
Promedio	0.093	0.246	0.376	0.634	1.065	1.864
Desviación estándar	0.000	0.001	0.011	0.004	0.021	0.036
Coefficiente de variabilidad (%)	0.208	0.513	2.981	0.563	1.984	1.937

Anexo 19. Absorbancia de albúmina a diferentes concentraciones para la cuantificación de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento de Bafilomicina A1 y MG132 durante 24 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de

Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Albúmina (µg/mL)					
	0	125	250	500	1000	2000
Absorbancias	0.090	0.220	0.325	0.622	0.952	1.717
	0.086	0.211	0.323	0.632	0.952	1.711
	0.093	0.205	0.333	0.645	0.950	1.732
Promedio	0.090	0.212	0.327	0.633	0.951	1.720
Desviación estándar	0.004	0.008	0.006	0.012	0.001	0.011
Coefficiente de variabilidad (%)	4.090	3.547	1.715	1.872	0.146	0.635

Anexo 20. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 0 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Control	CHX + Baf A1	CHX + MG132
Absorbancias	0.471	0.477	0.477
	0.477	0.471	0.468
	0.487	0.488	0.488
Promedio	0.478	0.479	0.478
Desviación estándar	0.008	0.009	0.010
Coefficiente de variabilidad (%)	1.753	1.863	2.096
Proteínas (µg/mL)	406.306	406.722	405.750
Proteínas totales (µg/mL)	1218.917	1220.167	1217.250

Anexo 21. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 8 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Control	CHX + Baf A1	CHX + MG132
Absorbancias	0.479	0.519	0.457
	0.475	0.517	0.463
	0.476	0.523	0.468
Promedio	0.477	0.520	0.463
Desviación estándar	0.002	0.003	0.006
Coefficiente de variabilidad (%)	0.385	0.596	1.225
Proteínas (µg/mL)	403.944	457.694	386.583
Proteínas totales (µg/mL)	1211.833	1373.083	1159.750

Anexo 22. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 16 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Control	CHX + Baf A1	CHX + MG132
Absorbancias	0.510	0.602	0.546
	0.514	0.607	0.539
	0.517	0.622	0.556
Promedio	0.514	0.611	0.547
Desviación estándar	0.003	0.010	0.009
Coefficiente de variabilidad (%)	0.617	1.674	1.591
Proteínas (µg/mL)	406.395	514.173	443.432
Proteínas totales (µg/mL)	1219.185	1542.519	1330.296

Anexo 23. Absorbancia y cantidad de proteínas en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina y MG132 durante 24 horas en la determinación del tiempo de vida media de LRP1 y efectos de Bafilomicina A1 y MG132 sobre este

	Control	CHX + Baf A1	CHX + MG132
Absorbancias	0.462	0.596	0.572
	0.451	0.609	0.574
	0.462	0.603	0.576
Promedio	0.458	0.603	0.574
Desviación estándar	0.006	0.007	0.002
Coefficiente de variabilidad (%)	1.407	1.079	0.378
Proteínas (µg/mL)	403.931	584.625	548.097
Proteínas totales (µg/mL)	1211.792	1753.875	1644.292

Anexo 24. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 sin tratamiento durante 0, 8, 16 y 24 horas para la determinación del tiempo de vida media de LRP1

	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
LRP1	410307.500	189358.000	101134.000	82490.375
	348094.750	198926.625	68551.000	53182.875
	393000.000	178940.000	89000.000	74000.000
β-actina	387900.750	376667.750	388133.875	412864.250
	330254.500	396976.625	251494.125	294207.000
	368000.000	362000.000	326000.000	391000.000
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
	1.058	0.503	0.261	0.195
	1.054	0.501	0.273	0.181
	1.068	0.494	0.273	0.189
Promedio	1.060	0.499	0.269	0.188
Desviación estándar	0.007	0.004	0.007	0.007
Coefficiente de variabilidad (%)	0.679	0.894	2.628	3.791

Anexo 25. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con Bafilomicina A1 durante 0, 8, 16 y 24 horas para la determinación del tiempo de vida media de LRP1 afectado por Bafilomicina A1

	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
LRP1	289141.750	287897.750	258301.250	145694.750
	301808.500	300133.625	305521.500	190859.375
	173000.000	211000.000	63000.000	84000.000
β-actina	282227.500	318613.500	351306.875	333446.875
	304842.125	347188.125	423653.375	464001.125
	171000.000	245000.000	90500.000	189000.000
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
	1.024	0.904	0.735	0.437
	0.990	0.864	0.721	0.411
	1.012	0.861	0.696	0.444
Promedio	1.009	0.876	0.718	0.431
Desviación estándar	0.017	0.024	0.020	0.017
Coefficiente de variabilidad (%)	1.726	2.691	2.762	4.029

Anexo 26. Densitometría de manchas de LRP1 en células HepG2 luego del tratamiento con MG132 durante 0, 8, 16 y 24 horas para la determinación del tiempo de vida media de LRP1 afectado por MG132

	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
LRP1	294621.875	113235.625	46078.250	44119.875
	272515.500	112035.875	57504.813	65684.375
	153000.000	79000.000	30200.000	22700.000
β-actina	278476.063	246818.875	179239.688	230065.000
	259182.750	245034.000	214990.438	307209.063
	146000.000	163000.000	109000.000	115000.000
	0 horas	8 horas	16 horas	24 horas
	1.058	0.459	0.257	0.192
	1.051	0.457	0.267	0.204
	1.048	0.485	0.277	0.197
Promedio	1.052	0.467	0.267	0.198
Desviación estándar	0.005	0.015	0.010	0.006
Coficiente de variabilidad (%)	0.484	3.301	3.741	3.107