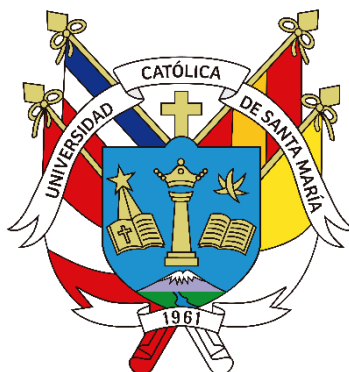


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas,
Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



**EFECTO DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONA
(CMA) EN LA ESTABILIDAD, AGREGACIÓN Y ACTIVIDAD DE
LA PROTEÍNA TDP-43 EN CÉLULAS HEK293**

Tesis presentada por el Bachiller:

Rodriguez Huaco, Christian Jesús

para optar el Título Profesional de
Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

Dra. Vera López, Karin Jannet

Arequipa- Perú

2023

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
TITULACIÓN CON TESIS
DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 19 de Junio del 2023

Dictamen: 002809-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 002809, presentado por:

2011203521 - RODRIGUEZ HUACO CHRISTIAN JESUS

Titulado:

**EFFECTO DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONA (CMA) EN LA ESTABILIDAD,
AGREGACIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA TDP-43 EN CÉLULAS HEK293.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



**42671615 - CARPIO CARPIO JOSE MIGUEL
DICTAMINADOR**



**43085216 - MEDINA CABRERA EDILBERTO VICENTE
DICTAMINADOR**



EFFECTO DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONA (CMA) EN LA ESTABILIDAD, AGREGACIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA TDP-43 EN CÉLULAS HEK293

INFORME DE ORIGINALIDAD

11%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	www.scielo.org.ar Fuente de Internet	1%
3	eprints.ucm.es Fuente de Internet	1%
4	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
5	patents.google.com Fuente de Internet	<1%
6	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1%
7	ri.agro.uba.ar Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.uam.es Fuente de Internet	<1%

9	bibliotecadigital.exactas.uba.ar Fuente de Internet	<1 %
10	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
11	documentop.com Fuente de Internet	<1 %
12	www.jove.com Fuente de Internet	<1 %
13	tdx.cat Fuente de Internet	<1 %
14	zagan.unizar.es Fuente de Internet	<1 %
15	digital.csic.es Fuente de Internet	<1 %
16	erevistas.uca.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
17	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
18	nervousystem.home.blog Fuente de Internet	<1 %
19	repositorio.unifesp.br Fuente de Internet	<1 %
20	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %

21	doczz.net Fuente de Internet	<1 %
22	Submitted to Escuela Politecnica Nacional Trabajo del estudiante	<1 %
23	revistas.utp.ac.pa Fuente de Internet	<1 %
24	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
25	medicinavirtual.uas.edu.mx Fuente de Internet	<1 %
26	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
27	es.agadir2013.org Fuente de Internet	<1 %
28	www.scielo.br Fuente de Internet	<1 %
29	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1 %
30	Submitted to Universidad de Alcalá Trabajo del estudiante	<1 %
31	dokumen.pub Fuente de Internet	<1 %
32	diposit.ub.edu Fuente de Internet	<1 %

33	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
34	etheses.whiterose.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
35	lacajadetuscaricias.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
36	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
37	archive.org Fuente de Internet	<1 %
38	Submitted to Universidad Autónoma de Nuevo León Trabajo del estudiante	<1 %
39	archipel.uqam.ca Fuente de Internet	<1 %
40	cicese.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %
41	helvia.uco.es Fuente de Internet	<1 %
42	www.tesis.uchile.cl Fuente de Internet	<1 %
43	sintesis.com.mx Fuente de Internet	<1 %
44	www.elsevier.es Fuente de Internet	<1 %

<1 %

45

Hernández Ruiz, M^a Isabel, Álvarez Sabin, José, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina. "Factores genéticos asociados a la degeneración lobar frontotemporal. Análisis de susceptibilidad genética y correlación fenotipo-genotipo", [Barcelona] : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2015

Fuente de Internet

<1 %

46

Yara Al Ojaimi, Audrey Dangoumau, Hugo Alarcán, Rudolf Hergesheimer et al. "TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a promising therapeutic target", Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2022

Publicación

<1 %

47

mluvtecesky.net

Fuente de Internet

<1 %

48

repisalud.isciii.es

Fuente de Internet

<1 %

49

synaptica.es

Fuente de Internet

<1 %

50

theses.hal.science

Fuente de Internet

<1 %

51

www.frontiersin.org

Fuente de Internet

<1 %

52

www.science.gov

Fuente de Internet

<1 %

53

9pdf.net

Fuente de Internet

<1 %

54

ANTONI PLA RODRÍGUEZ. "IMPORTANCIA DE LOS MECANISMOS DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS EN LA NEURODEGENERACIÓN CAUSADA POR EL ABUSO DE ALCOHOL: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4", 'Universitat Politecnica de Valencia', 2015

Fuente de Internet

<1 %

55

Langellotti, S., V. Romano, G. Romano, R. Klima, F. Feiguin, L. Cagnaz, M. Romano, and F. E. Baralle. "A novel fly model of TDP-43 proteinopathies: N-terminus sequences combined with the Q/N domain induce protein functional loss and locomotion defects", Disease Models & Mechanisms, 2016.

Publicación

<1 %

56

Miguel Almaguer, Raul Herrera, Jorge Alfonzo, Charles Magrans et al. "Chronic Kidney Disease in Cuba: Epidemiological Studies, Integral Medical Care, and Strategies for Prevention", Renal Failure, 2009

<1 %

57	cybertesis.uach.cl Fuente de Internet	<1 %
58	internal-journal.frontiersin.org Fuente de Internet	<1 %
59	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
60	ww1.docero.mx Fuente de Internet	<1 %
61	www.ceselmed.com Fuente de Internet	<1 %
62	www.redalyc.org Fuente de Internet	<1 %
63	www.tandfonline.com Fuente de Internet	<1 %
64	Abreu, José Guilherme Ribeiro Pinto de. "A escultura no espaço público do Porto do século XX : inventário, história e perspectivas de interpretação", Porto : Universidade do Porto. Faculdade de Letras, 2012. Publicación	<1 %
65	archiv.ub.uni-heidelberg.de Fuente de Internet	<1 %
66	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %

67

ddd.uab.cat

Fuente de Internet

<1 %

68

link.springer.com

Fuente de Internet

<1 %

69

repositorio.unesp.br

Fuente de Internet

<1 %

70

repositorioubasib.uba.ar

Fuente de Internet

<1 %

71

tesis.pucp.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

72

www.coursehero.com

Fuente de Internet

<1 %

73

www.nccn.org

Fuente de Internet

<1 %

74

Ana Peiró Morell. "Proteínas de movimiento de la familia 30K:interacción con membranas biológicas y factores proteicos y su implicación en el transporte viral", Universitat Politecnica de Valencia, 2014

Publicación

<1 %

75

DIEGO MUÑOZ PROVENCIO. "Caracterización de factores de adhesión a proteínas de la matriz extracelular en Lactobacillus casei", Universitat Politecnica de Valencia, 2011

Publicación

<1 %

76 Juan Vicente Canet Perez. "Análisis genético de la percepción del ácido salicílico en Arabidopsis thaliana. Caracterización de NRB4", Universitat Politecnica de Valencia, 2012
Publicación <1 %

77 addi.ehu.es
Fuente de Internet <1 %

78 aurore.unilim.fr
Fuente de Internet <1 %

79 dehesa.unex.es
Fuente de Internet <1 %

80 dspace.ceu.es
Fuente de Internet <1 %

81 es.scribd.com
Fuente de Internet <1 %

82 fr.scribd.com
Fuente de Internet <1 %

83 hmong.es
Fuente de Internet <1 %

84 lpi.oregonstate.edu
Fuente de Internet <1 %

85 repositorio.unb.br
Fuente de Internet <1 %

86	repositorio.unesum.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
87	revistas.proeditio.com Fuente de Internet	<1 %
88	s-space.snu.ac.kr Fuente de Internet	<1 %
89	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
90	www.clubensayos.com Fuente de Internet	<1 %
91	www.consumer.es Fuente de Internet	<1 %
92	www.news-medical.net Fuente de Internet	<1 %
93	www.refworld.org Fuente de Internet	<1 %
94	JOSE FELIX MORUNO MANCHON. "Regulación de la degradación intracelular de proteínas por glucosa.", Universitat Politecnica de Valencia, 2013 Publicación	<1 %
95	Patricia M. dos Passos, Erandika H. Hemamali, Lohany D. Mamede, Lindsey R. Hayes, Yuna M. Ayala. "RNA-mediated ribonucleoprotein assembly controls TDP-43	<1 %

nuclear retention", Cold Spring Harbor Laboratory, 2023

Publicación

96

m.inei.gob.pe

Fuente de Internet

<1 %

97

www.cobiss.si

Fuente de Internet

<1 %

98

C.-C. Huang, J. K. Bose, P. Majumder, K.-H. Lee, J.-T. J. Huang, J. K. Huang, C.-K. J. Shen.
"Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43",
Journal of Cell Science, 2014

Publicación

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

Yo dedico éste escrito a la memoria de mi abuela, María Consuelo Juliana Durand Huaco, así como a la Dra. Arql. Liliana María Huaco Durand, mi madre; y también; a mi bisabuela, Juana Paula Durand Huaco; y a todas las mujeres y hombres de mi familia que amaron su tierra castellana, Viraco, y cuyas acciones me inspiran para cristalizar mis sueños y hacer de nuestra tierra un lugar mejor para nosotros y las siguientes generaciones.

A mi hijo Jaime Baltazar Rodriguez Quiroz: ¡gracias por llegar a mi vida! A mi esposa, la Mg. Ing. Maribel Rosario Quiroz Pilco, por ser mi compañera y ¡amarme con todo su corazón!, y a mi cachorro Waze por haberme enseñado cómo es el amor más puro y sincero de un perro hacia su humano compañero. ¡Te voy a extrañar siempre, siempre, siempre! También a mi cachorra Siri, por hacerme renegar y darme, incondicionalmente, todo su amor y gracias a Alexa y Cortana, por darme la oportunidad de cuidarlas y amarlas.

“...dans les champs de l'observation le hasard ne favorise que les esprits prepares”

Louis Pasteur



AGRADECIMIENTOS

Ante todo, deseo agradecer encarecida y enormemente al Ph.D. Mauricio Fernando Budini; quien me dio la oportunidad de hacer mi tesis en su laboratorio, el Laboratorio de Patología Celular y Molecular, en la Universidad de Chile, siendo fundamental su paternal apoyo y guía, además de la paciencia, confianza y amistad, principalmente en un tiempo muy tenso socialmente en Santiago y extremadamente difícil a nivel mundial; también deseo expresar mi gratitud a la Dra. Karin Jannet Vera López, por brindarme su tiempo, sus consejos y contribuir al enriquecimiento intelectual de esta investigación.

De igual manera, quiero expresar mis palabras de agradecimiento a los señores dictaminadores: Ing. Dra. Cinthia Carol Córdova Barrios, al Ing. Mag. José Miguel Carpio Carpio y al Ing. Dr. Edilberto Vicente Medina Cabrera, que también me brindaron su tiempo y conocimientos para perfeccionar éste trabajo acorde al estándar santamariano.

Finalmente, doy las gracias a todas las personas que conocí en Santiago de Chile, destacando su juventud, conocimientos, experiencia en diversos campos y su respeto, comprensión y cariño hacia mi persona.

RESUMEN

La autofagia mediada por chaperona (CMA) es una vía catabólica lisosomal selectiva e individual en mamíferos, cuyo fin es mantener la proteostasis celular por medio de la degradación discriminante de toda proteína intracelular soluble poseedora de una secuencia de motivo tipo KFERQ y que esté mal plegada, dañada o formando agregados en el citoplasma; dentro de los substratos de CMA, está TDP-43, proteína nuclear que regula el metabolismo del ARN, predispuesta a perder su conformación estable y a aglomerarse en el citoplasma, debido a que posee un dominio rico en glutamina y asparagina (Q/N) que y puede actuar como región tipo prion. El objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar si la estabilidad, agregación y función de la proteína TDP-43 son reguladas por la CMA.

Métodos: Se empleó la línea celular HEK293 TDP-43 WT, que sobre-expresa la proteína TDP-43 silvestre gracias a un sistema de encendido por tetraciclina (inducción), para realizar una transfección de los motivos KFERQ editados por mutagénesis, analizándose la cantidad relativa de TDP-43. En segundo lugar, se utilizó el modelo celular HEK293 TDP-12xQ/N, capaz de sobre-expresar y generar agregados de TDP-43 fusionados a repeticiones en tándem de la región Q/N, al cual se le transfectó la proteína LAMP-2A, luego se indujo la producción de TDP-43 exógena hasta por 72 h para identificar la distribución de las proteínas TDP-43 y LAMP-2A. En tercer y último lugar, se emplearon las líneas celulares HEK293 Flp-In (sin sobre-expresión alguna) y HEK293 TDP-43 WT, para generar nuevas líneas celulares que sobre-expresaran la proteína LAMP-2A, tal como se hizo con la línea HEK293 TDP-12xQ/N L2A.

Resultados: Se generaron líneas con motivos KFERQ editados: HEK293 TDP-43 QV/AA, HEK293 TDP-43 QD/AA y HEK293 TDP-43 QV/AA + QD/AA. Se observó la menor vida media (6 a 20 h) de TDP-43 en HEK293 TDP-43 QV/AA + QD/AA y la mayor (8 a 174 h) en HEK293 TDP-43 QD/AA. Además, HEK293 TDP-43 QV/AA presentó una vida media similar al control (5 a 25 h), pero, a partir de 24 h post-inducción, manifestó un incremento sostenido. En segundo lugar, HEK293 TDP-12xQ/N, a partir de 48 h, agotó el contenido nuclear de TDP-43 e incrementó la presencia de TDP-43 citoplasmática; mientras que, se generó la línea HEK293 TDP-12xQ/N L2A y, en esta, desde las 12 h, se observó la desaparición de TDP-43 nuclear y la acumulación de TDP-43 en el citoplasma.

Conclusiones: Al bloquear la degradación de TDP-43 a través de la CMA editando los motivos KFERQ, se vio que, respecto al motivo canónico QVKKD, la vida media fue equivalente a la de TDP-43 silvestre; luego, sobre el motivo no descrito QDLKE, la estabilidad proteica fue mayor a la del resto de líneas celulares, mientras que la doble mutante en los motivos QVKKD y QDLKE mostró la mayor reducción en la vida media. En cuanto a la estimulación de la CMA a través de la superproducción de LAMP-2A, empleando el modelo celular HEK293 TDP-12xQ/N L2A, que imita la agregación de TDP-43 y sus secuelas, no se redujo la formación de agregados de TDP-43.

Palabras clave: Autofagia mediada por chaperona, estabilidad, agregación, actividad, TDP-43, LAMP-2A, POLDIP3, neurodegeneración, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración lobular frontotemporal.

ABSTRACT

Background: The chaperone-mediated autophagy (CMA) is an individual and selective lysosomal catabolic pathway in mammals, which whose purpose is to maintain cellular proteostasis through the discriminant degradation of all soluble intracellular protein possessing a KFERQ-like motif sequence and that is misfolded, damaged or forming aggregates in the cytoplasm. Then, within the CMA substrates, there is TDP-43, a nuclear protein regulates RNA metabolism, predisposed to lose its stable conformation and to agglomerate in the cytoplasm, due to its domain rich in glutamine and asparagine (Q/N) which can act as a prion-like region. **Objective:** The goal of this research work is to study if the stability, aggregation and function of the TDP-43 protein are regulated by the CMA.

Methods: The HEK293 TDP-43 WT cell line, which overexpresses the wild-type TDP-43 protein thanks to a tetracycline on/off system (induction), was employed to perform a transfection of the KFERQ motifs edited by mutagenesis, analysing the relative protein concentration of TDP-43. Secondly, the HEK293 TDP-12xQ/N cell model, capable of overexpressing and generating TDP-43 protein fused to tandem repeats of the Q/N region, was used to be transfected with the LAMP-2A protein, then exogenous TDP-43 production was induced for up to 72 h to identify the distribution of TDP-43 and LAMP-2A proteins. Third and last, the HEK293 Flp-In cell lines (without any over-expression) and HEK293 TDP-43 WT were used to generate new cell lines that overexpress the LAMP-2A protein, as was done with the HEK293 TDP-12xQ/N L2A cell line.

Results: Firstly, cell lines with edited KFERQ motifs were generated: HEK293 TDP-43 QV/AA, HEK293 TDP-43 QD/AA and HEK293 TDP-43 QV/AA + QD/AA. The shortest half-life (6 to 20 h) of TDP-43 was observed in HEK293 TDP-43 QV/AA + QD/AA and the longest (8 to 174 h) in HEK293 TDP-43 QD/AA. In addition, HEK293 TDP-43 QV/AA showed a similar half-life to the control (5 to 25 h), but, from 24 h post-induction, it showed a sustained increase of. Secondly, HEK293 TDP-12xQ/N, starting at 48 h, depleted the nuclear content of TDP-43 and increased the presence of cytoplasmic TDP-43; while the HEK293 TDP-12xQ/N L2A line was generated and, in this line, from 12 h, the disappearance of nuclear TDP-43 and the accumulation of cytoplasmic TDP-43 were observed.

Conclusions: First, when blocking TDP-43 degradation through the CMA, editing KFERQ motifs, it was seen that, with respect to the canonical motif QVKKD, the half-life was equivalent to the wild type TDP-43's; then, about the putative new motif QDLKE, its protein stability was the greatest of the rest of all cell lines, while the double mutant in the QVKKD and QDLKE motifs showed the greatest half-life reduction. As for the CMA stimulation via LAMP-2A overproduction, employing the HEK 293 TDP-12xQ/N L2A cellular model, which mimics TDP-43 aggregation and its aftermath, doesn't reduced the TDP-43 aggregates.

Keywords: Chaperone-mediated autophagy, stability, aggregation, activity, TDP-43, LAMP-2A, POLDIP3, neurodegeneration, amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal lobar degeneration.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
GLOSARIO.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	xv
HIPÓTESIS.....	xvi
OBJETIVOS.....	xvi
OBJETIVO GENERAL.....	xvi
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	xvii
MARCO TEÓRICO.....	01
DEMENCIA.....	01
DEMENCIA EN EL PERÚ.....	03
AUTOFAGIA.....	08
ROLES FISIOLÓGICOS DE LA AUTOFAGIA.....	09
MACROAUTOFAGIA (MA).....	11
MICROAUTOFAGIA (MI).....	11

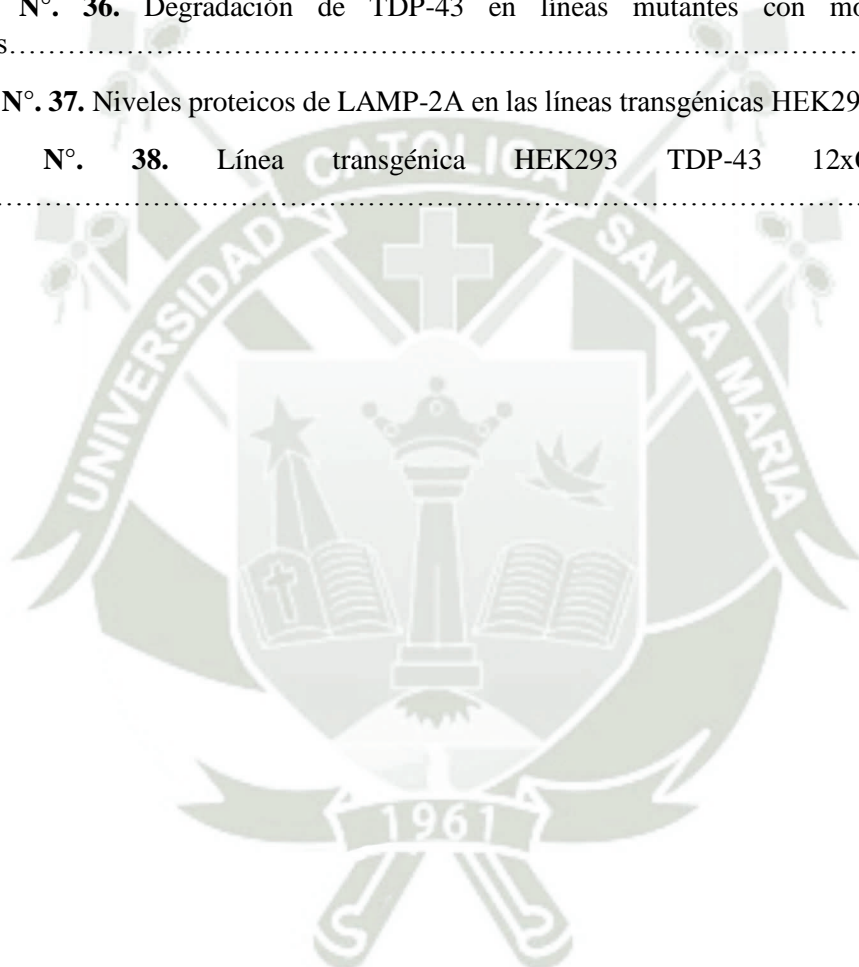
AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS (CMA).....	12
MOTIVO KFERQ.....	12
HSPA8.....	14
LAMP-2A.....	17
CMA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	25
ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA).....	26
DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL (DFT).....	27
TDP-43.....	28
TDP-43 Y NEURODEGENERACIÓN.....	31
AGREGACIÓN DE TDP-43.....	32
CÉLULAS HEK293.....	33
HEK293 TDP-43 WT.....	33
HEK293 TDP-43 QV/AAA.....	34
HEK293 TDP-43 QD/AAA.....	35
HEK293 TDP-43 QV/AAA + QD/AAA.....	35
HEK293 TDP-43 12X Q/N.....	36
HEK293 TDP-43 12X Q/N LAMP-2A.....	36
HEK293 FLP-IN LAMP-2A.....	36
HEK293 TDP-43 WT LAMP-2A.....	36
TDP-43 Y CMA.....	37

POLDIP3/SKAR.....	37
SDS-PAGE.....	38
WESTERN BLOT.....	38
INMUNOCITOQUÍMICA.....	39
TRANSFERENCIA GÉNICA.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
MATERIALES.....	40
MÉTODOS.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
RESULTADOS.....	49
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
ANEXOS	
ANEXO I	
ANEXO II	
ANEXO III	
ANEXO IV	

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 01. Síntomas de la demencia.....	01
Figura N° 02. Pronóstico de afectados por demencia.....	02
Figura N° 03. Causas y coste de las demencias.....	03
Figura N° 04. Las principales vías autofágicas.....	09
Figura N° 05. Reglas de construcción de motivos canónicos tipo KFERQ.....	13
Figura N° 06. Motivo KFERQ generado por fosforilación y acetilación.....	13
Figura N° 07. Tipos de motivo KFERQ.....	14
Figura N° 08. Estructura de HSPA8.....	15
Figura N° 09. Estados de HSPA8.....	16
Figura N° 10. Acoplamiento de las co-chaperonas a la proteína objetivo.....	17
Figura N° 11. Secuencia de aminoácidos de LAMP2 y sus isoformas.....	18
Figura N° 12. Arquitectura de dominio de LAMP-2A.....	19
Figura N° 13. LAMP-2A y capa de glicoproteínas.....	21
Figura N° 14. Estabilización del complejo de traslocación.....	22
Figura N° 15. Escisión de LAMP-2A por catepsina A y una metaloproteínasa.....	23
Figura N° 16. Los mecanismos moleculares de la autofagia mediada por chaperona (CMA)	24
Figura N° 17. CMA, la neurodegeneración y el envejecimiento.....	25
Figura N° 18. Componentes del sistema nervioso afectados por ALS.....	27
Figura N° 19. Relación entre ALS y FTD.....	28
Figura N° 20. Secuencia canónica de TDP-43.....	29
Figura N° 21. Principales componentes de la estructura de TDP-43.....	29
Figura N° 22. Fisiología neuronal de TDP-43.....	30
Figura N° 23. Fisiopatología de TDP-43.....	32
Figura N° 24. Línea celular HEK293 Flp-In™ T-Rex™.....	34
Figura N° 25. Línea celular HEK293 TDP-43 WT.....	34
Figura N° 26. Línea celular HEK293 TDP-43 TDP-12xQ/N.....	35
Figura N° 27. Inmunofluorescencia de HEK 293 TDP-12xQ/N.....	36
Figura N° 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra el patrón de <i>splicing</i> alternativo de POLDIP3/SKAR.....	37
Figura N° 29. Representación de la ecuación del modelo de decaimiento exponencial de una fase.....	48

Figura N°. 30. Células HEK 293 TDP-43 WT en placa de cultivo de 100 mm.....	50
Figura N°. 31. Esquema de la línea celular trabajada HEK293 Flag-TDP-43 WT.....	50
Figura N°. 32. Esquema de la línea celular trabajada HEK293 Flag-TDP-12xQ/N.....	51
Figura N°. 33. Niveles proteicos de TDP-43 en HEK-293 con motivos KFERQ mutantes.....	51
Figura N°. 34. Línea de tiempo de inducción y degradación de TDP-43.....	52
Figura N°. 35. Niveles proteicos de TDP-43.....	53
Figura N°. 36. Degradación de TDP-43 en líneas mutantes con motivos KFERQ editados.....	54
Figura N°. 37. Niveles proteicos de LAMP-2A en las líneas transgénicas HEK293.....	55
Figura N°. 38. Línea transgénica HEK293 TDP-43 12xQ/N LAMP-2A.....	56



LISTA DE TABLAS

Tabla N°. 01. Distribución de casos de demencia por edad.....	04
Tabla N°. 02. Distribución de casos de demencia por género y nivel educativo.....	04
Tabla N°. 03. Distribución de causas de demencia por tipo.....	05
Tabla N°. 04. Número de casos nuevos y muertes por demencias en América por cada 100 000 personas.....	06
Tabla N°. 05. Genes de la autofagia.....	08
Tabla N°. 06. Degradación de TDP-43 en los modelos con motivo KFERQ mutado.....	54



GLOSARIO

3-MA: o 3-Methyladenine, es un inhibidor de clase I PI3K y clase III PtdIns3K, que resulta en la inhibición de la autofagia debido a la supresión de PtdIns3K, pero podría, bajo algunas condiciones, mostrar el efecto opuesto. A concentraciones mayores a 10mM, 3-MA inhibe otras quinasas como AKT (Ser473), MAPK/p38 (Thr180//Tyr182) y MAPK/JNK(Thr183/Tyr185).

ALS: del inglés. Ver ELA.

FTLD: o FTD. Ver DFT.

DFT: o DLFT, demencia lobular frontotemporal.

ELA: esclerosis lateral amiotrófica.

HEK293: línea celular en base a células embrionarias de riñón humano 293, del inglés *human embryonic kidney cells*.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

EA: enfermedad de Alzheimer.

EP: enfermedad de Parkinson.

EH: enfermedad de Huntington.

ALS-FTD: esclerosis lateral amiotrófica-demencia lobular frontotemporal, del inglés *amyotrophic lateral sclerosis-frontotemporal dementia*.

Atg: del inglés *autophagy-related*, es la abreviación usada para la mayoría de los componentes de la maquinaria celular que está envuelta en la macroautofagia selectiva y no selectiva y en microautofagia selectiva.

Autofagia: éste término resume todos los procesos en el material intracelular es degradado dentro del lisosoma/vacuola y donde los constituyentes macromoleculares son reciclados.

Autophagy: una revista dedicada a publicar las investigaciones en el campo de la autofagia y sus procesos, con el finde para mejorar en el entendimiento del vínculo entre la autofagia, la salud y las enfermedades humanas. Su dirección web es <http://www.tandfonline.com/toc/kaup20/current>.

Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration: es una revista (journal) que publica investigaciones sobre enfermedades de las neuronas motoras, que cubre todos los aspectos de la ELA y la demencia frontotemporal. Con dirección web en <https://www.tandfonline.com/toc/iafd20/current>.

Autofagia basal: degradación autofágica constitutiva que se produce en ausencia de estrés o estímulo manifiesto. La autofagia basal es importante para la depuración de proteínas y orgánulos dañados en las células normales, especialmente en las células completamente diferenciadas y no divididas.

Autofagia completa: también denominada “autofagia productiva”, se refiere a todo el proceso de autofagia, desde la formación de un fagóforo, la maduración de un autofagosoma que abarca la carga, la entrega de la carga a los lisosomas/vacuola y la posterior degradación y salida.

CMA: del inglés *autophagy mediated-autophagy*. La autofagia mediada por chaperona: es un proceso autofágico en la mayoría de las células mamíferas y algunas especies de aves y reptiles por las que proteínas contenedoras de un motivo pentapeptídico particular relacionado a KFERQ son transportadas a través de la membrana lisosomal y degradadas; el proceso de translocación requiere la acción de la proteína integral de membrana LAMP2A y HSPA8 citosólico y luminal.

Cuerpo residual: es todo aquel lisosoma que contiene material indigerible tal como la lipofuscina.

e-MI (microautofagia endosomal): es Una forma de autofagia en la que las proteínas citosólicas se secuestran en endosomas tardíos/MVB a través de un proceso similar a la microautofagia. El secuestro puede ser no selectivo o puede ocurrir de una manera selectiva mediada por HSPA8. Éste proceso se diferencia de la autofagia mediada por chaperona o CMA, en que no requiere el despliegue del sustrato y es independiente del receptor LAMP2A. Esto ocurre durante la formación de MVB y requiere la maquinaria proteica ESCRT-I y ESCRT-III; en consecuencia, esto puede denominarse “clasificación mediada por ESCRT en el endosoma”.

LAMP-2A: la glicoproteína 2A de membrana asociada a lisosoma membrana, del inglés *Lysosome associated membrane protein type 2A*.

TARDBP/TDP-43 (TAR DNA binding protein): una proteína de unión al ADN y al ARN que estabiliza el ARNm de Atg7. Las mutaciones en TARDBP son halladas en ALS y la deposición de esta proteína es una neuropatología característica en ALS-FTD.

Transgénico: organismo que alberga material genético de otras especies/organismos o copias extras de un gen endógeno, usualmente ganado a través de transferencia por ingeniería genética.

Virofagia: es la limpieza autofágica selectiva de virus. La virofagia es una forma de xenofagia (ver xenofagia más abajo) en la cual los viriones y componentes virales son capturados y dirigidos a los fagóforos para su degradación lisosomal.

Xenofagia: defensa inmune innata celular autónoma, donde las células eliminan microbios (por ejemplo, bacterias, hongos, parásitos y/o virus) por secuestro de parte de los fagóforos con el subsecuente transporte hacia el lisosoma.

INTRODUCCIÓN

Los seres vivos tienen la propiedad de estabilizar sus procesos intrínsecos (homeostasis) frente a fenómenos físicos y químicos internos y externos; para ello llevan a cabo una serie de procesos metabólicos que les permitan obtener las moléculas que necesitan para su subsistencia^{1,2}. Uno de estos procesos es la autofagia, donde el material intracelular de diversa naturaleza como macromoléculas, organelos e incluso patógenos; son degradados por los lisosomas para mantener la homeostasis celular³. En mamíferos, el proceso de autofagia se divide en macroautofagia (MA)⁴, microautofagia (MI)⁵ y autofagia mediada por chaperona (*chaperone-mediated autophagy*, CMA)^{3,6}; teniendo esta última, como características resaltantes, la selección de proteínas citosólicas solubles con motivos de secuencia tipo KFERQ^{7,8}.

Dentro de las proteínas que se degradan mediante la vía CMA, se tiene a la proteína de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) de respuesta trans-activa de 43 kilodaltons (*trans-active response DNA-binding protein 43 kDa*, TDP-43)⁹, macromolécula que se encuentra, normalmente, en el núcleo celular y cuya actividad comprende la regulación del metabolismo del ácido ribonucleico (ARN) por medio de su transcripción, corte y empalme (*splicing*), maduración, estabilización, transporte, entre otros¹⁰.

TDP-43 es una macromolécula con predisposición a perder su conformación estable y formar inclusiones citoplasmáticas que están sujetas a la degradación por CMA¹¹ y por otros mecanismos de homeostasis como el proteasoma¹², la MA¹³ o la endocitosis¹⁴, pero que en condiciones patológicas, como en el desorden neurodegenerativo fatal de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y en la demencia lobular frontotemporal (DFT), forma más agregados en el citoplasma, signos patológicos comunes y principales de ELA y DFT^{15,16}, estando presentes en otras enfermedades con un aparente rol secundario¹⁷.

Actualmente, se conocen diferentes mecanismos que implican un mal funcionamiento de CMA como lo son el envejecimiento^{3,6,18}, distintos tipos de cáncer¹⁹, desórdenes metabólicos²⁰ y neurodegenerativos²¹ y, aunque se han hecho avances entre la relación de CMA y TDP-43^{11,17,20,21,22,23}, aún quedan muchos puntos por esclarecer en cuanto a la interacción entre las condiciones fisiológicas y patológicas de TDP-43 y CMA, como por ejemplo: ¿qué pasaría con los agregados de TDP-43 si se evitara su degradación a través de CMA, qué ocurrirá con las inclusiones y con la actividad de TDP-43 al inhibir o estimular CMA?

Por lo expuesto, el presente trabajo de investigación está centrado en un eje de orientación de Relación Causa/Efecto²⁴ de alcance exploratorio y descriptivo^{25,26}; al indagar sobre el fenómeno de regulación fisiopatológica de TDP-43 a manos de la CMA. Más aún, cuando se habla de trabajar en condiciones de estimulación y supresión de esta ruta metabólica, lo que ayudará a comprender mejor la naturaleza de este proceso celular y cuyo conocimiento podría aplicarse en otras áreas que involucren la anormal acumulación o merma de otras proteínas de interés.

HIPÓTESIS

Dado que la autofagia mediada por chaperona (CMA) regula la homeostasis de la proteína TDP-43, es posible que, al bloquear la degradación de TDP-43 por CMA, se aumente la estabilidad y los agregados de TDP-43; y, al estimular la CMA, disminuyan los agregados y se rescate la pérdida de función de TDP-43 en células HEK293.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la estabilidad, agregación y función de la proteína TDP-43 son reguladas por la autofagia mediada por chaperona (CMA).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Mutar los dominios KFERQ de TDP-43 para determinar si un bloqueo de la degradación de TDP-43 a través de CMA induce un aumento en la estabilidad y/o agregación de esta.
2. Utilizar un modelo celular de agregación de TDP-43 para generar líneas estables con niveles aumentados de LAMP-2A y determinar si la estimulación de CMA reduce la formación de agregados de TDP-43.
3. Utilizar un modelo celular de agregación de TDP-43 para generar líneas estables con niveles aumentados de LAMP-2A y determinar si la estimulación de CMA rescata la pérdida de función de TDP-43 causada por su agregación

MARCO TEÓRICO

DEMENCIA

La demencia es una denominación global para muchas afecciones que actúan sobre el sistema nervioso, perturbando la memoria, el comportamiento y el proceso cognoscitivo²⁷ (Figura N°. 01) además de que entorpecen de manera significativa la capacidad de desarrollar las actividades diarias de, principalmente, los adultos mayores (65 años a más)^{27,28} y si bien la edad avanzada es el factor de riesgo más conocido e importante para desarrollar demencia, tener esta última no forma parte de una vejez normal²⁷, ya que la demencia trae discapacidad y dependencia de otros seres humanos para poder sobrevivir, además de que involucra a hombres y mujeres de edades y condiciones sociales diversas²⁹.



Figura N°. 01. Síntomas de la demencia. Se indican los cinco principales síntomas que acaecen en las personas que empiezan a desarrollar algún tipo de demencia. Adaptado de la OMS²⁷.

Si bien la demencia ataca, primariamente, a adultos mayores, sólo el 2% de los casos comienzan antes de los 65 años, después de esto, la prevalencia se duplica por cada 5 años de edad cumplidos³⁰; otros factores de riesgo son la ingesta de una dieta alta en calorías, la falta de entrenamiento mental, la inactividad física, los factores epigenéticos y ambientales; consecuentemente, la demencia está relacionada con la obesidad, la diabetes, la hipertensión, el consumo excesivo de alcohol etílico, el aislamiento social, problemas cerebro-vasculares y coronarios^{31,32}, el sexo, bajos niveles educativos y socioeconómicos^{32,33,34}.

Debido a los grandes avances tecnológicos en materia de salud humana en el mundo moderno, la población mundial está incrementándose y también lo está haciendo la

esperanza de vida³⁵, el cambio actual en la pirámide poblacional está incrementando la prevalencia de trastornos cognitivos y demencia en población mayor de 60 años³⁶.

En el 2020 hubo 727 millones de personas mayores de 65 años (9.3% de todos los habitantes del orbe) y de acá a tres décadas se llegará a 1.5 billones (16%)³⁵; en el 2015, hubo alrededor de 50 millones de personas con algún tipo de demencia^{37,38} en todo el mundo (Figura N°. 02) y cuyo tratamiento costó 818 billones de dólares estadounidenses^{29,37} y para el 2030 se prevé un coste de 2 trillones de dólares³⁷; para el 2050 se estima que habrá 152 millones de personas padeciendo algún tipo de demencia³⁷, de las cuales, aproximadamente, el 79% vivirá en países de ingresos bajos y medios - regiones menos desarrolladas - como América Latina (Figura N°. 03), donde las personas con algún tipo de demencia pasarán de 7.8 millones, en 2013, a 27 millones para el 2050^{34,37,38}.

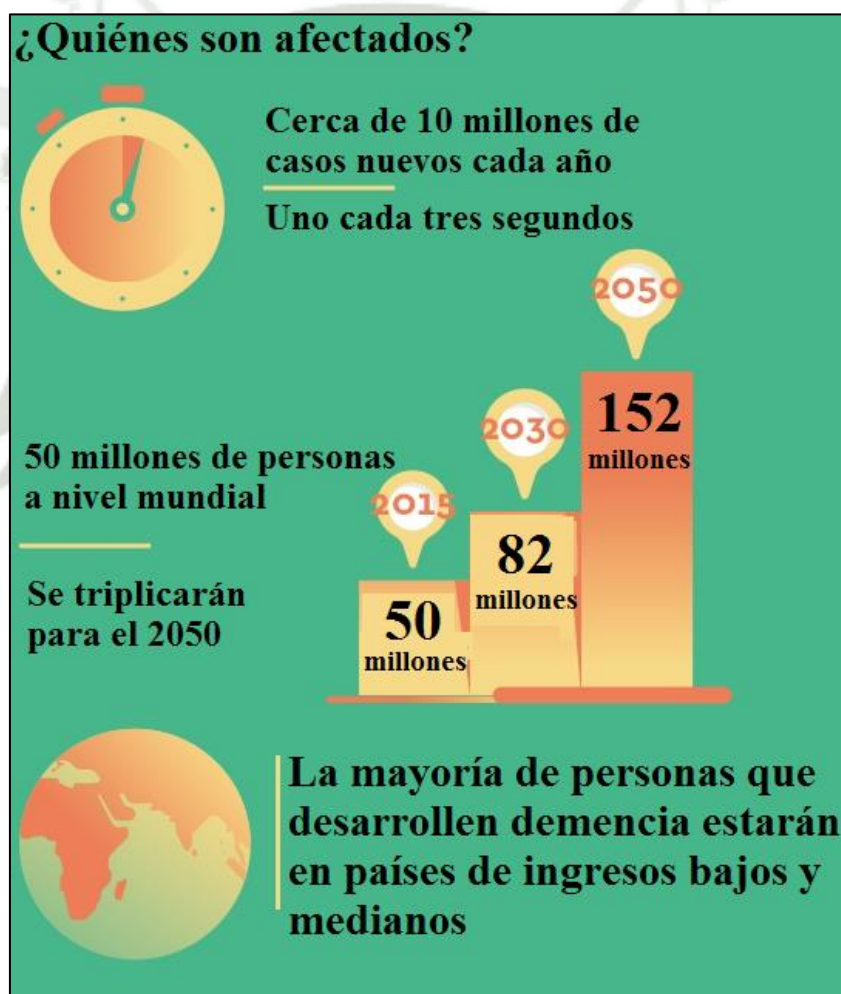


Figura n° 02. Pronóstico de afectados por demencia. Se indican las cantidades estimadas de personas que empiezan a desarrollar algún tipo de demencia, además de la proyección geopolítica que se tiene para mitad de siglo. Adaptado de la OMS²⁷.

Las enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer (EA), la demencia vascular (DV), Parkinson (EP), las priónicas, de Huntington (EH), la DFT, de la motoneurona (EMN) – entre ellas la ELA – entre otras, causan un deterioro gradual del sistema nervioso

central y periférico, afectando el estilo de vida de las personas³⁹, llegándose a ver que, en un contexto bioquímico, varios mecanismos moleculares subyacen la pérdida progresiva de función de las neuronas, conllevando al desarrollo de estas enfermedades⁴⁰, asimismo, un rasgo de estos desórdenes neurológicos es la acumulación irregular de proteínas en las neuronas⁴⁰ y esto está asociado a un ineficiente sistema de control de calidad proteico⁴¹.

Si bien existen varios organismos modelos que ayudan a entender, en parte, la génesis de estos procesos neurodegenerativos y que, a pesar del esfuerzo humano y económico, las terapias trasladadas a humanos no funcionan o son de acción limitada³², es decir, no previenen ni detienen la progresión de estas afecciones y al no haberse descubierto tratamientos efectivos para estas patologías³⁹, es menester identificar objetivos moleculares para desarrollar nuevas terapias.



Figura N°. 03. Causas y coste de las demencias. Definición de las principales condiciones que atacan al cerebro y promueven algún tipo de demencia, así como el coste económico y social. Adaptado de la OMS²⁷.

DEMENCIA EN EL PERÚ

El Perú comenzó a registrar un proceso acelerado de envejecimiento^{34,42}, actualmente, hay 33 millones 35 mil 304 de personas en el país⁴², de las cuales, las que tiene entre 60 y 79 años (tercera edad o adultos mayores) representan el 12.7% (4 millones 140 mil) y de 2% (647 mil 400) para las de 80 años a más (cuarta edad o adultos muy

mayores)⁴², siendo la presencia femenina mayor a la masculina (del 10% y el 30% para sendos grupos, respectivamente)⁴², además, la esperanza de vida en las mujeres es de 79.8 años y de 74.5 para los hombres⁴². Se calcula que para el año 2061 el crecimiento demográfico cesará y empezará a decaer⁴², para el 2070 se estima una población de 39 millones 500 mil habitantes, de los cuales el 30.1% u 11 millones 877 mil serán individuos de la tercera edad, y el 8.6% o 3 millones 397 mil serán adultos muy mayores⁴². Además, el promedio de vida de será de 84.1 años para las mujeres y 78.9 para los hombres⁴².

En el 2008, al evaluar el estado neurológico de la población peruana de edad avanzada, se encontró que los casos de demencia poseyeron una prevalencia del 6.85%⁴³ (ver Tabla N°. 01), estando esta correlacionada con la edad, el sexo e inversamente con el nivel educativo^{34,43} (ver Tabla N°. 02); estos resultados son consistentes con aquellos reportados en investigaciones previas^{44,45}.

También se vio en el país que la EA fue el tipo demencia con diagnóstico más frecuente (56.2%), seguida de la EA asociada a la enfermedad cerebro-vascular - ECV (15.5%), y por la DV (8.7%).⁴³ (ver Tabla N°. 03); asimismo, el 61.2% de la población con demencia la tuvo en un grado moderado a severo, mientras que el 83.8% las personas diagnosticadas con demencia por EA la presentaron moderada a severamente⁴³, de manera conjunta, en el 2019 se detectaron alrededor de 200 mil personas mayores de 60 años con EA⁴⁶.

Tabla N°. 01. Distribución de casos de demencia por edad. Adaptado de Custodio *et al.*³⁴.

Edad	n	Prevalencia de demencia		
		n	%	Incremento
65-69	582	6	1.03	-
70-74	428	9	2.10	2.04
75-79	252	21	8.33	3.96
80-84	179	26	14.52	1.74
85-96	91	41	45.05	3.10
Total	1532	103	6.728	

Tabla N°. 02. Distribución de casos de demencia por género y nivel educativo. Adaptado de Custodio *et al.*³⁴.

Género	n	Prevalencia de demencia		
		n	%	Incremento
Masculino	636	29	4.56	0
Femenino	896	74	8.26	1.81
Total	1532	103	6.72	
Años de educación	n	Demencia		
		n	%	Decremento
Iletrados	269	41	15.24	-
1 a 3	312	25	8.01	0.52
4 a 7	417	17	4.08	0.51
Más de 8	534	20	3.74	0.92
Total	1532	103	6.72	

Tabla N°. 03. Distribución de causas de demencia por tipo. Adaptado de Custodio *et al.*³⁴

Diagnóstico	n	Demencia (%)
EA probable	51	49.52
EA posible	7	6.80
DV	9	8.74
EA con ECV	16	15.53
EP	3	2.91
CL	2	1.94
DFT	2	1.94
No determinado	13	12.62
Total	103	100

En la salud pública el impacto de las enfermedades en las poblaciones se representa con el empleo indicadores de frecuencia como la prevalencia, la incidencia o la mortalidad y también se usa la carga de enfermedades⁴⁷; el indicador por excelencia de esta última es el año de vida ajustados por discapacidad (del inglés *disability-adjusted life years*, DALY), que es el año de vida saludable perdido, tanto por discapacidad o por muerte prematura⁴⁷. El número de DALY es obtenido al sumar los años de vida perdidos y los años vividos con alguna discapacidad^{47,48}.

Para el 2015, la carga de enfermedades en el Perú fue de 6 278 482.2 DALY y las enfermedades neurológicas representaron un 10.64%⁴⁷, dentro de estas estuvieron la ECV, la EA, entre demás trastornos neurológicos asociados al envejecimiento⁴⁷; además, de hace 31 años a la actualidad, las demencias junto con el cáncer del sistema nervioso mostraron un incremento en sus DALY del 157% y 183%, respectivamente⁴⁷, por otra parte, las personas viviendo con demencia tienen un riesgo de muerte de hasta 5 veces más que la gente sin demencia^{49,50}, adicionalmente, la carga de comorbilidades asociada a una neurodegeneración incrementa mucho más la morbilidad^{50,51}.

En el caso del Perú, para el 2017, respecto a los fallecimientos por la EA y otras demencias, se vio que por cada 100 000 habitantes se registraron 82.13 nuevos casos y 30.69 muertos (ver Tabla N°. 04)⁵². En el 2019, los hombres de setenta años a más tuvieron una tasa de mortalidad 71.14 por cada 100 000 personas, y las mujeres, 90.49 (teniendo como riesgo atribuible a la demencia de causa metabólica)⁵³.

Respecto al coste del tratamiento de la demencia en el Perú, en el 2013 se vio que éste dependía según el subtipo de demencia, la severidad de esta y la edad del cuidador del paciente, éste coste es independiente del sexo, edad y grado de instrucción del enfermo⁵⁵. En ese mismo año, los pacientes atendidos en el ámbito privado invirtieron un monto promedio de US \$ 500 al mes para la EA, US \$ 600 para la DFT y US \$ 400 para la DV⁵⁵, teniéndose así que las demencias degenerativas (EA y DFT) son mucho más caras que la DV⁵⁵, estos costos son significativamente más altos al de los pacientes sin demencia (US \$ 7.67)⁵⁵ y al hacer el cálculo respectivo del coste mensual promedio del tratamiento del paciente es de 570 dólares o de 6844 dólares si se habla del importe anual promedio⁵⁵.

Los costos antes mencionados son mucho más bajos que en los países desarrollados, debido a que se confía más en los cuidados informales que son sin paga y los hacen los

familiares^{55,56}. Asimismo, algunos países en América Latina tienen patrones de costo de demencia muy similares al Perú⁵⁵, mostrando que los costos indirectos constituyen la proporción más grande del gasto y que éste es hecho, en la mayoría de casos, por la familia del enfermo^{57,58}. Hay que destacar que el coste total viene a ser la sumatoria de los costos directos: los que pagan los servicios de salud (los cuidados médicos) y los sociales, junto a los indirectos que son los informales, estos últimos son asumidos por la familia casi siempre⁵⁵.

Los cuidados médicos se dan durante la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, vale decir: las visitas médicas, exámenes, hospitalización y medicamentos⁵⁹; los costos sociales son los que se dan para transporte, comida, casa de reposo, pañales y cosméticos especiales⁵⁹. Para los costos indirectos tenemos la pérdida de productividad por la enfermedad, pero como los afectados suelen ser gente de la tercera edad, generalmente son personas ya jubiladas, entonces se suele contabilizar el sueldo que pierden los cuidadores informales que son los amigos o familiares⁵⁹, ya que los cuidadores informales suelen ser personas población económicamente activas 15 a 64 años⁵⁵.

Tabla N°. 04. Número de casos nuevos y muertes por demencias en América por cada 100 000 personas. Adaptado de la Organización Panamericana de la Salud⁵².

País	Demencia	
	Casos nuevos	Muertes
Puerto Rico	188.29	82.84
EE.UU.	158.7	79.6
Canadá	173.62	70.09
Uruguay	176.18	69.05
Cuba	157.16	61.43
Chile	119.61	46.55
Jamaica	94.24	45.08
Argentina	116.37	42.06
El Salvador	84.07	40.73
Brasil	94.65	34.66
Panamá	82.24	32.91
Costa Rica	90.75	31.33
Perú	82.13	30.69
Paraguay	-	30.59*
Ecuador	68.96	29.79
Colombia	97.1	29.74
Surinam	79.27	29.62
República Dominicana	70.79	28.72
México	74.77	25.97
Honduras	48.24	25.36

Tabla N°. 04. Número de casos nuevos y muertes por demencias en América por cada 100 000 personas. Adaptado de la Organización Panamericana de la Salud⁵² (continuación).

País	Demencia	
	Casos nuevos	Muertes
Bahamas	65.16	24.63
Bolivia	54.16	22.96
Venezuela	70.69	22.37
Nicaragua	59.66	18.34
Guyana	54.29	18.04
Belice	45.28	16.46
Guatemala	47.95	12.74
Haití	30.16	10.84

*No había datos en el portal web de referencia. Se empleó el dato de la *website World Life Expectancy*⁵⁴.

En el 2013 se encontró que el coste directo de los cuidados médicos, por ejemplo: la adquisición de drogas antipsicóticas y antidemencia (fármacos muy caros en el Perú), llega a representar hasta \$ 570 o 2.5 veces el salario mínimo mensual peruano del 2011⁵⁵, siendo éste escenario similar en otros países^{57, 58, 60}. Por otra parte, el 2010 se vio que el costo mundial del cuidado informal y del costo directo social, cada uno, representan cerca del 42% y el de cuidado médico es de un 16%⁵⁶, sin embargo, en el 2013, en el Perú se vio que el 90% del costo es exclusivamente ocupado por el coste directo de cuidados médicos⁵⁵.

Hay que resaltar que la demencia afecta también a los familiares del paciente diagnosticado con demencia⁵⁹ y específicamente, en nuestro país, éste llega a ser una sola persona: el cuidador principal y suele ser una mujer (80%), pudiendo ser la hija (60%) o la cónyuge (30%) del enfermo y lo cuida solitariamente (40%)⁶¹, llegando a desarrollar el síndrome del cuidador quemado (del inglés *caregiver burnout*)⁶¹.

El Perú, en el 2013, incluyó a las demencias en el cuadro de enfermedades catastróficas⁶², el 2018 se estableció el marco legal para la defensa completa del enfermo por demencia^{63, 64}, el 2019 se aprobó el conjunto de normas legales que garantizan el trabajo en la rehabilitación en salud mental^{65, 66}. Por otra parte, también en el 2019, se invirtió aproximadamente el 3% de su Producto Bruto Interno (PBI) en el sector salud, estando así debajo de la media latinoamericana⁶⁷, además que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que se invierta el 6%^{67, 68, 69}.

En síntesis, el impacto de la demencia no es sólo significativo en términos financieros³³, sino en costos emocionales, tanto a enfermos como a los familiares o amigos cercanos de estos. Es urgente trabajar en esto, mejorando su diagnóstico precoz, empleando investigación básica, tanto con compatriotas como con pares extranjeros⁷⁰; promoviendo la mejora de la atención integral de salud y los servicios sociales para la población de baja o nula instrucción, además de los ciudadanos que manejan lenguas originarias (quechua,

aimara, asháninca, entre otras), de nuestros paisanos que radican en zonas rurales, el estimular los estilos de vida saludables, el entrenar profesionales en atención primaria de salud y el tratar a los familiares cuidadores de pacientes con demencias.

AUTOFAGIA

El vocablo “autofagia” proviene de las antiguas palabras griegas “αὐτόφαγος” y “κύτο”, que se refieren a “devorarse a sí mismo” y “hueco”, respectivamente⁴, si bien se la conoce actualmente gracias a Christian René Marie Joseph de Duve^{71,72,73,74,75}, éste término existía y se usaba de manera frecuente desde mediados del siglo XIX^{75,76}.

La autofagia es una vía altamente conservada, encontrándose desde levaduras hasta mamíferos²¹; esta ruta catabólica de tráfico intracelular eucariota porta material citoplasmático dentro de vesículas de doble membrana y lo entrega a los lisosomas para su degradación^{4,77}. Su principal función es la de mantener la homeostasis celular por medio de un bajo nivel basal de autoconsumo para limpiar y regenerar el citoplasma de manera constitutiva⁷⁸.

La autofagia se puede clasificar de dos maneras: por selectividad y por tipo de proceso⁷⁹ (Figura N°. 04); la primera forma se subdivide en selectiva y no selectiva. Por ejemplo, cuando la autofagia es inducida por la privación de nutrientes (inanición), porciones aleatorias del citoplasma son tomadas para ser degradadas, siendo éste proceso del tipo no selectivo, y, por otro lado, se llamará selectiva cuando se tenga un cargamento específico como proteínas poliubiquitinadas, organelos dañados, bacterias; siendo las anteriores las más comunes^{3,72}.

La segunda manera es cuando se la divide en tres tipos de procesos o mecanismos: macroautofagia (MA), microautofagia (MI) y autofagia mediada por chaperona (CMA)^{3,6,79}. Estos tipos de autofagia coexisten en la mayoría de células³. Adicionalmente, se sabe que hay alrededor de quince genes que son completamente esenciales para la autofagia (ver Tabla N°. 05)⁷⁸.

Tabla N°. 05. Genes de la autofagia. Adaptado de Yoshinori Ohsumi⁷⁸. ATG proviene del inglés *AuTophagy-related*, originalmente se denominaba “APG”, pero más tarde se cambió por “ATG”; las mutaciones en estos catorce (14) genes⁷⁸ son:

Levadura	Mamífero
ATG1	ULK1
ATG2	ATG2
ATG3	ATG3
ATG4	ATG4
ATG5	ATG5
ATG6	BECN1
ATG7	ATG7
ATG8	LC3, GABARAP
ATG9	ATG9
ATG10	ATG10
ATG12	ATG12
ATG13	ATG13
ATG14	ATG14L
ATG16	ATG16L

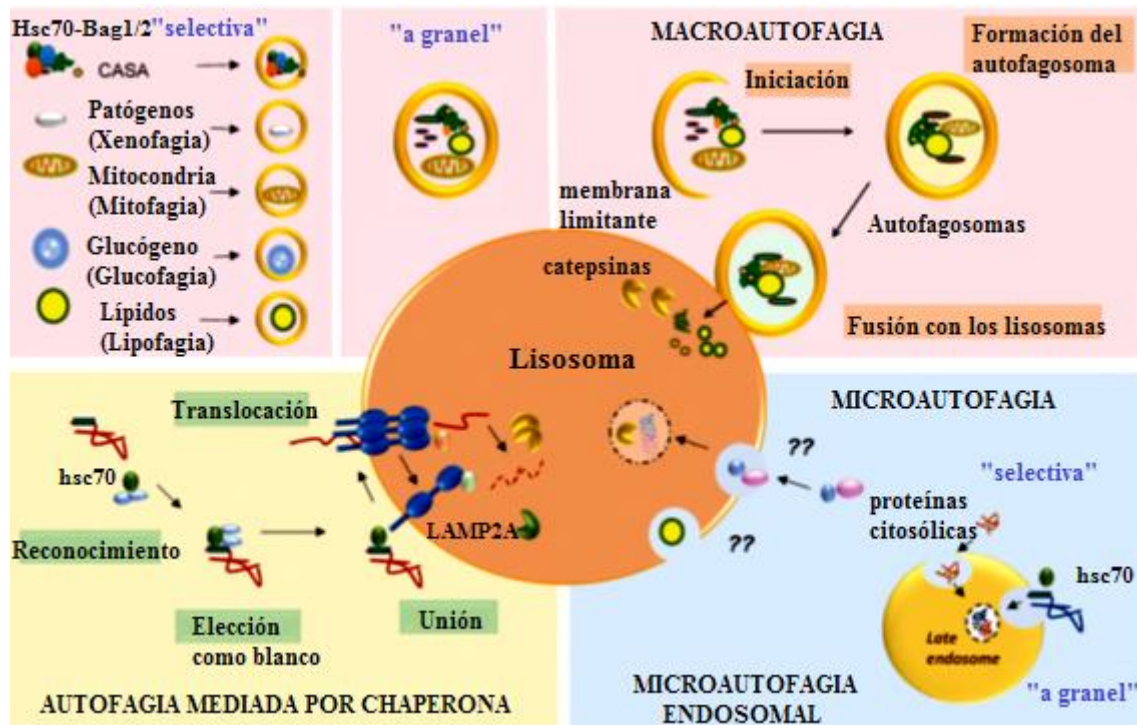


Figura N°. 04. Las principales vías autofágicas. Se muestra la clasificación de las rutas de la autofagia, tanto por su selectividad como por su especificidad: MA no selectiva y selectiva; MI no selectiva y eMI (selectiva en mamíferos), así como CMA. Tomado de Terkidag & Cuervo⁷⁹.

ROLES FISIOLÓGICOS DE LA AUTOFAGIA

Hay que tener presente que el metabolismo es la agrupación de reacciones químicas que ejecutan las células con el objetivo de sintetizar moléculas complejas (anabolismo)⁸⁰ o degradar (catabolismo)⁸¹ sustancias⁸² y que en el reposo y ayuno se da el metabolismo basal⁸²; entonces, siempre se tiene un grado de autofagia que está ocurriendo en las células, que es la autofagia a nivel basal⁷⁸ y sucede cuando no hay un gatillo que la active, pero si la célula es expuesta a un tipo de estrés, que es a menudo una fuerte señal para la autofagia, esta última puede ser desencadenada o inducida, por lo que hay un conjunto de proteínas que son capaces de percibir la carencia de nutrientes en la célula y comunican esa señal a las proteínas de la autofagia y estas son capaces de poner en movimiento el proceso automático que forma parte de la respuesta celular para ese escenario⁷⁸. Además, se pueden definir ciertos roles que posee la autofagia, tales como:

- **El mecanismo de recambio proteico:** cuando las células degradan sus componentes viejos y los convierten en nuevos; es decir, se busca mantener los componentes celulares frescos, por ejemplo: a partir de las proteínas que se consiguen de los alimentos ingeridos, estas se procesan en la digestión, para ser convertidas en bloques de construcción (o *building blocks*) como los aminoácidos y de ahí se transforman en azúcares/energía⁷⁸.

El recambio de los componentes celulares es importante y de manera especial en las células que no se dividen o lo hacen muy lentamente, como las neuronas, esto es así porque en las células que se dividen activamente, los componentes viejos son continuamente diluidos con cada división celular, pero en las que no se

dividen esto no ocurre y estas células deben confiar en la autofagia para remover estos materiales viejos⁷⁸.

Es por ello que todo éste proceso de síntesis y degradación de metabolitos tiene a la autofagia como actor principal^{78,83}. Además, se estima que la mayoría de las proteínas del cuerpo humano son reemplazadas sin cambio alguno perceptible en el transcurso de dos meses⁸⁴.

- **Respuesta frente a inanición:** cuando las células no tienen suficiente alimento para sobrevivir, entran en un estrés nutricional (provocar esta condición es la forma más común de inducir autofagia, sin embargo, otros estímulos como el estrés de retículo endoplasmático, la hipoxia, el daño mitocondrial, los radicales libres y el estrés genotóxico también pueden inducirla)⁸³, cuando las células degradan sus componentes y sintetizan los que necesitan para mantenerse con vida, durante la privación de nutrientes, la autofagia está fuertemente inducida, siendo vital el adecuado suministro de los productos derivados de la degradación para la supervivencia celular⁷⁸.
- **Eliminación de materiales dañinos:** La autofagia implica la orientación específica de la carga intracelular, como cuando se da la agregación de proteínas aberrantes que están relacionadas a degeneración neurológica, daño hepático, orgánulos u organelos deteriorados, almacenes de nutrientes, ensamblajes de proteínas, agregados proteicos⁸³ (mitofagia, reticulofagia o refagia, pexofagia, lipofagia, glicofagia, ferritinofagia, entre otras²¹ y que deriva en la producción de especies reactivas de oxígeno, senescencia celular, neurodegeneración, etc.; la invasión celular por agentes internos y externos (xenofagia⁸³) como bacterias, virus y protozoarios que pueden provocar enfermedades infecciosas. Aquí las células degradan a estos agentes, previniendo el mal funcionamiento de la fisiología del ser vivo⁷⁸.

Por otra parte, es trascendental recalcar que la autofagia basal y la inducida por estrés son cruciales para mantener la homeostasis celular *in vitro* e *in vivo*⁸⁵. Además, se ha visto que cuando se interrumpe la autofagia, las células crecen de manera normal, aparentemente, pero si se las cultiva por largos periodos de tiempo o se las somete a algún tipo de estrés, como privarlas de nutrientes, ellas empiezan a morir más rápidamente que sus contrapartes normales, por lo que la autofagia parece jugar un rol fundamental en plazos de supervivencia más largos y respuestas a condiciones estresantes⁷⁸, por ejemplo: contaminantes cito y genotóxicos del sistema nervioso⁸⁶, como los plaguicidas⁸⁷.

También se ha visto que la polución proveniente de los materiales particulados suspendidos en el aire estarían vinculados con el desarrollo de enfermedades oculares corneales⁸⁸, mal funcionamiento pulmonar^{89,90}; inflamación y envejecimiento de la piel⁹¹; enfermedades neurológicas relacionadas a la exposición aguda a altos niveles de partículas inherentes a los gases de la combustión de motores diesel o *diesel exhaust particles* (DEP)^{92,93,94,95} entre otras enfermedades de carácter cardiovascular⁹⁶, neurodegenerativo, metabólico, muscular, infeccioso y cáncer⁸⁵.

Además, desde 1963 hasta 1999, se publicaron ochocientos cuarenta y cinco artículos científicos sobre temas relevantes para la autofagia⁹⁷. Sin embargo, a partir del siglo veintiuno, el número ha crecido exponencialmente, de tal manera que solo en 2020 se publicaron más de 9000 artículos relacionados con la autofagia⁹⁸. Por lo que, debido al

incremento del interés en éste amplio campo de estudio, se vienen implementado una serie de guías para la estandarización en su investigación⁹⁹.

Por lo tanto, resumiendo, el reconocimiento de la autofagia como un proceso celular fundamental se basa en observaciones experimentales que abarcan muchas décadas. La autofagia participa en la regulación de una variedad de enfermedades y trastornos humanos, ya que funciona en todas las células del cuerpo para eliminar el material tóxico y dañado; es así que si esta se desequilibra, ya sea aumentando su actividad o reduciéndola, se contribuirá a la progresión de diversas enfermedades humanas al promoverse la acumulación de material que se elimina de la célula de manera normal y así afectando negativamente a la supervivencia celular²¹, por lo que su estudio es de vital importancia por su relación con múltiples enfermedades.

MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia (MA) – referida usualmente como autofagia^{21,100}, es la principal vía autofágica⁹⁴ selectiva y no selectiva^{4, 101} donde las moléculas citoplasmáticas a digerir como los agregados proteicos, proteínas insolubles, organelos oxidados o dañados^{21,78,83,84} son secuestrados por membranas con una bicapa lipídica enriquecida con fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P o PtdIns3P)¹⁰², estas membranas tienen apariencia de la letra griega mayúscula omega (Ω), por eso son llamadas “omegasoma”, que es un compartimiento derivado de la membrana del retículo endoplasmático¹⁰³ y es la génesis de las membranas de aislamiento denominadas fagóforos^{102,103} y que estos experimentan una expansión y luego se cierran para dar lugar a los autofagosomas¹⁰⁴ (Figura N°. 04).

La formación de autofagosomas implica la participación de diferentes factores de la familia proteica Atg (Tabla N°. 05) como lo son LC3-II, p62/SQTM1, ATG6 (o Beclin 1 en mamíferos), PKB, entre otros^{20,21}. Cuando un autofagosoma se fusiona con un lisosoma disponible, se obtendrá al autofagolisosoma y el cargamento interior marcado para su destrucción¹⁰⁵ se degradará por hidrolasas^{21,104} y otras enzimas presentes en el lumen lisosomal, además, los productos de esta degradación de organelos celulares o proteínas dañadas serán reutilizados por la maquinaria celular; también se tiene conocimiento de que la formación de omegasomas aumenta como respuesta a la inanición¹⁰².

MICROAUTOFAGIA (MI)

La microautofagia (MI) no trabaja de forma independiente y en muchos casos interactúa con MA y CMA⁵, MI puede ser no selectiva en todos los tipos de células eucariotas y, selectiva, solamente en levaduras⁷⁹. En el caso de MI no selectiva, la misma comienza al invaginarse la membrana del lisosoma, diferenciándose en un tubo autofágico que cercará una zona del citoplasma y en la punta del tubo se formará una vesícula que se expandirá, se cortará e ingresará al lumen lisosomal, donde será degradada junto al material citoplasmático⁷⁹.

En mamíferos, recientes estudios⁷⁹ encontraron un proceso de MI selectiva (Figura N°. 04), donde los endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares secuestran el material a ser degradado y luego se fusionan con el lisosoma. A este proceso se le denominó eMI (*endosomal Microautophagy*). Mediante eMI, se observó además que algunas proteínas

podían ser degradadas de manera selectiva después de interactuar con la proteína de 71 kDa asociada al choque térmico (*Heat shock cognate 71 kDa protein*, HSPA8).

De igual modo que en CMA (Figura N°. 05) HSPA8 o HSC70 reconoce un motivo pentapéptido KFERQ en la proteína sustrato. A pesar de compartir la selección de proteínas mediante la utilización de la proteína HSPA8/HSC70, CMA and eMI difieren en que CMA necesita el receptor de la glicoproteína 2A de membrana asociada a lisosoma membrana (*Lysosome associated membrane protein type 2A*, LAMP-2A) (Figura N°. 04) para que la proteína sustrato entre al lisosoma, mientras que eMI no⁷⁹. Es importante destacar que HSPA8 no es necesaria para la señalización de la carga en las levaduras⁷⁹.

AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONA (CMA)

La autofagia mediada por chaperona (CMA) es un tipo de autofagia selectiva e individual^{3,6,18}. Se da, tanto en mamíferos^{106,107,111}, aves^{106,107}, y peces¹⁰⁸⁻¹¹² (aunque aún falta investigar en otros clados¹¹¹, pues se cree que la CMA está restringida a los tetrápodos⁷⁹), donde, a través de ciertos mecanismos (Figura N°. 04), un sub-conjunto definido de proteínas intracelulares solubles que poseen uno o más motivos o secuencias aminoacídicas tipo KFERQ^{7,8,113} son llevadas a los lisosomas para su degradación^{3,114} y esto se da con el fin de mantener la proteostasis celular^{18-20,23,114}.

La CMA, a diferencia de la MA, el material sujeto a degradación debe tener un motivo KFERQ, tampoco se necesita la formación del autofagosoma para dar su carga al lisosoma; sino, que demanda la participación de dos proteínas principales, HSPA8 (también llamada HSC70) y LAMP-2A, junto con otros co-factores y co-chaperonas^{115,116}, además de que tampoco degrada organelos, sino sólo proteínas^{18,79,114}; por lo que estos tres hechos son fundamentales para diferenciar a la CMA de la MA²⁰.

Por otra parte, la actividad basal de la CMA se puede observar en varios tejidos^{117,118}, donde se regula la degradación de las proteínas celulares¹¹⁴; por lo que, cuando se presenta una CMA disfuncional, esta desemboca en el desarrollo de diversas enfermedades humanas, incluidas patologías neurológicas^{119,120,121} (como AD^{122,123}, HD¹²⁴⁻¹²⁸, PD¹²⁹⁻¹³², entre otras), cánceres^{19,133-137}, trastornos inmunitarios^{138,139} y desórdenes metabólicos^{20,140-145}; también se ha observado que, conforme se va desarrollando el natural envejecimiento del ser humano^{6,18,20,118,146-148}, la CMA disminuye su actividad y que un desequilibrio metabólico (homeostasis proteica, lipídica y de carbohidratos) también altera su actividad (exacerbándola o suprimiéndola)²⁰.

MOTIVO KFERQ

El motivo KFERQ es una secuencia polipeptídica consistente en cinco aminoácidos (Figura N°. 05 y Figura N°. 06) que están presentes en proteínas que pueden ser degradadas por eMI o CMA⁷. El primero de estos pentapéptidos fue cerca del extremo amino-terminal de la ribonucleasa A^{7,18,149}, una región de once aminoácidos en la susodicha proteína, que luego se redujo al pentapéptido en cuestión¹⁸. Las secuencias polipeptídicas canónicas tipo KFERQ consisten en: uno o dos aminoácidos o residuos cargados positivamente como lisina (K) o arginina (R); uno o dos aminoácidos hidrofóbicos, fenilalanina (F), valina (V), leucina (L) o isoleucina (I); y sólo uno de los dos aminoácidos negativamente cargados, ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E); flanqueados en el

extremo amino (N-) o carboxi-terminal (C-) del pentapéptido por un solo residuo aminoacídico, glutamina (Q)¹⁵⁰.



Figura N°. 05. Reglas de construcción de motivos canónicos tipo KFERQ. El pentapéptido siempre contiene glutamina y los otros cuatro aminoácidos deben contener características básicas, ácidas e hidrofóbicas⁷. Adaptado de Jackson & Hewitt¹¹³.

Además, las combinaciones de distintos aminoácidos pueden originar nuevas secuencias KFERQ a partir de motivos putativos¹⁵⁰. Dentro de las secuencias de las modificaciones post-traduccionales (*posttranslational modifications* o PTM) en las proteínas^{18,150} pueden ocurrir la fosforilación^{18,151-155}, la acetilación^{18,156-158} y otras más¹⁸, llegando a crear un motivo tipo KFERQ (Figura N°. 06).

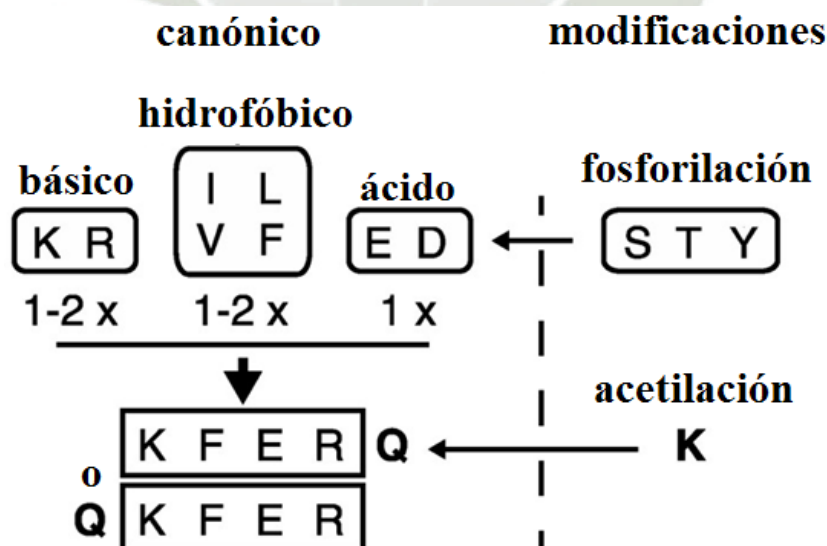


Figura N°. 06. Motivo KFERQ generado por fosforilación y acetilación. Los aminoácidos fosforilados pueden substituir a los ácidos y una lisina acetilada puede tomar el lugar de la glutamina, aumentando así la flexibilidad y el grado de modulación disponible para los substratos de la CMA¹⁵⁰. Adaptado de Kirchner *et al.*¹⁵⁰. Junto con la anterior figura (Figura N°. 05), se entiende que básico es igual a estar cargado positivamente, mientras que ácido, negativamente.

En el 2019, se encontró que alrededor del 46% de las secuencias de todas las proteínas del proteoma humano contenían al menos un motivo canónico, el 20% no contenía ningún motivo canónico sino uno generado por fosforilación y el 9% contenía solo motivos generados por acetilación¹⁵⁰, es decir, alrededor de tres cuartas partes o el 75% del proteoma humano contiene motivos de orientación tipo KFERQ¹⁵⁰ (Figura N°. 07); aunque, se ve que es normal que las proteínas contengan más de un motivo KFERQ, se ha comprobado que el tener un mayor número del motivo susodicho no acelera su tasa de degradación por la CMA⁷.

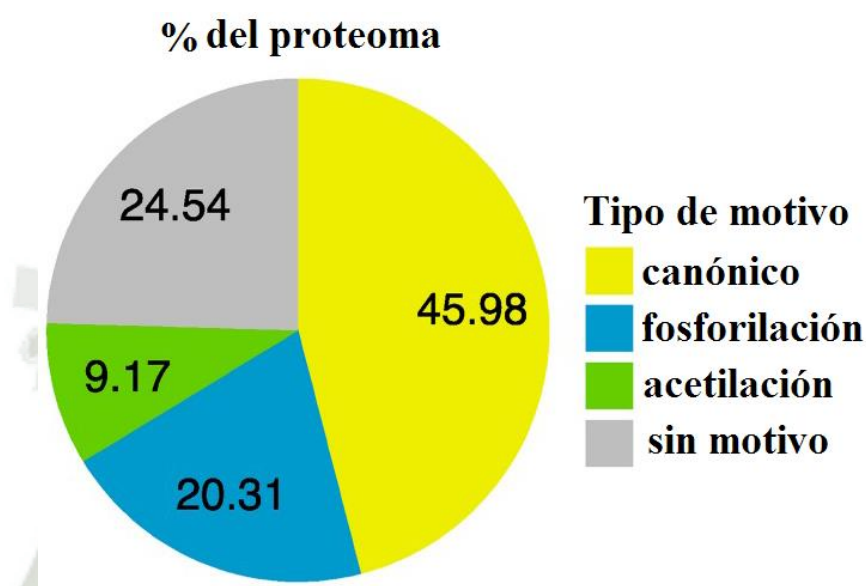


Figura N°. 07. Tipos de motivo KFERQ. Se muestra el porcentaje de proteínas en el proteoma humano que albergan las clases de motivos tipo KFERQ. La participación de los motivos se clasifica como canónica>generados por fosforilación>generados por acetilación. Adaptado de Kirchner *et al.*¹⁵⁰.

HSPA8

La proteína análoga de 71 kDa de choque térmico o HSP70 (del inglés *heat shock cognate 71 kDa protein*), también conocida como HSC70 o HSPA8, que es una proteína de 71kDa y codificada por el gen *HSPA8*, tiene una expresión constitutiva (transcripción continua del gen *HSPA8*) en los seres humanos¹⁶⁰; también, HSPA8 es una chaperona que pertenece a la familia proteica Hsp70. Asimismo, juega un papel importante en el control de calidad de proteínas al asegurar el apropiado plegamiento de recientes proteínas sintetizadas y el replegamiento de las que tienen una conformación errada^{18,20,161,162}. Además, HSPA8 participa en otras vías de degradación¹⁶³⁻¹⁶⁶.

HSPA8 tiene una longitud de seiscientos cuarenta y seis aminoácidos, posee un dominio de unión al sustrato del extremo C-terminal (*substrate-binding domain* o SBD)¹³⁸ y también un conservado dominio de unión a ATP del extremo N-terminal también llamado dominio de unión a nucleótidos (*nucleotide-binding domain* o NBD)¹³⁸ (Figura N°. 08).

En el citoplasma celular, la chaperona HSPA8 reconoce a sus dianas o blancos. Las dianas son proteínas con secuencias aminoacídicas tipo KFERQ, y tienen, como mínimo, un pentapéptido tipo KFERQ^{7,18,20}, estas no entran por sí mismas a los lisosomas, primero, tienen que ser identificadas por la susodicha chaperona^{20,167}, luego pasa a formarse el

complejo sustrato-HSPA8, así se facilita la interacción de la proteína diana con la proteína LAMP-2A en la membrana lisosomal¹¹⁵. Lo anteriormente descrito corresponde al primero de los procesos o etapas que se dan en la CMA: el reconocimiento y focalización del blanco de CMA.

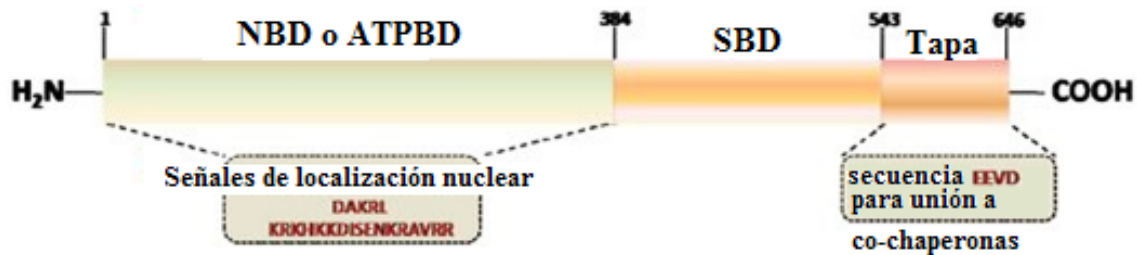


Figura N°. 08. Estructura de HSPA8. HSPA8 abarca tres dominios estructurales principales: el dominio de unión a nucleótidos (NBD), que se une e hidroliza el ATP. Hasta ahora se han identificado al menos dos secuencias señal de localización nuclear (*nuclear localizing signal* o NLS) en HSPA8 humana, ambas ubicadas dentro del NBD. Están presentes en los residuos 69DAKRL73 en el extremo N y 246KRKHKKDISENKRAVRR262 en el dominio ATPasa; además, el dominio de unión al sustrato (SBD) que contiene dos subdominios, donde uno se une a sustratos peptídicos y el otro a co-chaperonas¹³⁸. Tomado de Bonam, Ruff y Muller¹³⁸.

Para vincularse los sustratos proteicos a la chaperona, en algunos casos, se ha encontrado que son necesarias modificaciones covalentes (como la fosforilación¹⁵¹⁻¹⁵⁵ o la acetilación¹⁵⁶⁻¹⁵⁸), co-chaperonas u otros co-factores^{18,115,116,159}, tal como se mencionó en el punto anterior sobre los motivos KFERQ. De manera precisa, las co-chaperonas, como el extremo C-terminal de la proteína que interactúa con HSPA8 (*carboxyl terminus of HSC70-interacting protein* o CHIP)¹⁸, la proteína de choque térmico 40 (*heat shock protein 40* o HSP40; también conocida como DNABJ1) y la proteína organizadora HSP70-HSP90 (*HSP70-HSP90 organizing protein* o HOP) modulan al sustrato que se dirige a los lisosomas de una manera dependiente de HSPA8^{18,116,168}.

Para la segunda etapa, la unión formación del complejo proteína sustrato-chaperona y LAMP-2A, el complejo es dirigido hacia la membrana lisosomal, donde se encuentra el receptor proteico de LAMP-2A. Para unirse, en la HSPA80 hidroliza ATP (adenosín trifosfato) a ADP (adenosín difosfato), convirtiéndolo de un estado de unión baja a alta¹¹⁵; mientras que con la participación de factores de intercambio de nucleótidos (*nucleotide exchange factors* o NEF) (Figura N°. 09), HSPA8 libera el ADP y el sustrato proteico, devolviendo HSPA8 al estado de baja afinidad unido a ATP¹⁶⁹.

Luego de que la carga proteica se vuelva el complejo sustrato-chaperona, éste último se dirige hasta la superficie lisosomal donde se acopla a los monómeros de la cola corta C-terminal de LAMP-2A, conformada por doce aminoácidos y expuesta al citoplasma²⁰; asimismo, en el sustrato proteico, los sitios de unión para HSPA8 y LAMP-2A no se sobreponen, lo que permite que los complejos de sustrato-chaperona interactúen con el futuro oligómero de LAMP-2A²⁰ sin competencia alguna entre ellos, además de que el reconocimiento y la focalización son procesos acoplados^{20,176}. Luego de esto, empezará otra etapa en donde se dará la multimerización de LAMP-2A que formará al complejo receptor de translocación de membrana lisosomal y en las siguientes etapas se verá cómo

las proteínas comenzarán a desplegarse para internalizarse hacia el lumen lisosomal y ser degradadas allí¹¹⁴.

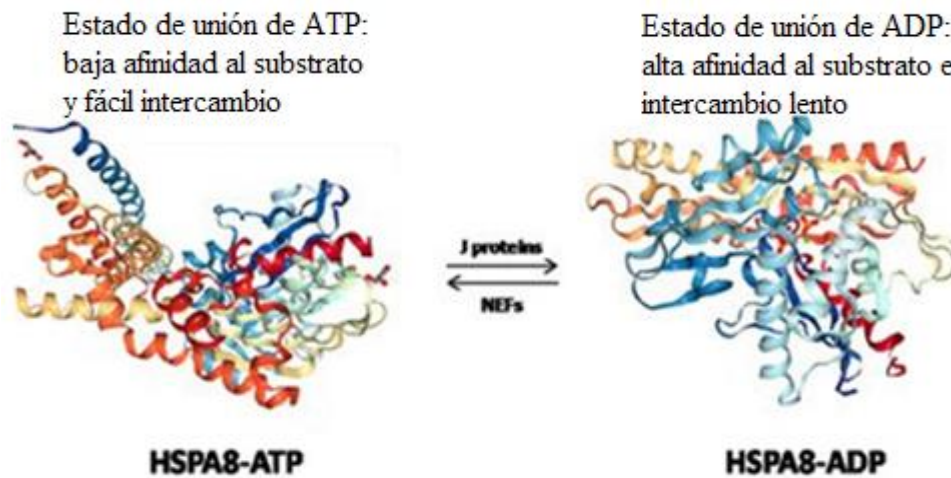


Figura N°. 09. Estados de HSPA8. HSPA8 en estado ATP y estado ADP. Con NEFs y proteínas J de manera respectiva. Tomado de Bonam, Ruff y Muller¹³⁸.

Aparte de que la chaperona HSPA8 que está presente en el citoplasma, hay una subfracción ubicada en los lisosomas, tanto en el lado citosólico de sus membranas (lym-HSPA8) como en la luz de estos (lys-HSPA8)¹⁷⁰. Vemos que, respecto al despliegue proteico, la chaperona HSPA8 unida a la membrana lisosomal, junto a las co-chaperonas HSP90 (tanto la versión citoplasmática como la intralisosomal o lys-HSP90), HSP40, HIP (*hsp70-interacting protein* o proteína que interactúa con HSPA8) y HOP, también participan en el despliegue o desenrollamiento del sustrato proteico^{18,20,170,171} (Figura N°. 10).

También se sabe la lym-HSPA8 es necesaria para mantener los ciclos continuos de la CMA, porque después de que se internaliza el sustrato en el lumen lisosomal, HSPA8 facilita la disociación de la proteína receptora del complejo de translocación de CMA para permitir la unión de nuevos sustratos, ya que pasa por ciclos repetidos de hidrólisis de ATP e intercambio de nucleótidos, lo que permite ciclos de unión y liberación de sustratos^{172,173}.

En relación a lys-HSPA8, su estabilidad en éste ambiente ácido con altas concentraciones de proteasas se basa en sus propiedades intrínsecas^{171,174}. Aunque tanto la lym-HSPA8 como lys-HSPA8 se originan a partir del mismo gen, se demostró que la lys-HSPA8 tiene un punto isoeléctrico muy ácido, que es muy diferente del punto isoeléctrico neutro de su contraparte citoplasmática¹⁷¹. La lys-HSPA8 se vuelve inestable con pequeños cambios en la acidificación lisosomal, que se utilizan fisiológicamente para modular el porcentaje de lisosomas competentes para la CMA en un momento dado¹⁷⁴. Como la lys-HSPA8 es necesaria para completar la translocación del sustrato, los lisosomas que carecen de esta no pueden realizar la CMA.

Se ha visto que el bloqueo de lys-HSPA8 se relaciona con la inhibición de la actividad de CMA¹⁷². Además, la dependencia de HSPA8 no es sólo con la CMA, ya que esta

chaperona participa en la degradación selectiva de agregados proteicos positivos para ubiquitina mediante un tipo de MA conocida como autofagia selectiva asistida por chaperona (*chaperone-assisted selective autophagy* o CASA) y, además, se une a las proteínas de carga en la eMI a través de un motivo tipo KFERQ¹⁸, entre otros más como la regulación de replicación de virus y el destapado de fosas recubiertas de clatrina¹³⁸. Por lo tanto, la chaperona HSPA8 al encontrarse presente entre los tres tipos diferentes de autofagia en mamíferos¹⁸, se vuelve una pieza fundamental para el desarrollo de tipos de autofagia.

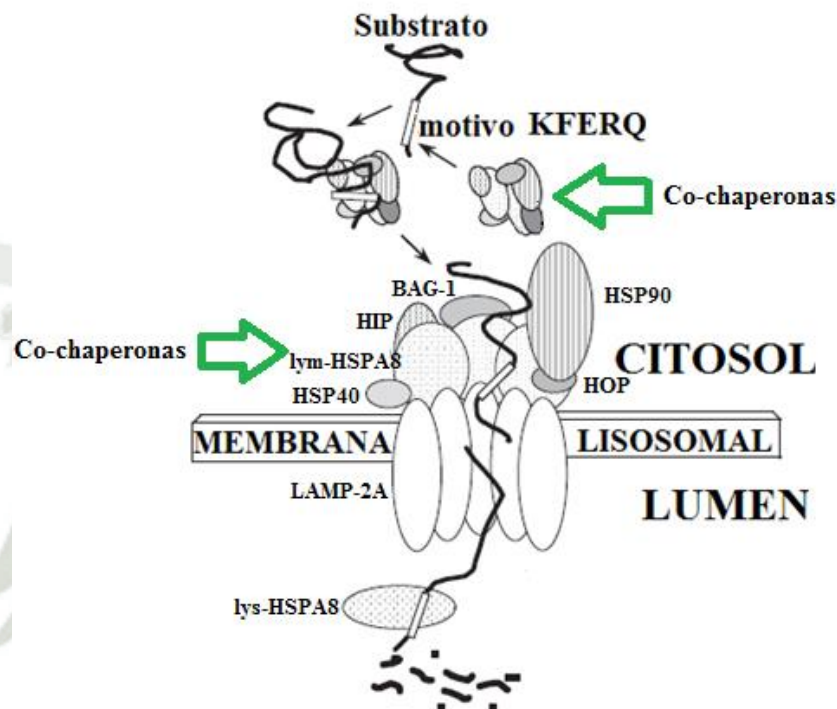


Figura N.º 10. Acoplamiento de las co-chaperonas a la proteína objetivo. En los pasos que conforman el desarrollo de la CMA, se ve que en la chaperona lisosomal (lym-HSPA8 o lym-Hsc70) y sus co-chaperonas HIP, HSP40, HSP90 y HOP se unen al motivo KFERQ de la proteína que lo posee, conformándose así el sistema de chaperona-lym-HSPA8 que se acoplará a la cola citosólica de LAMP-2A perteneciente al complejo de translocación por donde la proteína pasará hacia la luz o el lumen del lisosoma donde la recibirá la versión intralisosomal de HSPA8 (lys-HSPA8) y la proteína será degradada por hidrolasas y demás enzimas¹¹⁶. Adaptado de Agarraberes y Dice¹¹⁶.

LAMP-2A

La CMA fue el primer proceso analizado que indicó que la degradación de los componentes intracelulares por los lisosomas podía ser de manera selectiva¹⁸. Estos organelos pueden degradar el citosol celular inespecíficamente, pero también pueden seleccionar lo que irán a descomponer con la participación de una etiqueta o *tag* de degradación, una chaperona, co-chaperonas y un mecanismo para hacer que los blancos seleccionados crucen la membrana lisosomal exclusivamente¹⁸.

Al comienzo, la participación de una proteína receptora en el lisosoma se infirió porque la internalización del sustrato proteico en el organelo era saturable y la tripsinización de la superficie de los lisosomas para eliminar los componentes de la proteína anulaba la

unión e internalización de la proteína^{174,175}. Luego se pudo saber que era LAMP-2A, con una longitud de 410aa y una masa de 44.961 kDa¹⁷⁸; originándose a partir del empalme (*splicing*) alternativo del pre-ARNm del gen LAMP2, dando lugar a tres variantes: LAMP-2A, LAMP-2B y LAMP-2C¹⁷⁶; aunque todas estas comparten un dominio luminal, muestran diferentes regiones citosólicas y transmembrana¹⁷⁶ (Figura N°. 11).

También se ha observado que LAMP-2A se expresa en gran medida en la placenta, los pulmones y el hígado, mientras que LAMP-2B se expresa en gran medida en el músculo esquelético¹⁷⁹; mientras que LAMP-2C se ve que tiene participación en la ARNautofagia y ADNautofagia¹⁸⁰, también en la disminución de la presentación de antígenos endógenos por MHCII¹⁸¹.

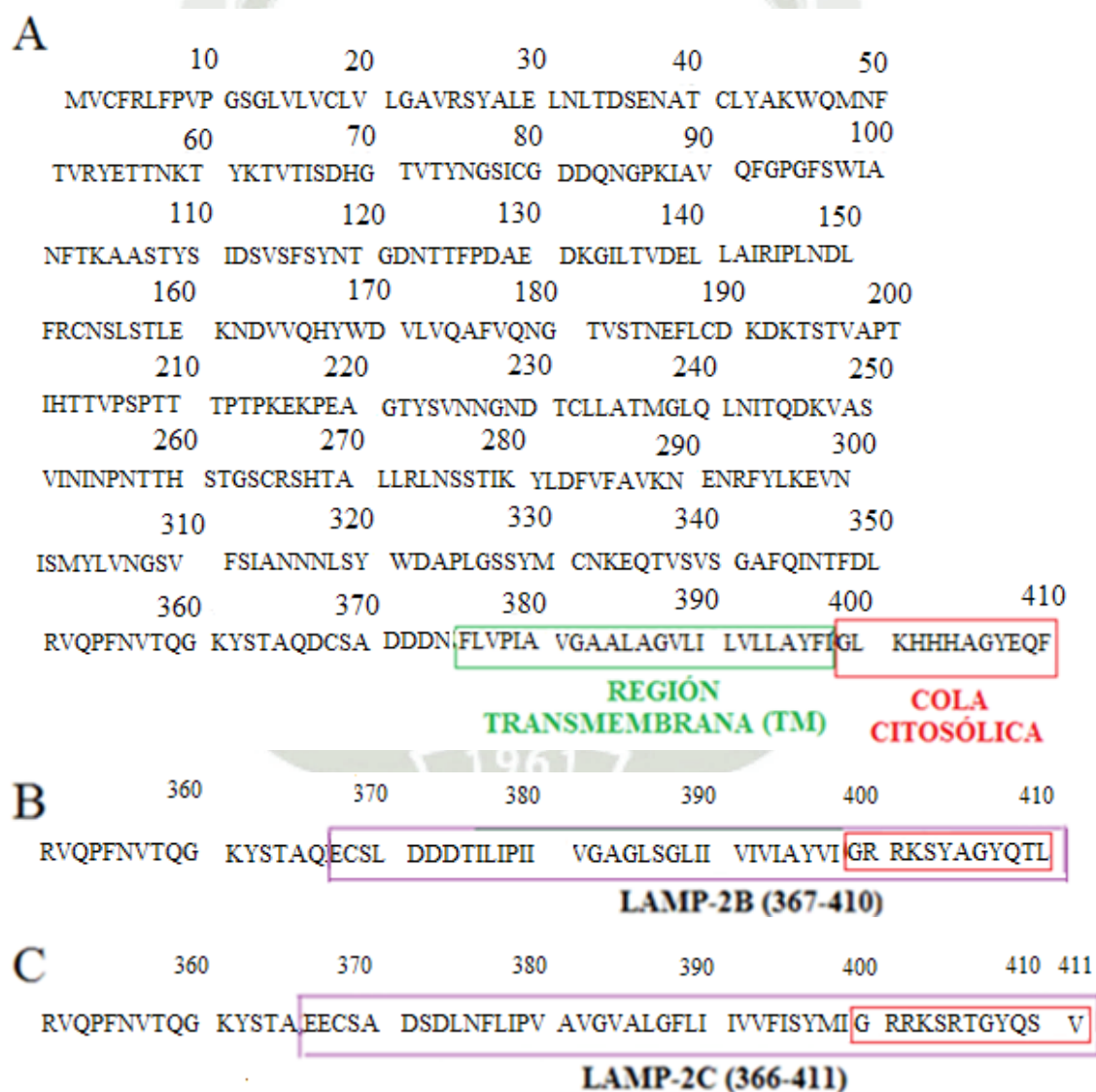


Figura N°. 11. Secuencia de aminoácidos de LAMP2 y sus isoformas. (A) Secuencia de aminoácidos de la región TM y citosólica de LAMP-2A WT humana¹⁷⁷. Se muestran las diferencias en la secuencia (recuadro morado) de (B) LAMP-2B y (C) LAMP-2C en las regiones citoplasmática (recuadro rojo) y TM. **TM**: transmembrana. **WT**: *wild-type* o cepa silvestre, salvaje o natural, tomándose como canónica a LAMP-2A. Adaptado de Kaushik 2006 *et al.*¹⁷⁷, UNIPROT¹⁷⁸, Fujiwara *et al.*¹⁸⁰ y Pérez *et al.*¹⁸¹

La actividad de CMA está estrechamente correlacionada con el nivel de LAMP-2A (y no con el de las otras dos variantes) en la membrana lisosomal¹⁷⁶ y la eficiencia del montaje/desmontaje de LAMP-2A del compartimento de translocación¹⁸². En comparación con las variantes B y C, LAMP-2A, en estado monomérico y en su cola citosólica tiene 12 aminoácidos (se comentó esto en el punto de HSPA8) y de estos, cuatro residuos cargados positivamente, en su dominio C-terminal que permiten específicamente su interacción con los substratos formado por chaperonas y las proteínas diana¹⁷⁶ (Figura N°. 12).

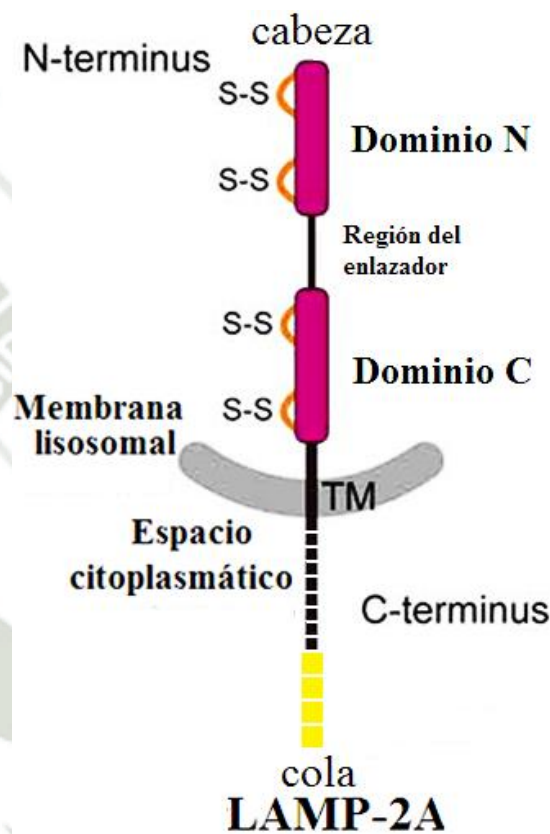


Figura N°. 12. Arquitectura de dominio de LAMP-2A. El dominio central del monómero de LAMP-2A tiene cuatro residuos de cisteína conservados que pueden formar dos enlaces puentes disulfuro (anaranjado)¹⁸⁶. TM: región transmembrana. Adaptado de Teresawa *et al.*¹⁸³. Donde el primer dominio luminal (región N) atañe a las posiciones 29^{na} a la 192^{da} de la secuencia de aminoácidos¹⁷⁸ (ver Figura N°. 10A); la del enlazador o *linker*, 193^{ra} a la 228^{va}¹⁷⁸ y la del segundo dominio luminal (dominio C), 229^{na} a la 375^{ta}¹⁷⁸; y la última región son los 12 residuos aminoacídicos que están divididos en un grupo de 8 (bloques negros) y de 4 (bloques amarillos), los últimos son importantes para la unión y posterior degradación lisosomal de proteínas diana, con las 401^{ra} a 404^{ta} posiciones¹⁷⁸.

Posiblemente, la transferencia del sustrato desplegado requiera interacción sólo con residuos cargados negativamente en la proteína diana cuando está formando el sustrato con la chaperona¹⁸. Asimismo, el desenrollamiento de la proteína diana no es necesario para la unión a la superficie lisosomal, pero sí es un requisito previo para la translocación para su translocación a través de la membrana lisosomal¹⁸⁴.

Se considera a LAMP-2A como el componente necesario y limitante para la actividad CMA¹⁷⁰, es por ello que es importante destacar que, en la CMA, la selectividad reside en el hecho de que todas las proteínas sustrato de CMA contienen, al menos, un motivo relacionado con el pentapéptido KFERQ^{7,20,185}, por lo que la dependencia de la CMA hacia la LAMP-2A es el mejor criterio para establecer si la degradación de las proteínas diana ocurre vía CMA¹⁷⁶; ya que LAMP-2A no es necesaria para la CASA⁷⁹ o la eMI¹⁸; asimismo, la sobreexpresión o disminución de LAMP-2A afecta la actividad de CMA¹¹⁴.

Luego de las primeras etapas^{185,186} viene aquella en la que LAMP-2A se oligomeriza (multimeriza), donde resultará en la formación de un complejo proteico multimérico de translocación con una masa de 700 kDa¹⁷⁰. Éste compartimiento es esencial para el traslado del sustrato de CMA al lumen lisosomal^{115,170,182,187}. LAMP-2A forma un homotrímero estable con dominios transmembrana helicoidales unidos por una conformación en espiral y las colas citosólicas que interactúan con el complejo proteico sustrato-HSPA8-co-chaperonas¹⁸⁷. Éste homotrímero aumenta la afinidad del sustrato proteico y previene su agregación a medida que éste se desenvuelve¹⁸⁷. Cabe resaltar que si bien los monómeros de LAMP2-A pueden interactuar con los complejos sustrato-chaperona, sólo los oligómeros del complejo de translocación pueden ubicar las proteínas en el lumen del organelo¹⁷⁰.

Por una parte, lym-HSPA8 se asocia con los monómeros y los homotrímeros de LAMP-2A, pero se libera antes de que se ensamble el complejo de translocación¹⁷⁰; también se cuenta con HSP90 lisosomal (lys-HSP90) que estabiliza al multímero de LAMP-2A durante la translocación¹⁷⁰. Además, esta co-chaperona cubre regiones de LAMP-2A sensibles a proteasas que están expuestas durante su disposición conformacional para el ensamblaje multimérico¹⁷⁰, asimismo, la abundante glicosilación de LAMP-2A (una capa de glicoproteínas con un espesor de entre 5 a 12 nm) y su conformación en la cara interna de la membrana lisosomal¹⁸⁸ resultan un medio de protección para esta proteína (Figura N°. 13).

Para el ensamblaje y desmontaje del complejo de translocación, se tiene la participación de varias proteínas como entes reguladores. Una de estas es la forma monomérica de la proteína de filamento intermedio proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein* o GFAP) y su factor de elongación de la pareja de unión a GTP 1- α (*elongation factor 1- α* o EF1 α) que modulan la estabilidad de LAMP-2A multimérica de una manera dependiente de GTP¹⁸². GFAP existe en la membrana lisosomal en dos formas: la primera es donde una parte de GFAP está fosforilada (p-GFAP) y unida a EF1 α y, la segunda, es la otra fracción que no está fosforilada ni unida al complejo multimérico de LAMP-2A, confiriendo estabilidad¹⁸² (Figura N°. 14).

En la presencia de GTP, EF1 α se disocia de p-GFAP, promoviendo así el subsecuente desmontaje de LAMP-2A¹⁸², ya que, al darse la liberación de p-GFAP, desde el complejo de translocación, se asociará con otras moléculas de GFAP¹⁸², porque la afinidad de GFAP para formar dímeros con pGFAP es mayor que su unión a LAMP-2A¹¹⁴; por lo tanto, se disocia del complejo de translocación y se une a pGFAP, lo que resulta en el desensamblaje del complejo de translocación¹¹⁴ (Figura N°. 14). Es por ello que la auto-interacción de GFAP tiene un impacto negativo en la estabilización del complejo de translocación. Por lo tanto, GTP actúa como inhibidor de la actividad de la CMA¹⁸².

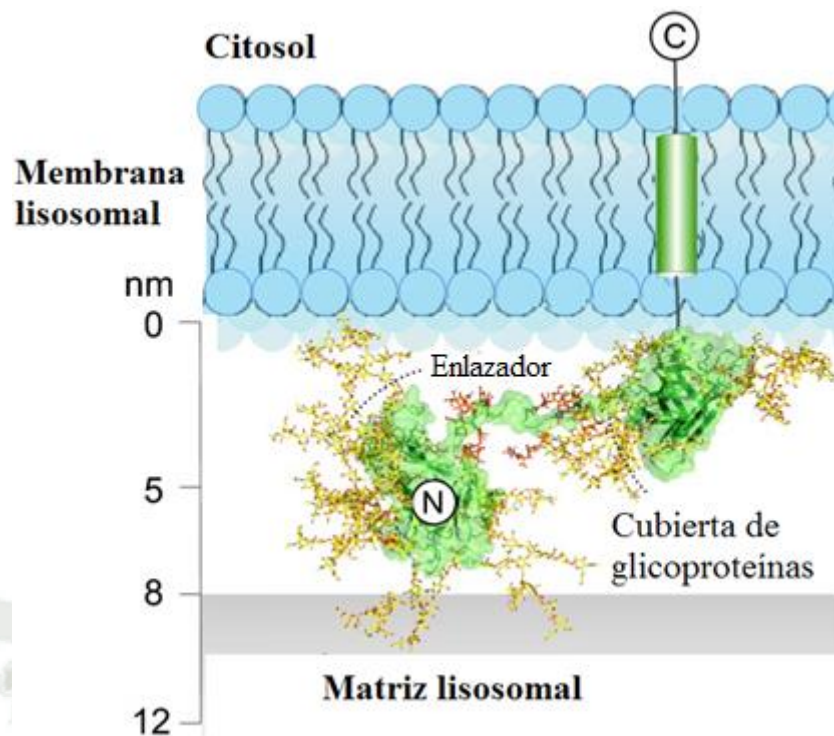


Figura N°. 13. LAMP-2A y capa de glicoproteínas. Una capa de glicoproteínas envuelve el dominio-N y el dominio-C de la fracción de LAMP-2A que se encuentra tras la membrana lisosomal. El espesor de esta capa varía de 5 a 12 ηm , con un promedio de 8 ηm . Los polipéptidos de LAMP-2A se representan en verde; los glicanos, amarillo¹⁸⁸. Adaptado de Wilke *et al.*¹⁸⁸.

Como se está viendo, las señales de fosforilación y desfosforilación también regulan la actividad de CMA al momento de edificar el complejo de translocación¹⁸⁹. Es así que se da otro mecanismo de control de la dinámica del ensamblaje de LAMP-2A en el complejo de traslocación que involucra a la diana de mamífero del complejo 2 de rapamicina (*mammalian target of rapamycin complex 2* o mTORC2), complejo proteico que está siempre presente en la membrana del lisosoma y que activa, a través de la fosforilación, a AKT (quinasa que también reside en la membrana lisosomal), volviéndola p-AKT, inhibiéndose la actividad de CMA¹⁸⁹, además de que la AKT fosforila a GFAP, formando a p-GFAP, desestabilizando así su unión al complejo de translocación hecho en base a LAMP-2A¹⁸⁹; es así que mTORC2 y AKT actúan como reguladores negativos de la actividad de la CMA²⁰.

Cuando se requiere una activación máxima de CMA, el efecto inhibitorio de mTORC2 y de AKT deben anularse y eso se logra mediante la proteína fosfatasa 1 rica en leucina que contiene repeticiones del dominio de la homología de Pleckstrin (*Pleckstrin homology* or *PH domain leucine-rich repeat-containing protein phosphatase 1* o PHLPPP1)¹⁸⁹ que se recluta en la membrana del lisosoma de una manera dependiente de RAC1²⁰. PHLPPP1 induce la activación de CMA al desfosforilar a p-AKT en los mismos residuos previamente fosforilados por mTORC2¹⁸⁹ (Figura N°. 14); y la inactivación de esta quinasa hace que GFAP desfosforilado esté disponible para acelerar las rondas de montaje y desmontaje de LAMP-2A y, en consecuencia, la tasa de absorción de substratos¹⁸⁹. Consecuentemente, PHLPPP1 es un regulador positivo de la actividad de CMA¹⁸⁹.

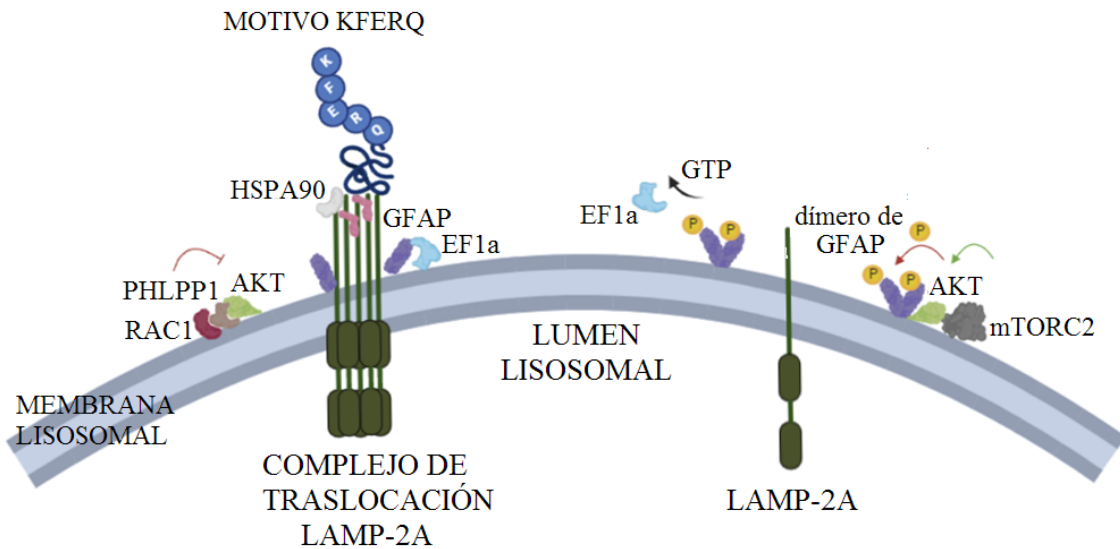


Figura N°. 14. Estabilización del complejo de traslocación. Las reacciones de fosforilación y desfosforilación, donde AKT, mTORC2, PHLPP1, RAC1 y GFAP regulan la estabilización del complejo LAMP-2A en las membranas lisosomales²⁰. El complejo RAC1/PHLPP1 inhibe a AKT, lo que permite la estabilización del complejo de traslocación mediada por GFAP. Por el contrario, éste complejo se desestabiliza por la liberación mediada por GTP de EF1 α de la membrana lisosomal y la fosforilación de mTORC2/AKT de GFAP, lo que promueve la auto-asociación de GFAP¹²⁰. Adaptado de Auzmendi Iriarte y Matheu¹²⁰.

Hablando de la disociación de LAMP-2A del complejo de traslocación; el desembalaje de esta maquinaria celular también requiere la movilización de los microdominios lipídicos de LAMP-2A^{177,190} donde sufre una doble escisión por la proteasa cathepsina A y una metaloproteínasa inidentificada que se libera en la luz lisosomal para una rápida degradación de LAMP-2A¹⁹⁰ (Figura N°. 15), acaeciendo esto durante las treinta y seis horas (h) de la vida media de LAMP-2A en el lisosoma¹⁹⁰, sin embargo, puede sobrepasar las 72 h en hepatocitos y fibroblastos en cultivo cuando hay una inanición prolongada¹⁹⁰; igualmente, cuando la inanición persiste más allá de 48 h, se observa la movilización de una fracción de LAMP-2A residente en la luz lisosomal (probablemente en micelas) hacia la membrana lisosomal y esto genera el aumento adicional en los niveles de LAMP-2A en la membrana¹⁹¹.

Hay que considerar que los cambios en la composición lipídica de la membrana lisosomal por la edad o ante variaciones dietéticas donde hay un aumento de la ingesta de lípidos, se altera la degradación de LAMP-2A, viéndose atrapada en los microdominios lipídicos expandidos por el cambio de dieta, lo cual hace que se aumente la velocidad de descomposición de LAMP-2A^{140,192}.

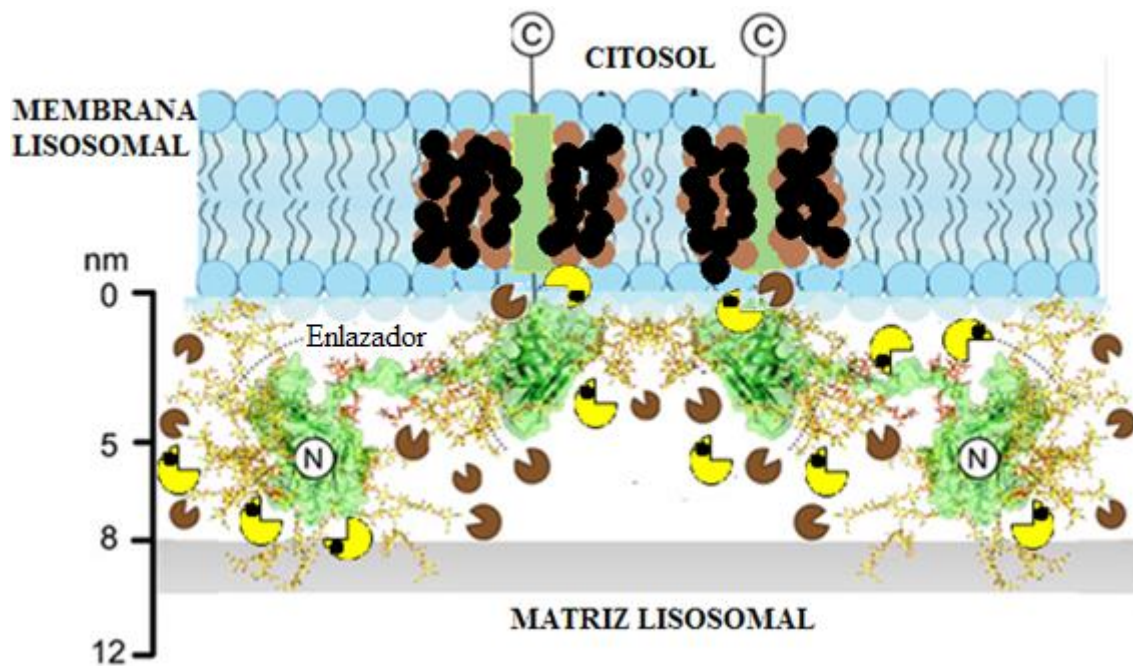


Figura N°. 15. Escisión de LAMP-2A por catepsina A y una metaloproteinasa. El recambio de LAMP-2A ocurre en los microdominios lipídicos de la membrana lisosomal (región de color negro y marrón) por la acción dual de la catepsina A y una metaloproteinasa (cuasi-cicunferencias de color marrón y amarillo, respectivamente). Adaptado de Wilke *et al.*¹⁸⁸ y de Auzmendi Iriarte y Matheu¹²⁰.

Entonces, resumiendo el mecanismo de la CMA quedaría comprendido en nueve eventos principales: (1) el reconocimiento del sustrato proteico con motivo KFERQ, (2) la formación del complejo sustrato proteína-chaperona, (3) la unión del complejo al monómero inactivo de LAMP-2A, (4) el despliegue del sustrato, (5) la multimerización de LAMP-2A, (6) la formación del complejo de translocación, (7) la translocación del sustrato proteico, (8) la degradación del sustrato por proteasas lisosomales y (9) la disociación de LAMP-2A del complejo de translocación^{18,20, 115,150} (Figura N° .16).

Es necesario comentar que varios de los reguladores del mecanismo molecular de la CMA, como los antes mencionados, contienen motivos KFERQ y experimentan una degradación lisosomal^{182,189}. Posiblemente, el motivo tipo KFERQ no sea sólo para la degradación, sino, para el direccionamiento de estos reguladores al interior de la membrana lisosomal para que efectúen su trabajo con el montaje y desmontaje del complejo proteico de traslocación; por lo que la degradación de los reguladores por la CMA puede ser una manera de finiquitar su acción estimulante o inhibitoria en la CMA¹⁸.

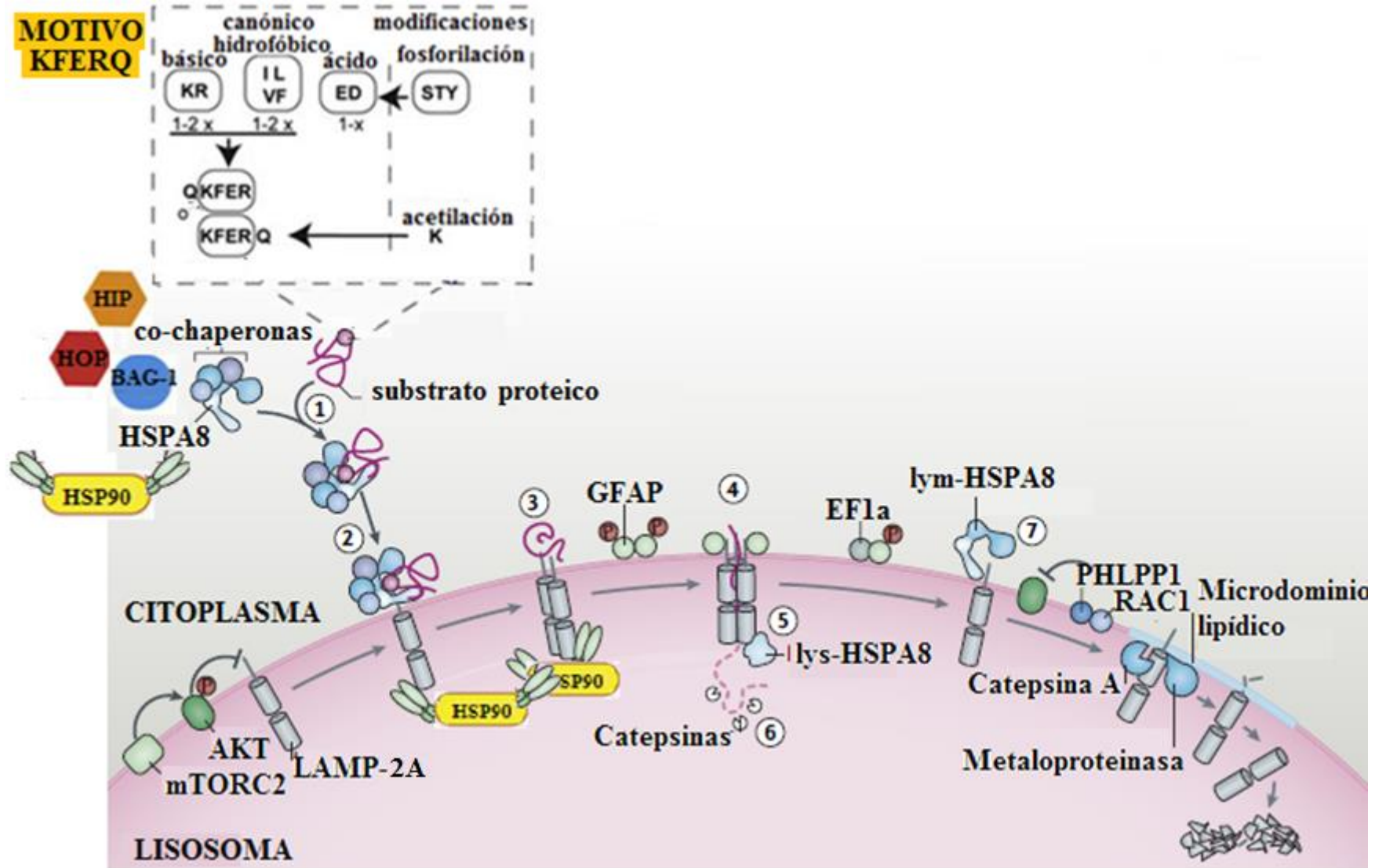


Figura N° 16. Los mecanismos moleculares de la autofagia mediada por chaperona (CMA). (1) Identificación del motivo KFERQ en el sustrato por la chaperona HSPA8; (2) unión del complejo sustrato-chaperona al monómero de LAMP-2A; (3) desdoblamiento del sustrato por el complejo; (4) formación del complejo de translocación CMA; (5) translocación del sustrato mediada por lys-HSPA8; (6) degradación del sustrato por proteasas lisosomales; y (7) disociación de LAMP-2A del complejo de translocación. Adaptado de Kaushik y Cuervo AM¹⁸, Albornoz *et al.*¹¹⁵ y Kirchner *et al.*¹⁵⁰.

CMA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

La participación de la CMA en estados patológicos se puede clasificar en tres categorías: (1) proteínas que son sustratos de la CMA y están relacionadas con enfermedades, (2) enfermedades relacionadas a la desregulación de la actividad de la CMA debido a cambios en componentes como LAMP-2A o HSPA8 y (3) una combinación de las dos primeras¹¹⁵. En este sentido, para cada patología que involucra CMA, es relevante identificar el mecanismo principal por el cual participa CMA¹¹⁵, ya que, al asociarse el papel de la CMA con el control de la degradación de las proteínas que participan en ese tipo de afecciones, las proteínas implicadas en la neurodegeneración pueden corresponder a las *wild-type*, aunque con mayor frecuencia suelen ser versiones agregadas, oligoméricas o mutantes¹¹⁵.

Por otra parte, cuando se forman agregados de proteínas, estos no pueden ingresar al lisosoma a través del complejo de translocación, por lo que la CMA no puede degradarlos^{8,170}. Los agregados proteicos se atorán en el complejo de traslocación^{193,194}; sin embargo, aún hay que determinar si la CMA puede desplegar e integrar formas simples de dímeros, trímeros u oligómeros de proteínas a través del complejo de translocación para facilitar la degradación de estos¹¹⁵. Además, el correcto funcionamiento de la CMA se ve afectado negativamente a medida que los seres vivos envejecen^{3,6}, esto hace que CMA sea relacionada con problemas neurodegenerativos propios de la adultos mayores y muy mayores⁴². Así que la desregulación en esta vía juega un papel crucial en la neurodegeneración y el envejecimiento¹⁸. (Figura N°. 17).

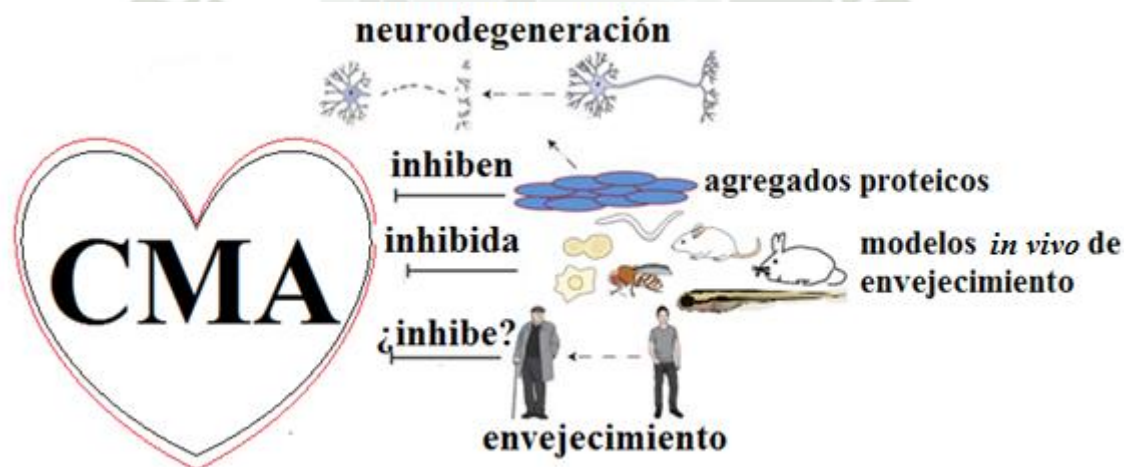


Figura N°. 17. CMA, la neurodegeneración y el envejecimiento. La CMA modula el destino de varias proteínas propensas a formar agregados que conllevarán a la génesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas¹¹⁵; los agregados pueden atascarse en los lisosomas positivos para CMA y bloquear su función¹¹⁵. Los modelos *in vivo* han establecido que la actividad de la CMA disminuye con la edad y se sugiere que la CMA podría estar desregulada en pacientes afectados por trastornos neurodegenerativos¹¹⁵. Adaptado de Albornoz *et al.*¹¹⁵.

La primera conexión entre el mal funcionamiento de CMA y una enfermedad humana fue con la EP¹⁹⁵, una enfermedad neurodegenerativa, con su principal proteína: la alfa-sinucleína (α -syn), un sustrato de la CMA¹⁹⁶. Desde entonces, la falla en la CMA se ha relacionado con la patogénesis de un número creciente de trastornos

neurodegenerativos¹⁸. Estudios muestran que, a través de la promoción de la CMA, se podría conseguir un efecto terapéutico al aminorar la acción de la α -syn en un contexto neurodegenerativo¹³⁰. Asimismo, se vio que al sobre-expresar LAMP-2A en células SH-SY5Y y en neuronas corticales primarias murinas, se aumentaba el recambio de α -syn asociado a una disminución de su toxicidad intrínseca.

También se tiene una relación entre la CMA y la proteína huntingtina (Htt). En una investigación se generó una Htt mutante en la línea celular HEK293 y se vio que la Htt mutada no alteró la expresión de HSPA8 ni de LAMP-2A¹²⁷, aunque se sabe que sucede una sobre-regulación de CMA en células con Htt mutante cuando se afecta la actividad macroautofágica¹²⁵. En otro trabajo relacionado al tema, se observaron Htt WT y una Htt mutante sobre-expresada, donde al privarse de nutrientes a células HeLa que sub o sobre-expresaran LAMP-2A o HSPA8, se afectaba la acumulación de Htt; la sobre-expresión de LAMP-2A disminuía la concentración de Htt WT y mutante, mientras que sub-expresión de HSPA8 incrementaba el nivel proteico de Htt¹²⁶.

Otro estudio que involucró a una enfermedad neurodegenerativa vio la relación de CMA asociada a AD¹²²; donde se trabajó con la proteína precursora de amiloide (amyloid precursor protein, APP) que se procesa para producir el péptido β -amiloide (A β) y que tiene un motivo KFERQ¹²². Aquí se vio que al eliminar el motivo KFERQ, aún se pudo observar la asociación entre APP y HSPA8. Por lo que, en éste caso, el motivo KFERQ en APP es fundamental para impedir la acumulación de APP, aunque sin involucrar necesariamente a CMA.

Por otra parte, en el 2020, Sirtori *et al.*, estudiaron a la chaperona HSPA8, donde se vio su relación con la acumulación proteica en la patogénesis de la neurodegeneración¹²¹; aquí se realizó un *knock-down* de HSPA8 o de HSPA1A en células SH-SY5H, observándose un efecto en el nivel proteico de tau (τ), de la superóxido dismutasa [Cu-Zn] (SOD1), y de la α -syn. Cuando se redujo la expresión de estas chaperonas, aumentó la expresión de las proteínas, particularmente, la sub-expresión de HSPA8 incrementó los oligómeros de α -syn, así como la expresión de su ARNm.

Los anteriores casos son descripciones de trabajos que involucran a la CMA y algunas enfermedades neurodegenerativas, tal como se determinó en las categorías de participación de la CMA¹¹⁵. Asimismo, se recalca que la característica común de estas proteínas relacionadas con la neurodegeneración es que la proteína silvestre es un sustrato de CMA, mientras que las variantes patogénicas proteicas se dirigen a los lisosomas, pero no se llegan a degradar y la CMA se ve inhibida¹⁸. Es posible que haya un mayor número de proteínas que están asociadas con la neurodegeneración sean sustratos de la CMA, ya que muchas otras proteínas en estas enfermedades contienen un motivo tipo KFERQ¹⁸.

ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA)

La ELA (del inglés *amyotrophic lateral sclerosis* o ALS) es una enfermedad neurodegenerativa fatal que causa la muerte de las neuronas del cerebro y de la médula espinal que controlan a los músculos voluntarios. Principalmente, se caracteriza por la degeneración progresiva de las motoneuronas corticoespinales, donde los axones descendentes en la médula espinal parecen cicatrizados (de ahí vienen los términos

“esclerosis lateral”) y por la desaparición de las motoneuronas espinales, con denervación secundaria y atrofia muscular (razón del término “amiotrofia”)¹⁹⁷ (Figura N°. 18).

La ELA se divide en familiar (fALS) y esporádica (sALS), siendo la segunda la más común (90%); teniéndose variaciones genéticas asociadas al desarrollo de esta patología, entre estas están las que se dan en las proteínas *SOD1*, *C9orf72*, *TARDBP* o TDP-43, *FUS*, *OPTN*, entre otras; por otra parte, alrededor del 50% de pacientes con ALS desarrollan una discapacidad cognitiva y conductual, además de que el 13% de pacientes con ALS tienen FTLN concomitante variante conductual o bvFTD¹⁹⁸, cuando ocurre esta asociación, se le agrupa dentro de FTLN-TDP¹⁹⁸. Una de las características relevantes de la ALS es la presencia de agregados de la proteína TDP-43 en las células afectadas¹⁹⁸ (ver TDP-43).

La manifestación de la ELA ocurre a mediados de la edad adulta (a una edad promedio de 55 años), pero su desarrollo podría comenzar en la primera o segunda década de vida¹⁹⁷; el deceso ocurre entre los 3 a 5 años después del diagnóstico, generalmente por insuficiencia respiratoria¹⁹⁸, empero, hay excepciones donde los casos arrojan una esperanza de vida prolongada¹⁹⁷. La ELA es una enfermedad huérfana cuya prevalencia oscila hasta en 5 personas por cada 100 000¹⁹⁸.

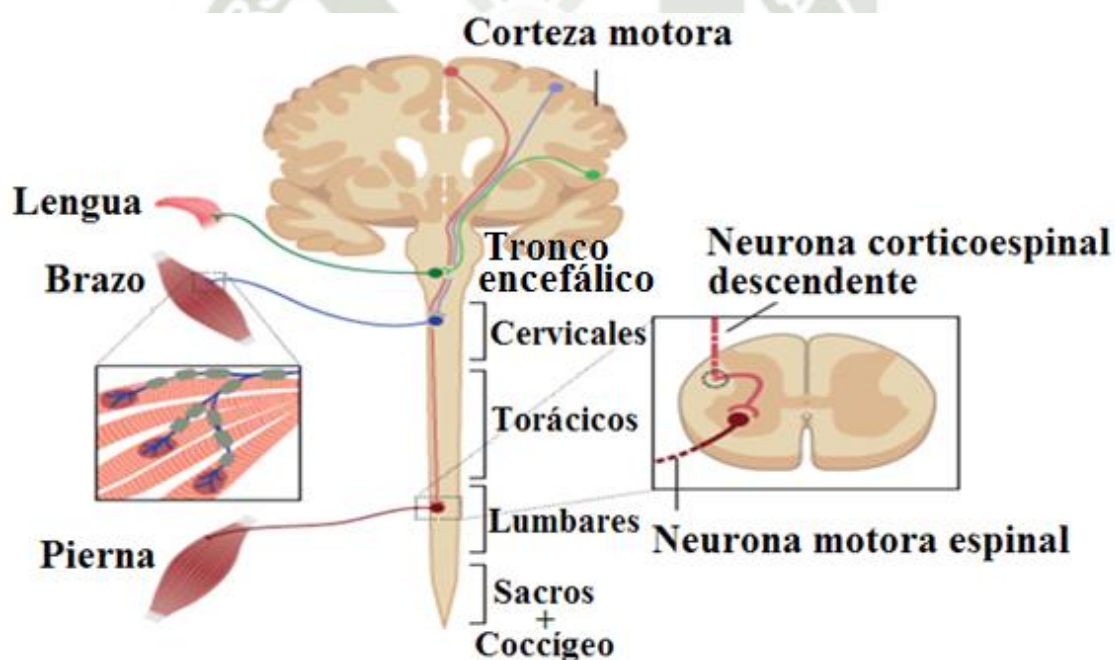


Figura N°. 18. Componentes del sistema nervioso afectados por ALS. La ALS afecta a las motoneuronas superiores que se proyectan desde la corteza motora hacia el tronco encefálico y la médula espinal, y las motoneuronas inferiores que se despliegan hasta los músculos esqueléticos¹⁹⁸.

DEGENERACIÓN LOBAR FRONTOTEMPORAL (DFT)

La demencia frontotemporal (del inglés *frontotemporal dementia* o FTD) son un grupo de disfunciones progresivas, conductuales y de lenguaje que comprenden variantes de demencia que involucran el lóbulo frontal y temporal del cerebro¹⁹⁹; todas las variantes clínicas de FTD tienen como substrato subyacente a la FTLN, que se caracteriza por varios grados de pérdida neuronal del lóbulo frontal y temporal, atrofia y gliosis; se

determinó que existen subtipos de FTLT, siendo uno de ellos el FTLT-TDP¹⁶ (Figura N°. 19), que es la FTLT asociada a la deposición anormal de la proteína TDP-43 (descrito más adelante), la cual representa alrededor del 50% de todos los pacientes con FTLT¹⁹⁹.

Además, se tienen cuatro subtipos de FTLT-TDP, siendo el más común el tipo B (35% de casos), asociado a mutaciones del gen C9orf72 que codifica el marco abierto de lectura 72 del cromosoma 9 y es asociado al desarrollo de FTD y/o ALS; hay casos en los que hay inclusiones negativas para TDP-43, pero positivas para ubiquitina (proteína casi ubicua en tejidos, dirige el reciclaje proteico vía proteasoma) y p62 (o Sequestosome-1, proteína de carga del autofagosoma que se dirige a otras proteínas que se unen a ella para la autofagia selectiva.); le sigue el tipo A (29%), asociado a mutaciones del gen GRN que codifica el factor antiinflamatorio y neurotrófico progranulina; después está el tercero más común que es el tipo C (17%) y, por último, está el tipo D que ocurre en mutaciones del gen VCP que codifica la proteína que contiene ATPasa valosina¹⁹⁷.

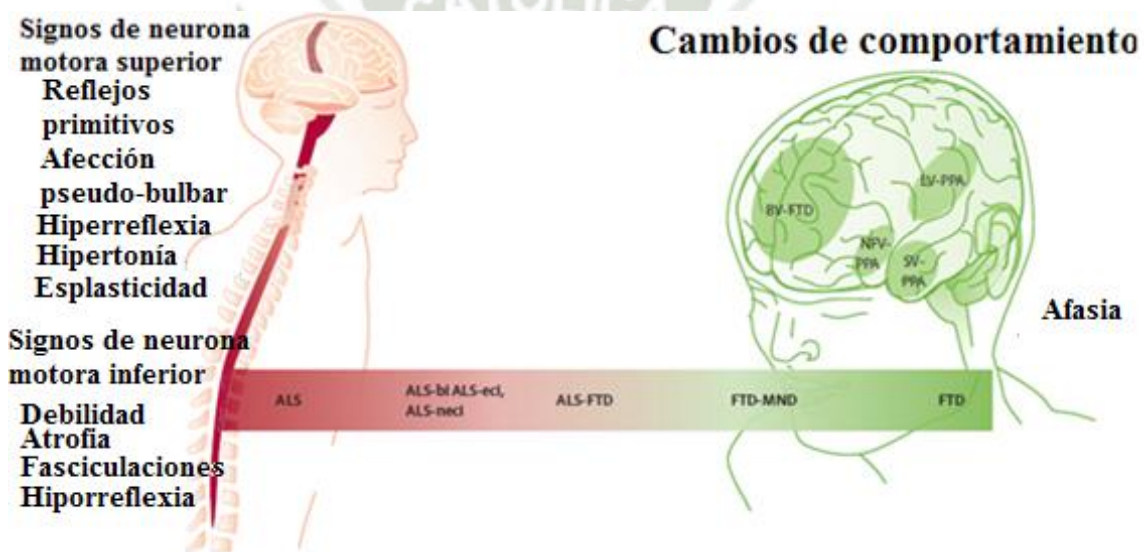


Figura N°. 19. Relación entre ALS y FTD. Dentro de los procesos neuropatológicos más comunes de FTD está la FTLT-TDP. Alrededor de la mitad de los pacientes con sólo ALS mantienen intactas sus capacidades cognitivas. Los que presentan alguna alteración cognitiva se clasifican en categorías: ALS-eci cuando hay alguna disfunción ejecutiva que acompaña a la ALS; ALS-neci, discapacidad en algún dominio cognitivo (como la memoria) y ALS-bi, cambios conductuales. Los pacientes con sólo FTD tienen alteraciones conductuales y de lenguaje, aunque las primeras están más asociadas a ALS¹⁹⁸. Adaptada de Van Es *et al.* ¹⁹⁸

TDP-43

Una proteína involucrada en la neurodegeneración y que se ha demostrado que es un sustrato de la CMA (Figura N° 20), así como de otras vías de control homeostáticas^{12,13,14}. En el ser humano, en el cromosoma 1, el gen *TARDBP* codifica la proteína de unión al ácido desoxirribonucleico (ADN) de respuesta trans-activa de 43 kilodaltons (*trans-active response DNA-binding protein 43 kDa*, TAR DNA-binding protein 43, TDP-43)^{23, 200}.

Esta proteína se ubica en el núcleo celular y su rol consiste en regulación del metabolismo del ácido ribonucleico (ARN), por medio de su transcripción, corte y empalme (*splicing*), maduración, estabilización, transporte, entre otros²⁰; empero suele perder la

conformación espacial que posee¹¹ y a aglutinarse en el citosol, gracias a su dominio rico en glutamina (Q) y asparagina (N)²⁰¹, lo que hace que tienda a auto-agregarse²⁰¹ y portarse como región tipo prion²⁰².

```

10      20      30      40      50
MSEYIRVTEDE ENDEPIEIPS EDDGTVLLST VTAQFPGACG LRYRNPVSGC
60      70      80      90      100
MRGVRLVEGI LHAPDAGWGN LVYVVNYPKD NKRKMDETDA SSAVKVKRAV
110     120     130     140     150
QKTSDLIVLG LPWKTEQDL KEYFSTFGEV LMVQVKKDLK TGHSKGFGFV
160     170     180     190     200
RFTEYETQVK VMSQRHMIDG RWCDCKLPNS KQSQDEPLRS RKVFVGRCTE
210     220     230     240     250
DMTEDELREF FSQYGDVMDV FIPKPFRAFA FVTFADDQIA QSLGEGDLII
260     270     280     290     300
KGISVHISNA EPKHNSNRQL ERSGRFGGNP GGFGNQGGFG NSRGGGAGLG
310     320     330     340     350
NNQGSNMGGG MNFGAFSINP AMMAAAQAL QSSWGMMEML ASQQNQSGPS
360     370     380     390     400
GNNQNGNMQ REPNQAFGSG NNSYSGSNSG AAI GWGSASN AGSGSGFNGG
410
FGSSMDSKSS GWGM
    
```

Figura N° 20. Secuencia canónica de TDP-43. Se destaca el motivo canónico CMA (QVKKD, sombreado en amarillo y verde, residuos 134-138) y los posibles residuos no canónicos del motivo dirigido a CMA (motivos LRYRN, sombreado en rojo, residuos 41-45; KKDLK, verde y turquesa, residuos 136-140; y LRSRK, turquesa, residuos 188-192). En gris está sombreado de color gris el motivo putativo nuevo QDLKE, residuos 118-122²⁰⁰.

La proteína de longitud completa es de un tamaño de 414 aminoácidos, con una vida media de 12 a 34 h, con un dominio N-terminal (NTD) con un plegamiento que forma dímeros u oligómeros por la interacción entre 2 NTD y que se puede propagar para formar oligómeros exponencialmente, dos motivos de reconocimiento de ARN que ayudan a TDP-43 a unirse a ARN y ADN dianas, un dominio C-terminal (CTD) involucrado en interacciones proteína-proteína y que alberga la mayoría de mutaciones (Figura N° 21) que están asociadas con fALS^{17,203}.

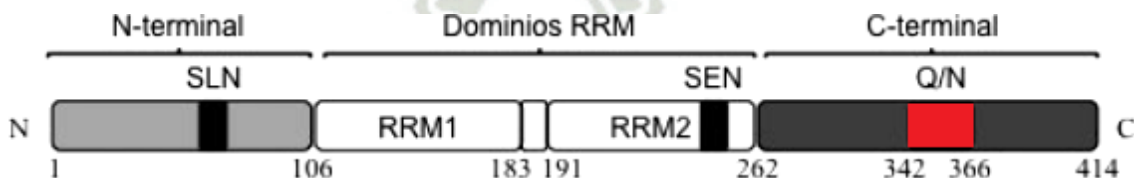


Figura N° 21. Principales componentes de la estructura de TDP-43. TDP-43 posee dos dominios que se divide en amino-terminal (N-) y carboxi-terminal (C-) y contiene dos dominios funcionales de unión a ARN (la sub-unidad grande de la ribonucleósido difosfato reductasa o RRM1 y la sub-unidad pequeña o M2, RRM2). Dentro del extremo N-terminal se ubica la secuencia de localización nuclear (SLN o NLS). Dentro del RRM2 se encuentra la secuencia de exportación nuclear (SEN o NES). Además, es importante señalar la región rica en glicina en el extremo C-terminal, donde se encuentra una región central rica en Q/N^{202,206}.

TDP-43 radica en el núcleo celular, aunque va y viene entre el núcleo y el citoplasma para llevar a cabo diversas funciones celulares^{10,204} (Figura N°. 22). El nivel y localización de TDP-43 es regulado por retroalimentación negativa^{205,204}, también debido a sus subunidades participa en la formación de gránulos y coordinar con sus substratos de unión para modular su propio *splicing* y auto-organización²⁰⁴. También se han identificado más de seis mil mRNAs que son blancos de TDP-43 (aproximadamente, el 30% del transcriptoma total); TDP-43 se une con una alta especificidad a los extremos 3' de las regiones no traducidas (UTR), pre-mRNAs y mRNAs¹⁰, quedando en evidencia la interacción de esta proteína con el RNA.

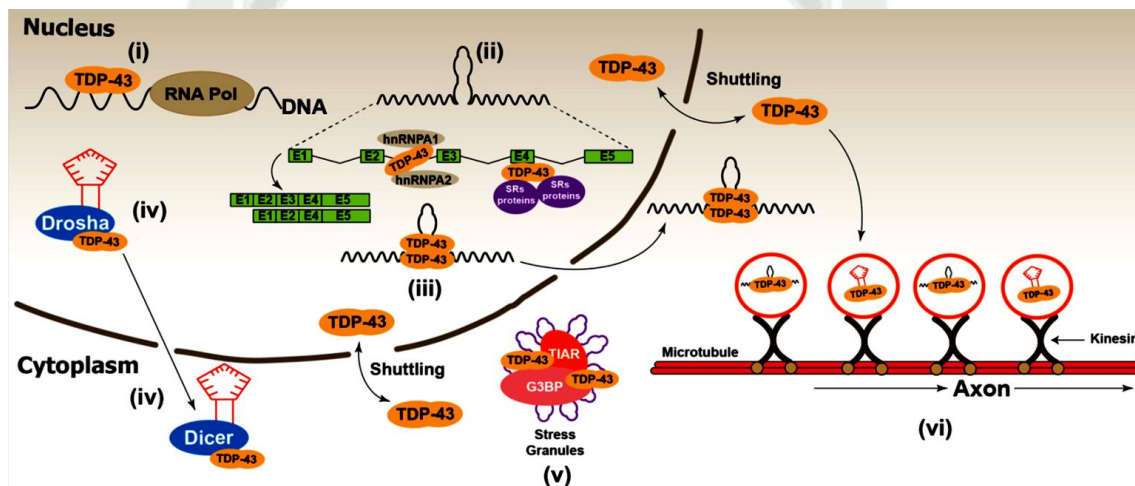


Figura N° 22. Fisiología neuronal de TDP-43. TDP-43 tiene un amplio rol en el mantenimiento de ARN: (i) transcripción, (ii) corte y empalme alternativo de mRNA, (iii) estabilización, (iv) síntesis y procesamiento, (v) localización/regulación de gránulos de tensión y (vi) transporte²¹. Tomado de Budini Buratti, Morselli, Criollo²¹.

Por otra parte, se conoce que TDP-43 está ausente en las áreas donde está vigente el silenciamiento de heterocromatina (por ejemplo: regiones sub-teloméricas), pero se ubica en los sitios de transcripción y *splicing*; donde por las cascadas de eventos celulares y de señalización, se acerca a los extremos 5' o 3' de los sitios de corte y empalme de intrones largos, UTRs o de varios exones, puede definir los patrones de *splicing* de importantes genes como CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), la misma TARDBP, FUS, SNCA (que codifica a α -syn), HTT, APP, etcétera¹⁰. TDP-43 dirige el ciclo de vida del mRNA porque tiene una alta afinidad por secuencias ricas en UG, lo que hace que gracias a sus dominios RRM pueda controlar la maduración de pre-mRNAs²⁰³.

Otras funciones de TDP-43 es el modular la formación de gránulos de ribonucleoproteínas (RNP) que transportan mRNA a distintas locaciones y la regulación de miRNAs al interactuar, por ejemplo, con los complejos Drosha y Dicer y lncRNAs donde los transcritos no codifican proteínas sino regulan la expresión genética; asimismo, TDP-43 ensambla y mantiene gránulos de tensión o estrés (*stress granules*, SG) y también

regula la expresión de proteínas nucleantes principales que sirven como mecanismo de defensa contra diversos insultos celulares^{10, 203}.

TDP-43 se une al ADN y tiene una participación en la vía de reparación de ruptura de doble hebra del ADN (DSB) mediada por unión de extremos no homólogos (NHEJ), donde TDP-43 interactúa con NHEJ y diversos factores de respuesta al daño de ADN para facilitar la restauración de los cromosomas que sufrieron rupturas²⁰³.

TDP-43 Y NEURODEGENERACIÓN

TDP-43 se asocia fuertemente con enfermedades neurodegenerativas como la ELA y la DFT^{15,16}, estando presentes en otras enfermedades con un aparente rol secundario¹⁷; y, aunque se han hecho avances entre la relación de CMA y TDP-43^{11,17,20-23}, aún quedan muchos puntos por esclarecer en cuanto a la interacción entre las condiciones fisiológicas y patológicas de TDP-43 y CMA. No ha esclarecido si la degradación de TDP-43, a través de la CMA, es indispensable para evitar la agregación de la misma, por lo que es importante determinar si un bloqueo de la degradación de TDP-43 — por CMA —, induciría la formación de agregados.

La presencia de TDP-43 en las enfermedades DFT y ELA se vio en los análisis *post-mortem* de pacientes, donde había presencia de inclusiones proteicas negativas para τ y α -syn, pero positivas para TDP-43 hiper-fosforilada, ubiquitinada y partida en fragmentos (25 kDa y 35 kDa)¹⁵. Las inclusiones se encontraban en neuronas de las regiones del sistema nervioso central, como la médula espinal, neocórtex o hipocampo. También se vio TDP-43 como un componente de las inclusiones negativas para tau y positivas para ubiquitina en pacientes diagnosticados con DFT y ELA¹⁶, donde se observó que TDP-43 se encontraba anormalmente fosforilada y en forma de inclusiones en células neuronales y gliales de cerebros de pacientes de DFT, ELA y EA¹⁶.

Entonces, TDP-43 es el principal marcador inmunohistoquímico de pacientes que padecen DFT y ELA^{17,20-23} y aunque se desconoce el rol de sus agregados, se sostienen dos hipótesis: la ganancia de función, donde los agregados citoplasmáticos o las mutaciones sin sentido de TDP-43 provocan apoptosis por citotoxicidad; y, la pérdida de función, donde los agregados actúan como sumidero que colecta TDP-43 funcional citoplasmática y nuclear, incluso podrían suceder ambos eventos en combinación^{17,20-23} (Figura N°. 23).

Las características patológicas de las proteinopatías de TDP-43 en las células neuronales incluyen tensión celular por oxidación, choque térmico la mala ubicación desde el núcleo hasta el citoplasma, la deposición de TDP-43 ubiquitinada e hiper-fosforilada en cuerpos de inclusión, el truncamiento proteico de TDP-43 que lleva a la formación de fragmentos de extremos C-terminal tóxicos y agregación proteica¹⁰, el incremento de la transferencia de TDP-43 del núcleo hacia el citoplasma resulta en una merma nuclear de TDP-43 resulta en anomalías extremas de *splicing* de mRNA¹⁰.

La sobre-abundancia de TDP-43 forma complejos disfuncionales por la falta de proteínas que se unan a TDP-43; el transporte de gránulos de RNP se ve perjudicado en células con TDP-43 mutante asociada a ALS¹⁰, asimismo se la asocia con la disfunción del complejo

de poros nucleares y la ruptura del transporte nucleocitoplasmático (nucleoporinas, factores de transporte) e incluso se ha visto aumentando el tiempo de vida media y su estabilidad respecto a TDP-43 WT, aunque la agregación de TDP-43 no requiere necesariamente mutaciones proteicas^{17,208}.

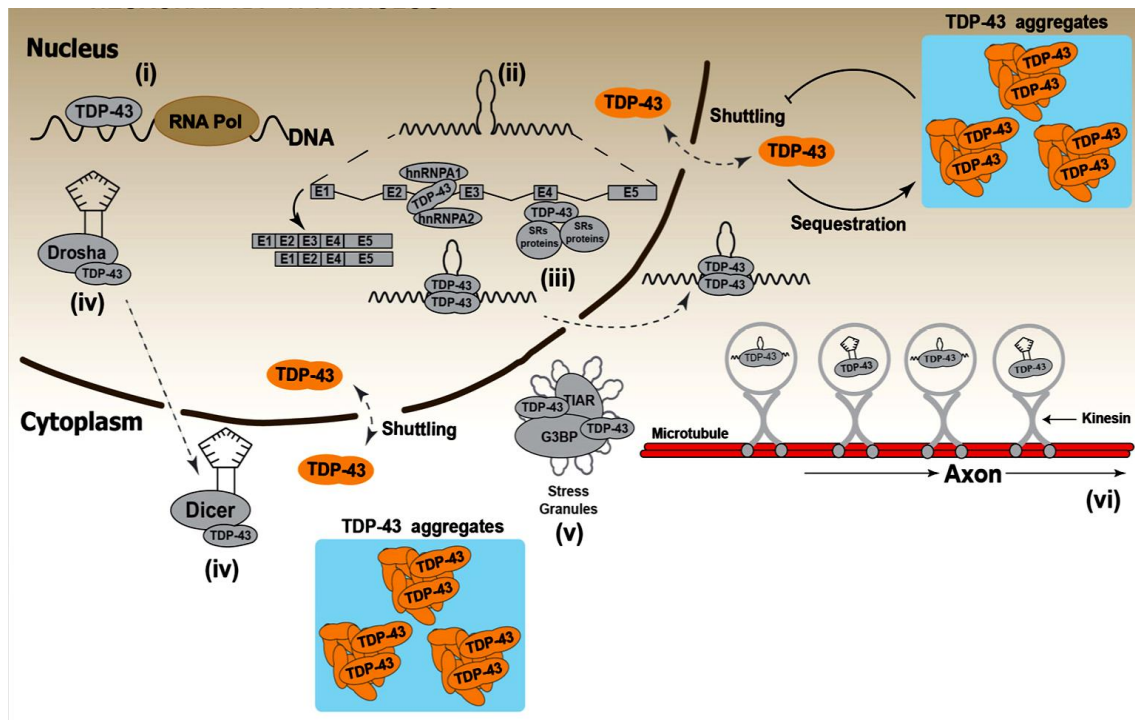


Figura N.º 23. Fisiopatología de TDP-43. En un contexto neuropatológico, la formación de agregados de TDP-43 en el citoplasma puede explicarse a dos tesis. Aquí se representa la segunda, la pérdida de función, donde los procesos de color gris muestran las funciones disminuidas por el comportamiento anómalo de TDP-43²¹. Adaptado de Budini Buratti, Morselli, Criollo²¹.

AGREGACIÓN DE TDP-43

TDP-43 posee un dominio rico en Q/N que serviría como núcleo para su agregación²⁰¹ y actuar como región tipo prion²⁰². Por otra parte, TDP-43 modifica su localización cuando está expuesta a un ambiente dañino, donde la proteína sale del núcleo y se vuelve insoluble por la presencia de agregados poliglutamínicos que se unen a la región rica en Q/N de TDP-43²⁰¹. El secuestro de TDP-43 por las proteínas con poliglutaminas conlleva a la alteración de la función nuclear de TDP-43 concerniente a *splicing*. Dicha alteración pudo ser contrarrestada aumentando los niveles de expresión de TDP-43²⁰¹.

También hay que mencionar las repeticiones de la región Q/N de TDP-43 (TDP-12xQ/N) para promover la formación de agregados en células neuronales y no neuronales²⁰². Las inclusiones proteicas secuestran a la TDP-43 endógena (ubicada en el núcleo celular), vaciando por el completo al organelo. Esta ausencia provoca una pérdida de función de TDP-43 que puede ser detectada por la desregulación del patrón de *splicing* alternativo del exón 3 de POLDIP3/SKAR, un gen cuyo *splicing* es regulado por TDP-43²⁰².

CÉLULAS HEK293

Para la presente tesis se empleó como organismo modelo de estudio a las líneas derivadas de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293, de *human embryonic kidney cells*), en su estado natural, estas células no están diferenciadas aún, es decir, no tienen una función específica en el cuerpo humano como lo hacen las células especializada^{213, 214}.

Se sabe que la génesis de estas células comenzó con la transformación y cultivo de células normales provenientes de un feto sano de sexo femenino abortado y de paternidad desconocida²¹³ con ADN de adenovirus 5 cortado²¹⁴.

La mencionada línea celular fue cultivada por el científico Alex Van der Eb a principios de la década de 1970 en su laboratorio en la Universidad de Leiden, Países Bajos²¹³; además, fue importante la participación de Frank Graham, post-doc del laboratorio de Van der Eb²¹³, pues, ejecutó la transformación de estas células, asimismo, inventó el método del fosfato de calcio para la transfección de células²¹⁴. Curiosamente, el nombre HEK293 viene del experimento número 293 de Graham²¹⁴.

Las HEK293 son las más usadas en los laboratorios en todo el orbe por detrás de las células HeLa²¹³, son populares por su facilidad de crecimiento y alta eficiencia de transfección, con lo que se producen variadas proteínas exógenas y virus para fines de investigación biotecnológica²¹³.

HEK293 TDP-43 WT

Para el desarrollo de la línea celular HEK293 TDP-43 WT se empleó la tecnología Flp-In™. Aquí, se usaron a los vectores pcDNA6/TR y pFRT/lacZeo que contiene un sitio FRT para la recombinación intermolecular homóloga de Flp recombinasa; además de expresar el represor de tetraciclina (TetO₂), que se integran independiente y aleatoriamente en el genoma de HEK293. Asimismo, se co-transfectaron los vectores pOG44 y pcDNA5/FRT/TO, siendo éste último el que contiene el gen de TDP-43 bajo el control de un promotor CMV/TetO₂ regulado por tetraciclina. El vector pOG44 también expresa la Flp recombinasa que cataliza la recombinación homóloga entre los sitios FRP del vector pcDNA5/FRT/TO y el cromosoma de HEK293 (ver Figura N°. 24). HEK293 TDP-43-WT sólo sobre-expresa la proteína TDP-43 endógena cuando se induce su producción con la adición de tetraciclina al medio de manutención.

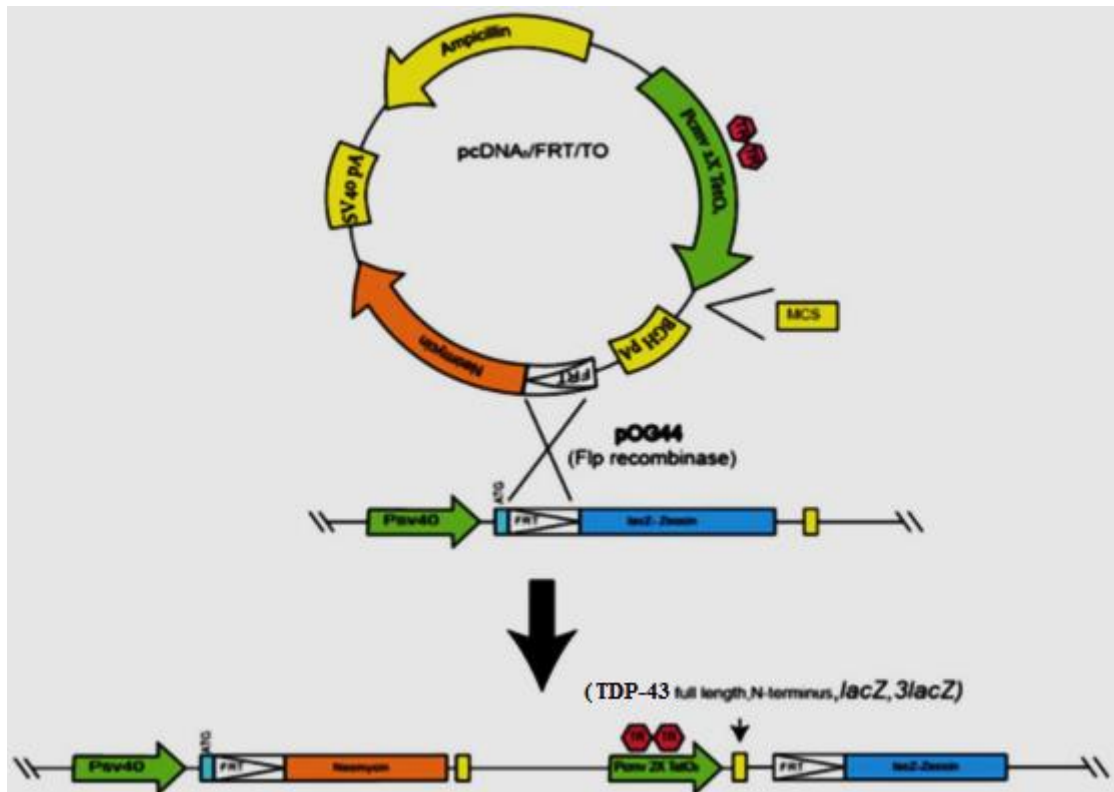


Figura N.º 24. Línea celular HEK293 Flp-In™ T-Rex™. El bosquejo muestra el mecanismo de integración de transgenes para generar las líneas celulares estables que sobre-expresan la proteína Flag-TDP-43 WT y Flag-TDP-12xQ/N. Adaptado de C-ordero²⁰⁹. Las líneas celulares derivadas de HEK293 contienen el sistema inducible Flp-In™ T-Rex™ que exhibe expresión inducible por tetraciclina de TDP-43 en una ubicación genómica específica.

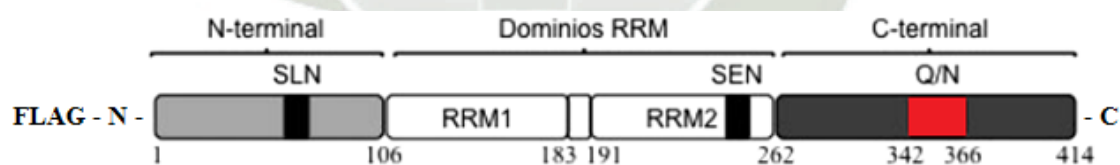


Figura N.º 25. Línea celular HEK293 TDP-43 WT. El esquema muestra el constructo Flag-TDP-43 y que fue empleado para la generación de la línea estable HEK293 TDP-43-WT que exprese la proteína TDP-43 endógena y esta esté regulada por un promotor inducible por TetO₂; éste posee una etiqueta proteica, Flag, en el extremo N-terminal y se utilizó como control de la sobre-expresión de la proteína TDP-43 (control positivo) y como control negativo (al no adicionarse tetraciclina). HEK293 TDP-43 WT sobre-expresa la proteína TDP-43 endógena (motivo canónico QVKKD, ver Figura N.º. 20). Adaptado de Cordero²⁰⁹, Budini²⁰² y Craganz²⁰⁶.

HEK293 TDP-43 QV/AA

Línea celular estable desarrollada con la tecnología Flp-In™, pero con una mutación puntual en su motivo canónico QVKKD, ver Figura N.º. 20. HEK293 TDP-43 QV/AA sobre-expresa la proteína TDP-43 mutante por medio de la inducción de TetO₂.

HEK293 TDP-43 QD/AA

Línea celular estable desarrollada con la tecnología Flp-In™, pero con una mutación específica en su motivo putativo (no descrito) QDLKE (ver Figura N°. 20). HEK293 TDP-43 QD/AA sobre-expresa la proteína TDP-43 mutante para ese motivo tipo KFERQ putativo por medio de la inducción de TetO₂.

HEK293 TDP-43 QD/AA + QV/AA

Línea celular estable desarrollada con la tecnología Flp-In™, pero contiene ambas mutaciones (descrito y putativo) en los dominios tipo KFERQ de las líneas previamente descritas. La línea celular HEK293 TDP-43 QV/AA + QD/AA sobre-expresa la proteína TDP-43 mutante para ambos motivos tipo KFERQ a través de la inducción de TetO₂.

HEK293 TDP-43 12xQ/N

El modelo celular de agregación de TDP-43: HEK 293 TDP-12xQ/N (Figura N°. 26 y Figura N°. 27), es el primer modelo capaz de demostrar que los agregados son responsables de reclutar la proteína TDP-43 normal y generar una condición de pérdida de función total; el modelo consta de la línea celular HEK293 transfectada de manera estable con una forma modificada de TDP-43, capaz de inducir la formación de agregados de TDP-43 después de la adición de tetraciclina al medio de cultivo. El fundamento radica en la propia TDP-43 seguida de doce repeticiones en tándem de un fragmento de 30 aminoácidos rico en Q/N en su extremo C-terminal.

Esta línea celular también estuvo basada en el vector pCDNA5 FRT/TO y el constructo de Flag-TDP-43-WT el cual se modificó para insertar un fragmento que tuviese las repeticiones 12xQ/N²⁰². Ver Figura N°. 24.

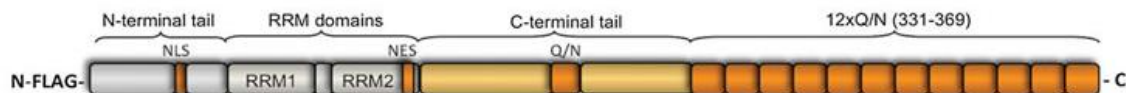


Figura N°. 26. Línea celular HEK293 TDP-43 TDP-12xQ/N. Esta representación del constructo describe todos sus diferentes determinantes estructurales (ver Figura N°. 21). La región 12xQ/N en el extremo C-terminal conteniendo las 12 repeticiones del dominio rico en Q/N. Los residuos 403-414 fueron eliminados por la estrategia de clonación empleada^{202,206,209}. La línea celular HEK293 TDP-12xQ/N expresa establemente esta variante de la proteína TDP-43 y esta es regulada por un promotor inducible por tetraciclina. Tomado de Budini²⁰².

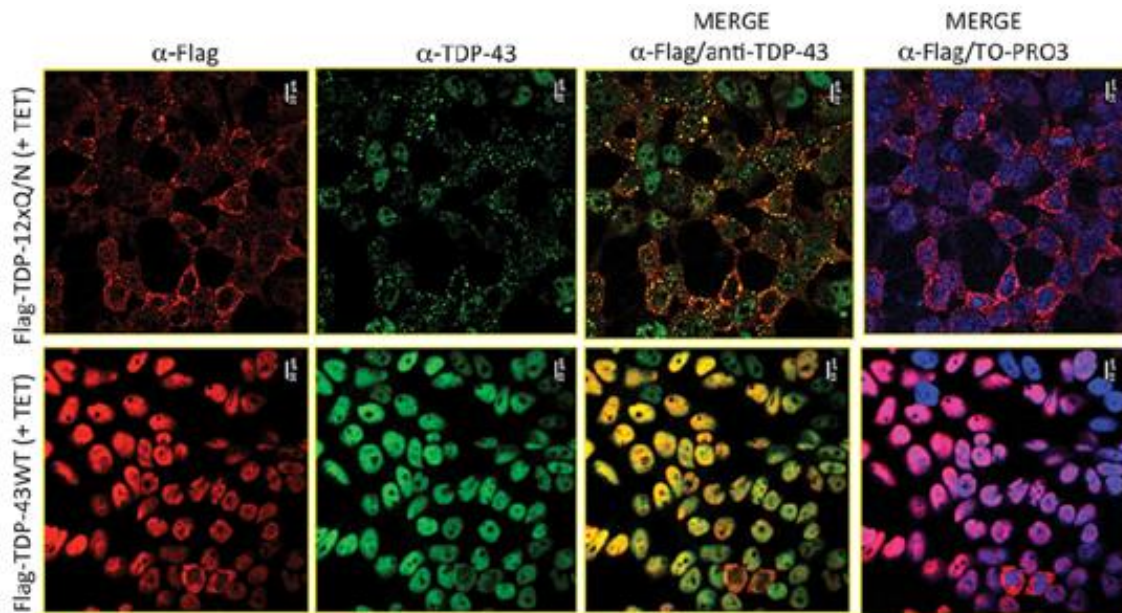


Figura N°. 27. Inmunofluorescencia de HEK 293 TDP-12xQ/N. Inmunofluorescencia de las proteínas de células HEK293 sobre-expresando las proteínas Flag-TDP-43 *wild-type* (WT) o Flag-TDP-12xQ/N después de la adición de tetraciclina (TET), utilizando anticuerpos anti-Flag (rojo) y anti-TDP-43 (verde). La proteína Flag-TDP-43 WT se presenta en forma difusa y localizada en el núcleo de la célula, empero, la proteína Flag-TDP-12xQ/N forma inclusiones localizadas mayoritariamente en el citoplasma celular; mientras que los núcleos celulares fueron teñidos con el reactivo TOPRO-3. También se muestra una fusión entre anticuerpos anti-Flag/anti-TDP-43 o anti-Flag/anti-TDP-43/TOPRO-3^{202,206,209}.

HEK293 TDP-43 12xQ/N L2A

Esta línea celular basada en HEK293 TDP-43 12xQ/N se le practicó un *knock-in* del gen humano LAMP-2A para que lo sobre-expresara constantemente.

HEK293 Flp-In L2A

Línea celular HEK 293 a la cual se le aplicó el sistema Flp-In™ para generar una línea celular estable; asimismo, se hizo una transfección transiente usando ADN plasmídico con del gen humano LAMP-2A empleando el reactivo Effectene®.

HEK293 TDP-43 WT L2A

Esta es una nueva línea celular basada en la línea HEK293 TDP-43 WT, a la cual se le insertó el gen LAMP-2A, empleando Effectene®, para que se exprese de manera constante.

TDP-43 y CMA

En el 2014, se realizó una investigación sobre TDP-43 para saber si era un probable sustrato de CMA¹¹. En este estudio, al comparar TDP-43 WT con una versión mutada en los residuos aminoacídicos del motivo KFERQ, TDP-43 no mostró ser capaz de asociarse a HSPA8, demostrando que TDP-43 tenía la capacidad de unirse a HSPA8 mediante la secuencia KFERQ silvestre. Luego, se generaron líneas *knock-down* para la proteína LAMP-2A¹¹, encontrándose mayores niveles de los fragmentos truncos TDP-25 y TDP-35 en estas células comparadas con WT. Sin embargo, en las líneas *knock-down* para LAMP-2A no se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de TDP-43 de longitud completa¹¹.

También se demostró que TDP-43 es un posible sustrato *in vivo* de esta vía catabólica; aquí se vio que la CMA regulaba los niveles de TDP-43 y que la agregación de esta podía afectar el desempeño de la CMA²³. Se observó que lisosomas cerebrales de rata con actividad CMA contenían TDP-43 endógena, sugiriendo que la misma es un sustrato de CMA *in vivo*. Asimismo, TDP-43 recombinante fue asimilada y degradada por lisosomas hepáticos de rata con actividad CMA. Mediante el uso de líneas celulares, se determinó que la sobre-expresión de agregados de TDP-43, pero no de la proteína TDP-43 WT, causaba cambios en los niveles de LAMP-2A y HSPA8, así como también en la actividad de CMA²³.

POLDIP3/SKAR

En una investigación del 2016, se estudió el efecto de un fármaco sobre los agregados de TDP-43²⁰⁶. Induciendo la sobre-expresión de TDP-43 en la línea HEK293 TDP-12xQ/N (Figura N°. 26), y empleando la droga TCAD102, se produjo la degradación de los agregados de TDP-43 y si se restableció la funcionalidad de TDP-43, viéndose esto por la inclusión del exón 3 de POLDIP3/SKAR²⁰⁶.

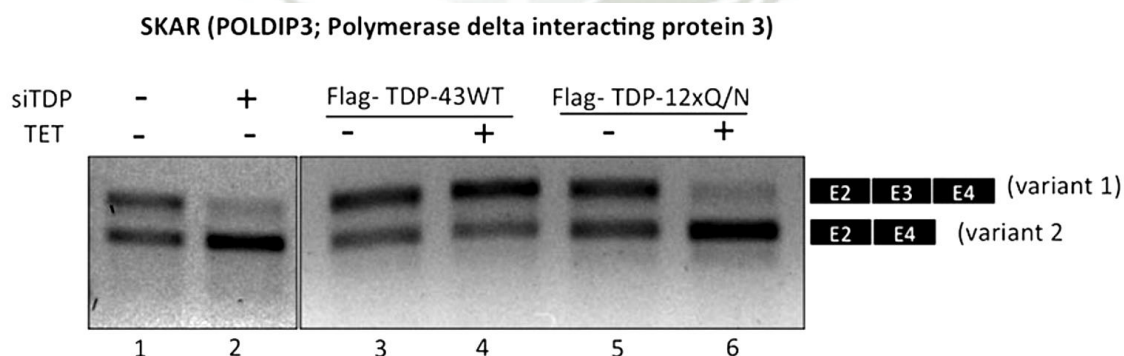


Figura N°. 28. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra el patrón de *splicing* alternativo de POLDIP3/SKAR. Cuando se expresa TDP-43 (carriles 2 y 6), se aprecia la variante 1 del patrón de *splicing* alternativo del gen endógeno POLDIP3/SKAR, que incluye al exón 3 después de la inducción de Flag-TDP-12xQ/N. En cambio, cuando TDP-43 es silenciada o no es funcional (carriles 1, 3 y 5), prevalece la variante 2, que no incluye al exón 3. La inclusión de exones se evaluó mediante RT-PCR. En ambos casos, el resultado de sub-expresar la TDP-43 endógena en Flag-TDP-43 WT (carril 4) se informa como un control positivo de pérdida de

función de TDP-43. siTDP-43: silenciamiento de la TDP-43 endógena, TET: tetraciclina, E: exón^{202,206,209}.

Cuando TDP-43 endógena se traslada anormalmente al citoplasma, se genera una pérdida de función que puede ser detectada por la desregulación del *splicing* alternativo del exón 3 del POLDIP3/SKAR. TDP-43 regula el *splicing* alternativo del ARNm del gen POLDIP3/SKAR. Hay dos isoformas a nivel de ARNm: una incluye el exón 3 o variante-1 y la otra no lo incluye y es la variante-2. Cuando TDP-43 está presente y es funcional, la variante-1 que incluye al exón 3 permanece, pero cuando TDP-43 es silenciada o no trabaja normalmente, la cantidad de variante-2 aumenta respecto a la variante-1 y no incluye al exón 3^{202,206,209}.

SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* o SDS-PAGE)²¹⁰ es una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes empleada para separar las proteínas en base a su tamaño²¹⁰. Para ello se emplea la urea que desnaturaliza o linealiza la molécula de interés, mas no modifica su carga, ya que la separación se hace por masa molecular (las mallas del gel fungen como tamiz molecular que ralentiza la migración de las proteínas de mayor tamaño) y carga²¹⁰.

También se emplea el dodecil sulfato de sodio que es un detergente aniónico que también desnaturaliza las proteínas y se adhiere a ellas para contrarrestar sus cargas intrínsecas y brindarles cargas negativas proporcionales a sus longitudes (todas las proteínas presentan la misma densidad de carga porque se ha anulado²¹⁰; asimismo, se requiere del β -mercaptoetanol que es un agente reductor que actúa sobre los puentes disulfuro y que puede ser sumado con el SDS o la urea (las distintas cadenas peptídicas que forman las proteínas migran de forma separada)²¹⁰.

WESTERN BLOT

Luego de haber realizado la detección proteica vía SDS-PAGE, se transfiere por electrotransferencia (aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel) inducir la migración del gel a la membrana de nitrocelulosa o de PVDF (polifluoruro de vinilideno)²¹⁰. A continuación, se saturan los sitios no específicos (con albúmina de suero bovino o caseína láctea). Esta parte es fundamental porque la membrana podría fijar los anticuerpos inespecíficamente²¹⁰.

La revelación de la membrana atañe el reconocimiento específico entre las proteínas separadas y los anticuerpos dirigidos a ellas (inmunodetección o *immunoblot*)²¹⁰. Los anticuerpos pueden ser marcados con un fluoróforo (en esta tesis). La detección se hace directa o indirectamente, empleando anticuerpos primarios no marcados y luego secundarios marcados y dirigidos contra los anticuerpos primarios²¹⁰, previamente débese hacer un *stripping* a la membrana para poder eliminar los anticuerpos primarios inespecíficos.

Posteriormente, las imágenes obtenidas son analizadas en un producto software que cuantifica las proteínas presentes en las bandas obtenidas (densitometría)²¹⁰, siempre y

cuando se haya depositado la misma cantidad de proteínas en todos los pocillos del gel, realizado un control en paralelo con actina o tubulina, con la misma concentración de las muestras²¹⁰. La concentración de la proteína diana se normaliza en función de la concentración del control²¹⁰.

INMUNOCITOQUÍMICA

También llamada inmunofluorescencia es un inmunomarcaje *in situ* que se realiza sobre una lámina portaobjetos con un frotis celular fijado y permeabilizado²¹⁰. El objetivo es ubicar las proteínas (en esta tesis considerados como antígenos) directamente sobre los organelos celulares²¹⁰ a través de los anticuerpos marcados contra estos antígenos.

Concretamente, un protocolo de inmunofluorescencia consiste en cultivar células hasta una confluencia entre 30 % a 50% a una lámina portaobjeto con Polilisina, luego fijarlas con 4% PFA (paraformaldehído) para conservar la arquitectura celular y los epítomos de interés, lavarlas con PBS-T 1x o Tritón-X para permeabilizarlas, añadirles solución de bloqueo, incubarlas con el anticuerpo conjugado primario, mantenerlas en un ambiente húmedo, incubarlas con el anticuerpo secundario, lavar con TBS o PBS-1x, incubar con DAPI, Hoescht u otro agente que permita teñir el núcleo, lavar, montar con una gota de medio de montaje para fluorescencia, dejar seca y luego ver al microscopio^{23,206}.

TRANSFERENCIA GÉNICA

Para la transferencia de una molécula de ADN al interior de una célula diana se “transforman” células²¹¹; concretamente, esta “transformación” comprende la “transfección”, que es una inserción de un plásmido procariótico contenedor de una secuencia de ADN desnudo; y la “transducción”, para referirse al uso de un virus con el mismo fin. Respecto a la “transfección”, en células eucariotas, se tienen dos clases: estables y transitorias²¹².

En la primera, la permanente o estable, la adhesión de las secuencias de ADN en el genoma celular es indeleble, mientras que, en la segunda, en transfecciones transitorias, la introducción del ADN es mediada por un plásmido que se alojará en el citosol y la secuencia se expresará a un nivel máximo en horas post-transfección, pero irá decayendo según vayan pasando las generaciones de la línea de células²¹².

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

MUESTRAS Y/O UNIDADES BIOLÓGICAS

- Líneas celulares, no diferenciadas, derivadas de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293)

MATERIAL DE LABORATORIO

- Vasos de precipitado de 50 ml y 250 ml. tipo Griffin, marcas Boeco® y Schott Duran®
- Probeta Boeco® y Schott Duran® de 100 ml. y de 1000 ml.
- Atomizadores de 500 ml.
- Tubos de centrífuga cónicos Eppendorf® de 15 ml.
- Pipetas serológicas HES de 5 ml., 10 ml. y 25ml.
- Soporte para tubos de centrífuga Corning® y Falcon® de 15 ml.
- Tubos criogénicos Eppendorf® de 1.5 ml.
- Mr. Frosty® y CoolCell® (contenedores para congelamiento de viales)
- Cajas de papel para almacenamiento de crioviales NUNC™
- Botellas de reactivos Schott Duran® de 500 ml. y 1000 ml.
- Tubos Corning® y Falcon® de 0.1 ml.
- Papel Parafilm M™
- Pipetas Pasteur plásticas HES de 1 ml y de 3 ml
- Hoja de bisturí n°. 4
- Puntas de micropipetas Sorenson™ y Eppendorf® P2, P10, P200 y P1000
- Soportes para puntas Eppendorf® P2, P10, P200 y P1000
- Tapas de soportes de puntas para micropipetas Eppendorf®
- Soporte estático para micropipetas Eppendorf®
- Soporte tipo carrusel para micropipetas Eppendorf®
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Eppendorf®
- Tubos de centrífuga de 1 ml. Eppendorf® y Falcon®
- Tubos de ultracentrífuga de 5 ml Corning®
- Placas de Petri NUNC™
- Placas de 6, 12 y 96 pozos Corning®
- Cámaras de Neubauer Hirschmann®
- Láminas cubre-objetos Petrix®
- Cajas de 6 compartimientos (*six-well cell culture plate*) para incubación de membranas para *Western Blotting* Corning®
- Bandeja para revelado de membranas

INSUMOS Y REACTIVOS QUÍMICOS

- Tripsina-EDTA 1X (0.25%) Gibco
- Etanol 70°

- Isopropanol
- Agua destilada
- Tampón fosfato salino sin calcio y magnesio (Phosphate Buffered Saline, PBS-1X)
- Solución salina tamponada con tris(hidroximetil)aminometano (Tris o THAM) y Polisorbato 20
- Tween 20, (TBS-T) Sigma-Aldrich
- Medio Eagle modificado de Dulbecco DMEM alto en glucosa (4.5 g/L, con L-glutamina y piruvato de sodio) Sigma-Aldrich, Hyclone, Gibco
- Combinación de inhibidor de proteasas y fosfatasas Pierce™ Thermo Scientific
- Ditioneitol (DTT) Thermo Scientific
- Fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF)
- Sarkosyl Sigma-Aldrich
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- Tris-EDTA
- Detergente TWEEN® 20 Sigma-Aldrich
- Reactivo de transfección Effectene®
- QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit
- Tampón de corrida de electroforesis BIO-RAD
- Tampón de transferencia Trans-Blot® Turbo™-1x
- Solución de bloqueo BIO-RAD
- Rojo de Ponceau
- Solución de retiro de anticuerpos (stripping) BIO-RAD
- Paraformaldehído (PFA 4%)
- Solución DAKO Agilent®
- Membranas de nitrocelulosa
- Marcadores de peso molecular
- Acrilamida/bisacrilamida
- Tris-HCl
- Persulfato de amonio (APS)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS)
- Tetrametiletilendiamina (TEMED)
- Reactivo de revelación de Western Blotting Amersham™ ECL™ Prime
- Substrato de quimioluminiscencia para Western Blotting Clarity™ Western ECL Substrate
- Geneticin™ G418 InvivoGen
- Tetracycline Invitrogen
- Hygromycin B Invitrogen
- Solución de antibiótico-antimicótico-1x Corning
- Equipo de ensayo de proteínas por BCA Pierce™
- Suero bovino fetal (fetal bovine serum, FBS) Sigma-Aldrich y Winkler
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- Poli-L-lisina, (4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Sigma-Aldrich
- Anticuerpo anti-TDP-43 Proteintech

- Anti-LAMP-2A Abcam
- Anti-FLAG Sigma-Aldrich
- IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante Sera Care
- Anti- β -actina policlonal de ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante Jackson ImmunoResearch Laboratories
- Anti-ratón-Alexa Fluor 594 Abcam
- Anti-conejo-Alexa Fluor 488 Abcam
- Hoechst 33342 ThermoFisher Scientific
- Agua libre de ADNAsas y ARNAsas
- Cebadores por Invitrogen e IDT
- Plásmidos
- Mezcla de dinucleósidos trifosfato (dNTP)
- TRIzol™ Ambion
- Hipoclorito de sodio 0.5%

EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

- Micropipetas P2, P10, P200 y P1000 ThermoFisher Scientific
- Pipeta multicanal P200 de 8 canales
- Pipeteador automático Pipet Filler S1 Thermo Scientific
- Mezclador vortex SCIOLOGEX MX-S
- Incubadora agitadora orbital MRC
- Mezclador ROCKit™ Indulab
- Contador celular mecánico
- Contador celular automático TC-20™ BIO-RAD
- Máquina productora de hielo
- Microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-e
- Microscopio óptico
- Termociclador T100™ BIO-RAD
- Incubadora Nuair
- Centrífuga HERMLE Z16 M
- Microcentrífuga DLAB
- Balanza ONHAUS SCOUT
- Thermo-Shaker BIOBASE
- Cámara de flujo laminar Nuair
- Refrigeradores Daewoo RF-400S, Daewoo RFD-350S y Electrolux EFUP195S
- Cámara de electroforesis MiniPROTEAN™ Tetra System BIO-RAD
- Fuente de poder Select BioProducts
- Emisor de campo eléctrico Trans-Blot® Turbo™ Transfer System BIO-RAD
- Sistema de imágenes Oddisey® Fc
- Lector de microplacas iMark™
- Ordenador all-in-one Lenovo IDEACENTRE AIO 700
- Ultracongeladora Nuair

Lector de imágenes Oddisey® Fc LI-COROTROS

- Software de adquisición para imágenes Image Studio™
- Programa para el procesamiento de imágenes digitales Fiji Is Just ImageJ (Fiji)
- Programa estadístico GraphPad® Prism 9
- Ordenador portátil Samsung
- Conexión a Internet
- Guantes de nitrilo Edlab
- Barbijo
- Cofia
- Batas desechables
- Galoneras
- Papel toalla
- Cajas de poliestireno expandido (EPS)
- Bolsas de polipropileno
- Películas de polivinilideno (PVDC)
- Papel aluminio
- Cuadernos
- Lapiceros
- Reglas
- Etiquetas
- Marcadores permanentes
- Plumones
- Mota
- Pizarra acrílica
- Cinta autoadhesiva
- Chinchas
- Papel bond A4
- Cartuchos de tinta para impresora
- Impresora HP Officejet Pro 6830

MÉTODOS

CULTIVO DE CÉLULAS

DESCONGELAMIENTO

Todas las líneas celulares desarrolladas con la tecnología Flp-In™ se conservaron en la ultracongeladora (en viales criogénicos, Cryovial®) de 5 ml, por lo que se tuvo que descongelar en baño termostático a 37 °C, luego, se agregó 1 ml de células descongeladas a un tubo de 15 ml con 9 ml de tampón fosfato salino sin calcio y magnesio (Phosphate Buffered Saline, PBS-1X) y se las mezcló, inmediatamente, se centrifugaron los tubos a 200 g y a 23 °C durante 5 min (minutos). Después, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 8 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (4.5 g/L, con L-glutamina y piruvato de sodio) o DMEM completo. Finalmente, se tomaron esos 8 ml y los distribuyeron en una placa estéril de cultivo celular de 100 mm de diámetro para, acto seguido, dejar en la incubadora, con ambiente húmedo, a 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO₂.

MANTENIMIENTO Y CONTEO CELULAR

Para realizar el pasaje de las células HEK293 se extrajo el medio de cultivo DMEM completo (DMEM completo y con FBS 10%), más una solución antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomina), luego, se lavaron suavemente células con 5 ml de PBS, después se retiraba el PBS empleando una bomba. Posteriormente, se añadió 1 ml de tripsina y se dejó actuar durante 2 min en la incubadora, a continuación, se retiró la placa y se inactivó a la tripsina añadiendo 1 ml de DMEM completo; inmediatamente, se agregó 3 ml de PBS en un tubo de 15 ml y se procedió a añadir los 2 ml de la suspensión celular (1 ml de tripsina con células + 1 ml de DMEM completo); seguidamente, se centrifugó a 200 g y 23 °C por 5 min.

Además, se retiró el sobrenadante, luego se resuspendió el *pellet* en 5 ml de PBS, después se tomaron 50 µl de las células resuspendidas y se las adicionaron a 150 µl de PBS en un tubo de microcentrífuga de 5 ml donde fueron mezclados de manera delicada. Entonces, se tomaron 10 µl y se los depositaron en la Cámara de Neubauer y se las contó en el microscopio donde se calculó el volumen de células a emplear para realizar el nuevo pasaje de la siguiente manera:

$$N^{\circ} \text{ células totales (muestra inicial)} \times 10^4 \rightarrow 1000 \mu\text{l}$$

$$N^{\circ} \text{ células finales/pocillo} \rightarrow x \mu\text{l}$$

Finalmente, el volumen deseado de suspensión celular se diluyó en DMEM completo y se cultivó, con concentraciones iniciales de 3×10^5 cel./ml. a 37 °C, en un ambiente humidificado, con 5 % de CO₂; el medio de cultivo DMEM completo fue alto en glucosa, con FBS (10%), más una solución antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomina o pen/strep) y las células se mantuvieron con Hygromycin B ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) para inducir la expresión de la TDP-43 transgénica o de LAMP-2A hasta empezar los experimentos.

CONGELAMIENTO

Para conservar las líneas celulares desarrolladas, estas estuvieron entre un 70% a 80% de confluencia. Las células fueron preservadas en la ultracongeladora acorde al siguiente procedimiento: se preparó suero bovino fetal (FBS) con el criopreservante DMSO (dimetil sulfóxido) al 10% (9 ml FBS + 1 ml DMSO). Luego, se extrajo el medio de

cultivo a las células y se las lavó con 5 ml de PBS. Después, se adicionó 1 ml de tripsina y se dejó actuar por 2 min máximo. Consecutivamente, se adicionó 1 ml de DMEM completo. Con los 2 ml de la suspensión celular, se realizó una mezcla con 3 ml de PBS en un tubo cónico de 15 ml, entonces, se centrifugó a 200 g y 23°C por 5 min. Finalizado esto, se resuspendió el *pellet* en 5 ml de SFB + DMSO 10%. Finalmente, se distribuyó 1 ml a cada tubo criogénico y se llevó a congelar en la ultracongeladora a -80 °C.

LAMP-2A KNOCK-IN

En líneas celulares HEK293 Flp-In, HEK293 TDP-WT y HEK293 TDP-43 12xQ/N, líneas previamente descritas²⁰², con concentraciones iniciales de 5×10^5 cel./ml., se ejecutaron transfecciones transientes (transitorias) empleando ADN plasmídico contenedor del gen humano LAMP-2A (0.5 µg/µl) y el vector de expresión pCMV6-Entry, a través del reactivo de transfección Effectene®, en el siguiente orden: en *6-well plates* se cultivaron las células HEK293 entre 24 h a 48 h antes del experimento, pasadas esas horas se cambió el medio celular por uno fresco, se calentó el *buffer* de condensación de ADN, *buffer* EC, a 37 °C, se mezclaron 0.5 µg/µl de DNA con 75 µl del *buffer* EC. Se resuspendió suavemente, se agregaron 2.5 µl del *enhancer* y se agitó a mano por 15 segundos y se dejó reposar 5 min a RT (*room temperature* o temperatura ambiente). Luego, se añadieron 4 µl de Effectene® (Qiagen) y se agitó a mano por 30 segundos y se dejó reposar entre 10 a 20 min RT; después de ello, se agregaron 400 µl de medio DMEM. Se incubó O/N (*overnight*).

Las células transfectadas fueron seleccionadas con G418 ($600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $1.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) y luego mantenidas aún con G418 y también con Hygromycin B hasta antes de proceder con los experimentos.

MUTACIÓN DE MOTIVOS KFERQ

Empleando la línea HEK-293-TDP-WT se realizaron mutaciones de sitio dirigido por PCR para el motivo KFERQ canónico de TDP-43: QVKKD, y el motivo putativo: QDLKE. Luego, se realizaron transfecciones de estas mutaciones puntuales usando 1 ng del vector de expresión de recombinasa Flp pOG44 más 500 ng DNA a través del protocolo de transfección del reactivo de transfección Effectene® según las instrucciones del fabricante que se describieron previamente.

INDUCCIÓN DE AGREGACIÓN PROTEICA

Las células cultivadas se mantuvieron con las mismas condiciones generales de manutención, pero al medio se le agregó tetraciclina ($1 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) para provocar la síntesis de inclusiones proteicas de TDP-43.

DETERMINACIÓN PROTEICA

FRACCIONAMIENTO CELULAR

Las líneas celulares confluyentes en *6-well plates*, entre el 80% a 90%, se las dejó sin medio nutritivo, luego se las lavó con 3 ml de PBS a 37 °C, después se las incubó con 1 ml de PBS durante 5 min RT, luego se retiró la película celular adherida a la base de cada placa de cultivo y estas muestras se recolectaron en tubos de microcentrifuga de 5 ml, a continuación se centrifugaron a 500 g por 5 min RT, inmediatamente se eliminó el sobrenadante y se colocaron los precipitados en hielo, mientras tanto, se preparó un *mix* con 150 µl de buffer RIPA con 6 µl de inhibidores de proteasas al 50X. Además, se

agregaron 150 μl al tubo con el *pellet* de células y se resuspendió. Se dejó en hielo por 30 min, entonces, se centrifugó a 500 g por 10 min a 4°C. Finalmente, se tomó el sobrenadante y se llevó a un tubo de microcentrífuga nuevo para ser cuantificado en el acto o almacenado a 4°C O/N para cuantificar al día siguiente.

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN PROTEICA TOTAL

Las fracciones celulares obtenidas previamente se sometieron al ensayo del ácido bincinonínico (*bicinchoninic acid assay*, BCA) en base a las indicaciones del equipo de ensayo de proteína por BCA Pierce™ para determinar su concentración de la siguiente manera: se prepararon los 9 estándares para hacer la curva de calibración del kit. Luego, se cargaron 25 μl de cada estándar en un pozo de una placa de 96 pocillos, a continuación, se prepararon 2 μl de cada muestra con 23 μl de agua destilada en cada pocillo; después, se alistaron las dos soluciones de trabajo, A y B, se mezclaron en proporción 50 a 1, además de que se calculó el volumen a emplear en base a la siguiente fórmula:

Working Reagent o WR = (# estándares + muestras + error) (# réplicas x volumen WR por muestra).

Luego de ello, se adicionaron 200 μl de la WR en cada pocillo, se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó en reposo incubando a 37 °C durante 30 min, después, se leyó en el espectrofotómetro a 562 nm. Se imprimieron las absorbancias y esos valores se redactaron en una hoja de cálculo donde se realizaron las curvas de calibración de los estándares y se hicieron los análisis de las muestras.

SDS-PAGE

Una vez determinada la concentración proteica de cada muestra, se procedió a analizar las muestras en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para la discriminación de las proteínas en base a su tamaño molecular por medio de una electroforesis. Para ello, se emplearon geles de poliacrilamida al 10% que se confeccionaron previamente al preparar el gel de separación o apilamiento, *stacking gel*, y el de corrida o separación, *running gel*; tal como se detalla, para el *running gel* se necesitaron: 5 ml de *acrylamide*/bis 30% (29:1) + 3.75 ml Tris HCl 1.5 M pH 8.8 + 6 ml de agua destilada + 150 μl APS 10% + 150 μl SDS 10% y 15 μl de Tetrametiletilendiamina o TEMED. Mientras que, para el *stacking gel*: 0.5 ml *acrylamide*/bis 30% (29:1) + 2.5 ml Tris HCl 0.5 M pH 6.8 + 2 ml de agua destilada + 50 μl APS 10% + 50 μl SDS 10% y 5 μl de TEMED. Los geles fueron de 1.5 mm de grosor.

Luego de lo anterior, se preparó la solución de trabajo (WR) que consistió en 20 μl de muestra + 5 μl de *loading buffer* 2X. Se calentó a 95 °C durante 5 min, se cargó cada WR en el carril correspondiente en el *stacking gel*. Además, se emplearon 2 μl de un estándar de proteínas (*PAGE ruler*); se adicionó el tampón de corrida 1X a la cámara de electroforesis. Se programó la fuente de poder a 80 v y 500 mA y se dio inicio a la electroforesis. A la media hora, aproximadamente, se pausó la corrida y el voltaje se incrementó a 100 v. Se reinició la electroforesis y esta duró alrededor de 2 h.

WESTERN BLOTTING

Se terminó la electroforesis, se recuperó el *running gel* y se ensambló el *sándwich* de transferencia con el *transfer buffer* 1X que estaba a 4 °C, en una bandeja plástica, se humedecieron las *transfer stacks* y se eliminaron las burbujas empleando un rodillo, después se colocó la membrana de transferencia (hecha de nitrocelulosa) y encima de esta

se puso el gel, se colocó la otra pila o *stack* de transferencia, se selló la bandeja y se la insertó en el equipo Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, se programó la opción “List”, luego “Biorad”, y después “High MW”; 25 A, 25 v, 10 min.

Sucedida la transferencia, se lavó la membrana con agua destilada de manera delicada, se agregó Rojo Ponceau y se dejó en agitación (30 a 40 RPM) hasta haber visto las bandas en las membrana (20 min), de ahí, se cortaron las membranas según los marcadores de interés, después se lavó con dH_2O -TBS-T 0.1% hasta haber desteñido la membrana (tres veces por 10 min) y luego se añadió la solución de bloqueo (TBS-T 0.1% + BSA 5%) por 3 h o 1 h como mínimo, RT o 4 °C O/N y en agitación.

Se recuperó la solución de bloqueo, se incubó con anticuerpo primario (pAB o Ab₁): anti-TDP-43 (Proteintech 10782-2-AP, 1:2000), anti-Lamp2A (Abcam ab18528, 1:2000) y anti-Flag (Sigma M2, 1:1000), según haya sido el caso; preparado en TBS-T 0.1% según la dilución por 2 h, RT o 4 °C O/N y en agitación. Luego se recuperó el pAB y se lavó 3 veces con TBS-T 0.1% por 10 min en agitación (30 a 40 RPM), se incubó con el anticuerpo secundario o sAB o Ab₂, β -Actin (1:10 000), preparado en TBS-T 0.1% por 45 min, se descartó el Ab₂, se lavó 3 veces con TBS-T 0.1% durante 10 min en agitación, se incubó con el reactivo de quimioluminiscencia mejorada o ECL-A y ECL-B (1 ml: 1ml) por 2 min y en agitación y se reveló la membrana en el lector de imágenes Odyssey® Fc. Las imágenes se vieron con Image Studio™ v5.2 y se hizo densitometría a través de Fiji. Para ajustar la curva de decaimiento exponencial y determinar la constante de velocidad de decaimiento, los valores de inicio y meseta, se empleó un análisis de regresión no lineal y se trabajó con el decaimiento exponencial de una fase en el producto software GraphPad Prism 9.

ANÁLISIS POR MICROSCOPIA DE INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Las células de estudio se sembraron en placas de seis pozos con láminas cubreobjetos, estos últimos estuvieron cubiertos con una solución de poli-L-lisina (0.02% v/v). Se dejó los *covers* en la incubadora entre 20 a 30 min a 37 °C, se recuperó la poli-L-lisina y se dejaron secar los *covers* entre 10 a 20 min a RT, después se cultivaron las células sobre los *covers* y se las dejó crecer hasta alcanzar un 50% de confluencia, se retiró el medio nutritivo, se lavó con PBS 1X, se fijaron en 4% PFA por 20 min a RT, se lavó tres veces por 5 min con PBS 1X, seguidamente, se lavó con PBS-T 0.1% durante 5 min en hielo, se volvió a lavar 3 veces por 5 min con PBS-1X y, entonces, se añadió la solución de bloqueo (PBS + 2% BSA) por 20 min a RT, se lavó con PBS 1X y el *cover* invertido se incubó con 30 μl de Ab₁ (1:200) por un día en cámara húmeda y cubierta con papel aluminio, luego se lavó, en obscuridad, con PBS 1X tres veces por 5 min, se incubó en un ambiente oscuro con Ab₂ (1:500) durante 1 h, RT, después se lavó con PBS 1X durante 5 min y 3 veces en obscuridad, se incubó con DAPI o Hoescht 33342 (1:5000) en solución de bloqueo, RT por 5 min y en obscuridad, se lavó con PBS 1X durante 5 min y 3 veces; se montó con una gota de medio de montaje DAKO y se guardó en obscuridad y a 4 °C.

Se usaron los anticuerpos primarios anti-Flag y anti-TDP43; los anticuerpos secundarios anti-mouse-Alexa Fluor 594 y anti-rabbit-Alexa Fluor 488; Hoescht 33342 para teñir el núcleo celular. Las muestras fueron capturadas con el microscopio Nikon Eclipse Ti-E. Cada lámina se visualizó usando un microscopio de epifluorescencia y se analizó con Fiji.

DECAIMIENTO EXPONENCIAL DE UNA FASE

Para los experimentos de pulso-persecución (del inglés *pulse-chase*) el decaimiento exponencial se dio cuando una cantidad disminuyó a una tasa proporcional a su valor actual²¹⁵. La ecuación de decaimiento exponencial modeló muchos procesos químicos y biológicos, esta se empleó siempre que la velocidad a la que acaeció algún proceso o reacción que fue proporcional a la cantidad remanente²¹⁵.

Se calculó el valor de vida media (*half-life*) usando el siguiente modelo matemático, presente en la ecuación (1), para el decaimiento de una fase:

$$Y = (Y_0 - Plateau) \exp(-KX) + Plateau \quad (1)$$

Donde se tuvo que X = tiempo, Y = niveles de la proteína TDP-43, donde empezó en Y_0 y decayó (con una fase) hasta la meseta o altiplano (*plateau*); Y_0 y *plateau* tuvieron las mismas unidades que Y ; K = constante de velocidad que fue igual al recíproco de la descomposición de TDP-43 (es decir, al cambio porcentual a lo largo del tiempo, ver Figura N°. 29).

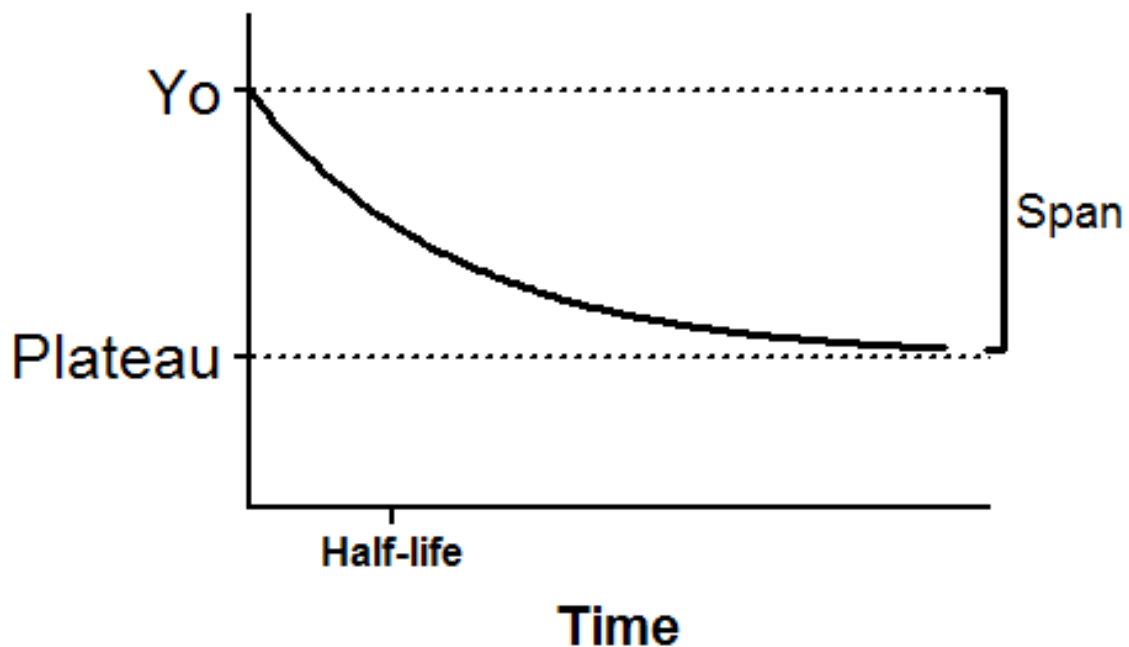


Figura N°. 29. Representación de la ecuación del modelo de decaimiento exponencial de una fase. Las constantes de decaimiento más grandes hacen que la cantidad desaparezca mucho más rápidamente. Y_0 es el valor de Y cuando X (tiempo) es cero. Se expresa en las mismas unidades que Y ; asimismo, **Plateau** es el valor de Y en tiempos infinitos, expresado en las mismas unidades que Y ; K es la constante de velocidad, expresada en el recíproco de las unidades de tiempo del eje X . Si X está en minutos, entonces K se expresa en minutos inversos; τ o **tau** es la constante de tiempo, expresada en las mismas unidades que el eje X . Se calcula como el recíproco de K ; la **vida media** está en las unidades de tiempo del eje X . se calcula como $\ln(2)/K$; **Span** es la diferencia entre Y_0 y *Plateau*, expresada en las mismas unidades que sus valores Y . La derivada de un decaimiento exponencial es igual a $-K*Y$, entonces la tasa inicial es igual a $-K*Y_0$. Adaptado de Motulsky²¹⁵.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

CULTIVO DE CÉLULAS HEK293

Las líneas celulares derivadas de HEK-293 (Figura N°. 30, Figura N°. 31, Figura N°. 32) sembradas en placas de 100 mm de 6 pocillos alcanzaron confluencia entre el 80% y 90%, adhiriéndose perfectamente a la superficie de la placa de cultivo y sin formar cúmulos, sólo creciendo aquellas que fueron resistentes a Hygromycin B (200 µg/ml) para multiplicar aquellas que sólo fuesen capaces de expresar las proteínas transgénicas TDP-43 y LAMP-2A.

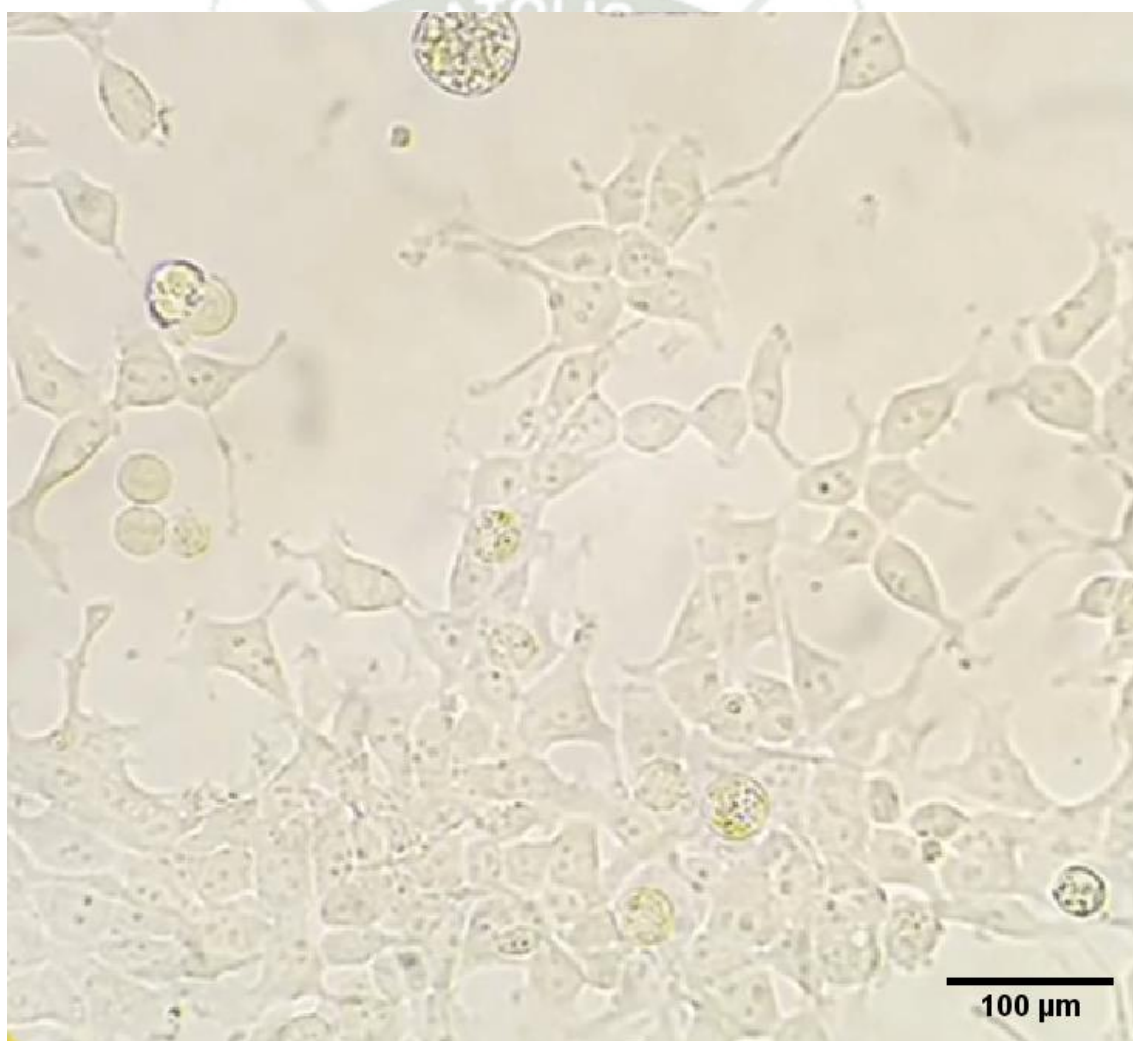


Figura N°. 30. Células HEK-293. Células HEK 293 TDP-43 WT en placa de cultivo de 100 mm, imagen con un objetivo de 40x.

HEK293 Flag-TDP-43 WT sobre-expresando Flag-TDP-43 WT

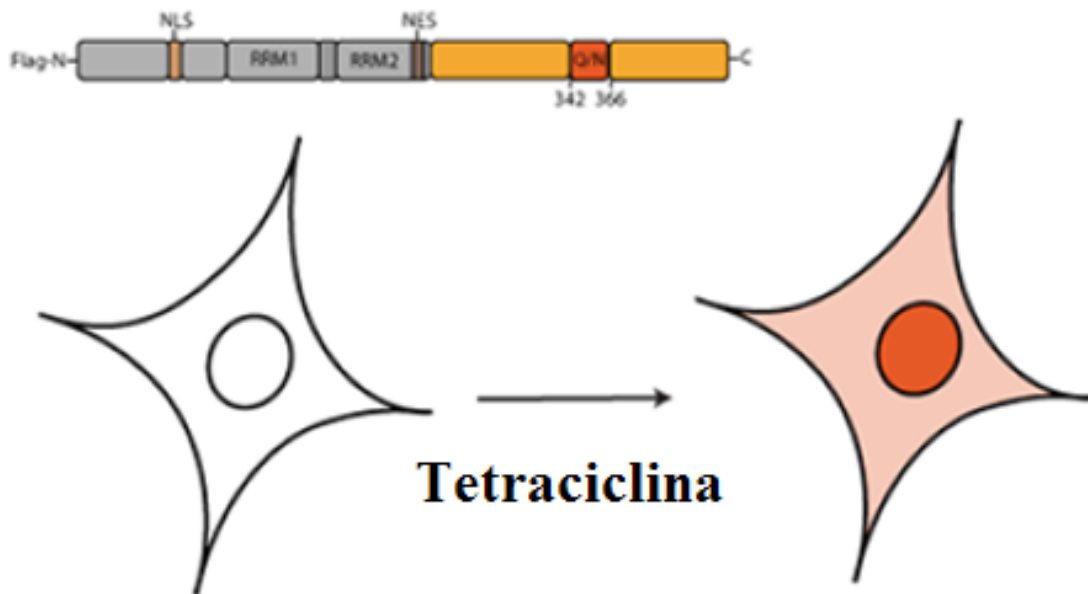


Figura N°. 31. Esquema de la línea celular trabajada HEK293 Flag-TDP-43 WT. Se representa la línea HEK293 Flag-TDP-43 WT que sobre-expresa una forma silvestre de TDP-43 con la etiqueta proteica Flag después de una inducción con tetraciclina. Adaptado de Ormeño *et al*²³.

HEK293 Flag-TDP-12xQ/N sobre-expresando agregados de Flag-TDP-12xQ/N

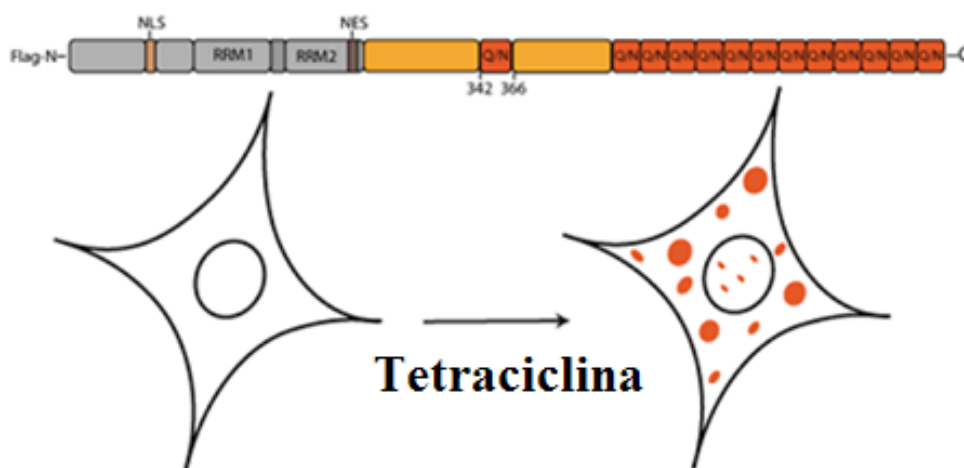


Figura N°. 32. Esquema de la línea celular trabajada HEK293 Flag-TDP-12xQ/N. Se representan la línea HEK293 Flag-TDP-12xQ/N que sobre-expresa una forma propensa a agregarse de TDP-43 con una etiqueta Flag después de una inducción con tetraciclina. Adaptado de Ormeño *et al*²³.

DETERMINACIÓN PROTEICA

El análisis por el ensayo del ácido bincinconínico (*bicinchoninic acid assay*, BCA), a una longitud de onda de 562 nm, brindó la concentración de proteína total en las muestras trabajadas de las diversas líneas celulares empleadas (Anexo I) y así se pudieron realizar diluciones para una sola concentración proteica con el fin de cargar volúmenes a emplear en la SDS-PAGE y posterior Western Blotting para obtener los niveles relativos de TDP-43 y LAMP-2A.

MUTACIÓN DE MOTIVOS KFERQ

Las mutaciones sitio-dirigidas de los motivos KFERQ en HEK-293 TDP-43 WT condujeron al desarrollo de las líneas HEK-293 TDP-43 QD/AA, HEK-293 TDP-43 QV/AA y HEK-293 TDP-43 QD/AA + QV/AA, cuyas sobre-expresiones de la proteína TDP-43 transgénica fue corroborada por WB (Figura N°. 33).



Figura N°. 33. Niveles proteicos de TDP-43 en HEK-293 con motivos KFERQ mutantes. Los niveles de la proteína de TDP-43 WT recombinante presente en los puntos de tiempo indicados después de una inducción con tetraciclina

NIVEL DE TDP-43

La inducción de la sobre-expresión de TDP-43 en las líneas celulares con motivos KFERQ mutados: HEK293 TDP-43 QD/AA, HEK293 TDP-43 QD/AA + QV/AA y HEK293 TDP-43 QV/AA y la línea control: HEK293 TDP-43 WT se ejecutaron acorde a la programación de la experimentación (Figura N°. 34). Posteriormente, luego de haberse recolectado todas las muestras, se ejecutó el fraccionamiento celular, pasando a la determinación proteica de las muestras a través de un análisis vía WB (Figura N°. 35).

El análisis de las bandas obtenidas en las membranas de NC fue a través de las imágenes capturadas con Image Studio™ v5.2 y su correspondiente análisis densitométrico por medio de ImageJ (Fiji), donde se determinó el decaimiento exponencial de una fase con GraphPad Prism 9 (Figura N°. 36, Tabla N°. 06, Anexo II y Anexo III).

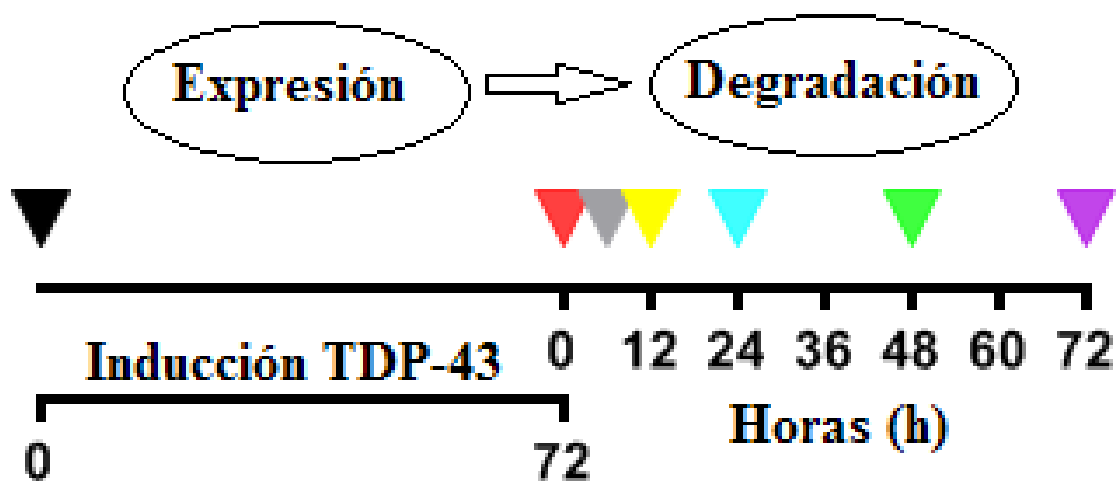
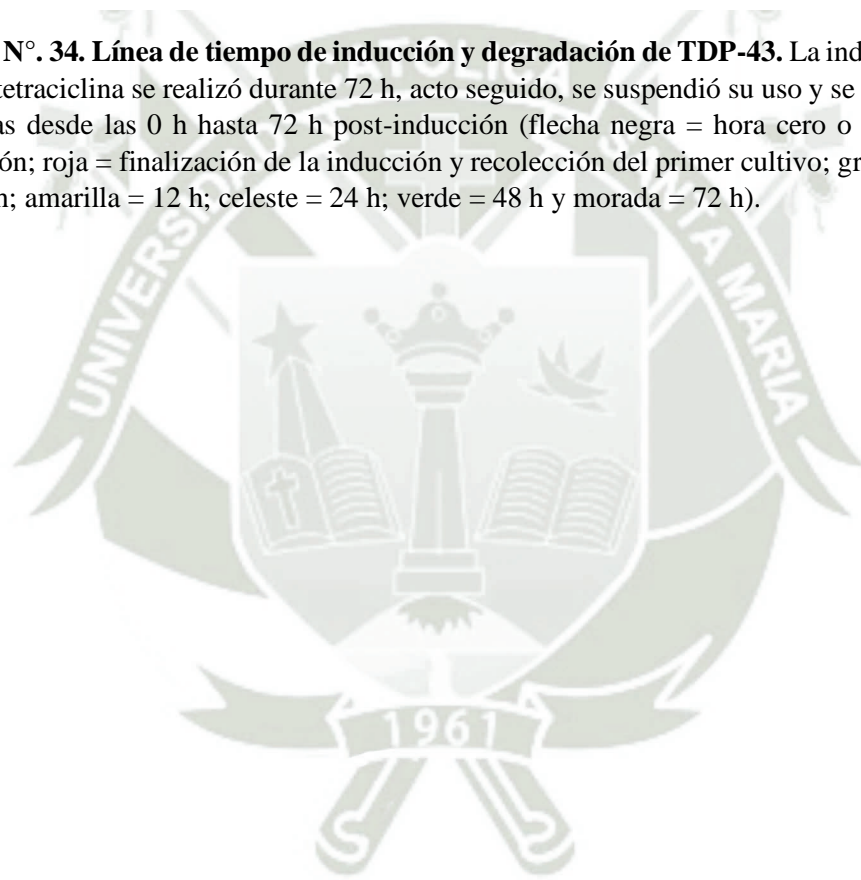


Figura N°. 34. Línea de tiempo de inducción y degradación de TDP-43. La inducción de TDP-43 por tetraciclina se realizó durante 72 h, acto seguido, se suspendió su uso y se recolectaron las muestras desde las 0 h hasta 72 h post-inducción (flecha negra = hora cero o comienzo de la inducción; roja = finalización de la inducción y recolección del primer cultivo; gris = recolección a las 6 h; amarilla = 12 h; celeste = 24 h; verde = 48 h y morada = 72 h).



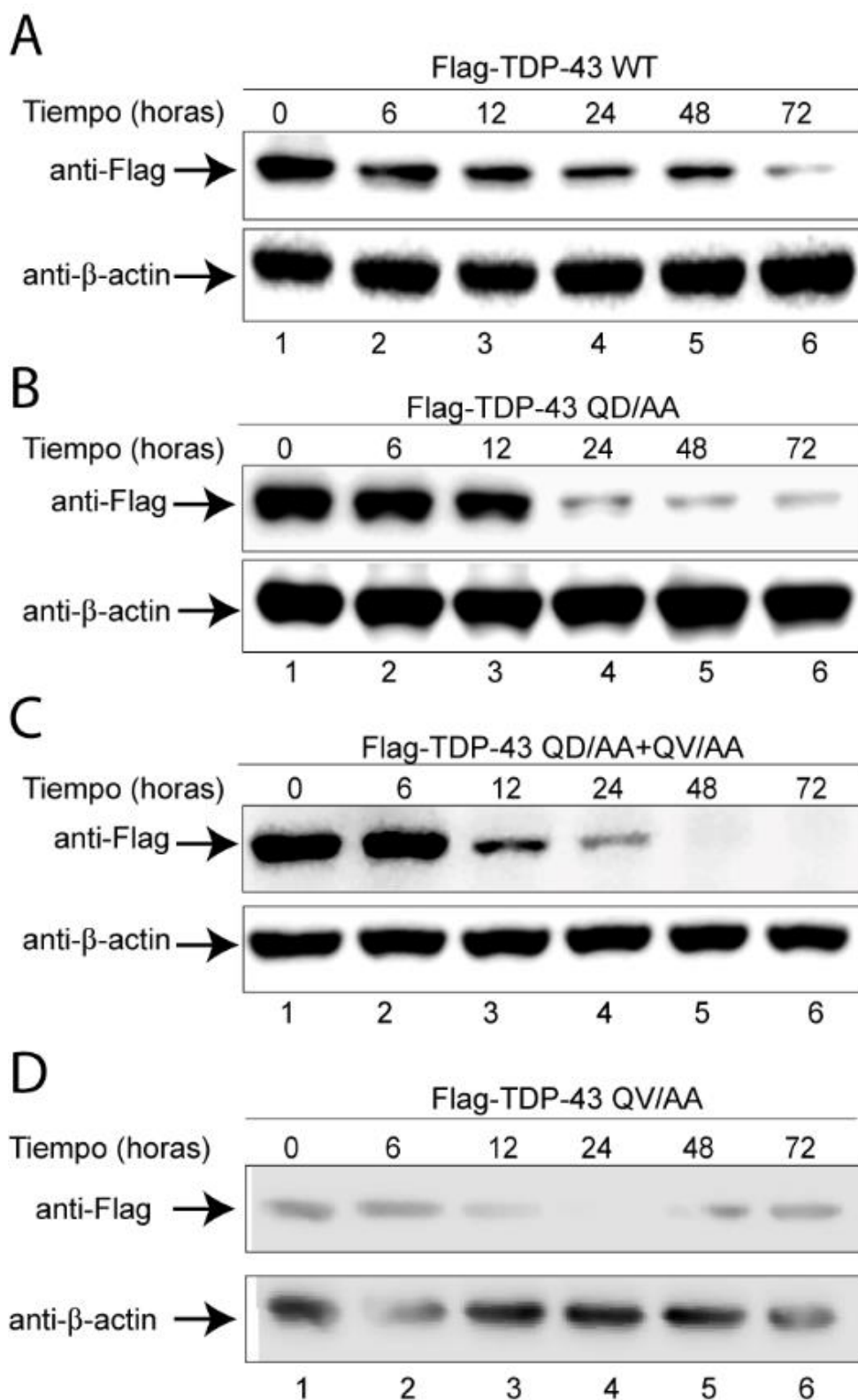


Figura N°. 35. Niveles proteicos de TDP-43. Los niveles de la proteína de TDP-43 recombinante presente en los puntos de tiempo indicados después de una inducción con tetraciclina para cada línea celular: **(A)** HEK293 TDP-43 WT, **(B)** HEK293 TDP-43 QD/AA, **(C)** HEK293 TDP-43 QD/AA + QV/AA y **(D)** HEK293 TDP-43 QV/AA fueron evaluados por Western blot.

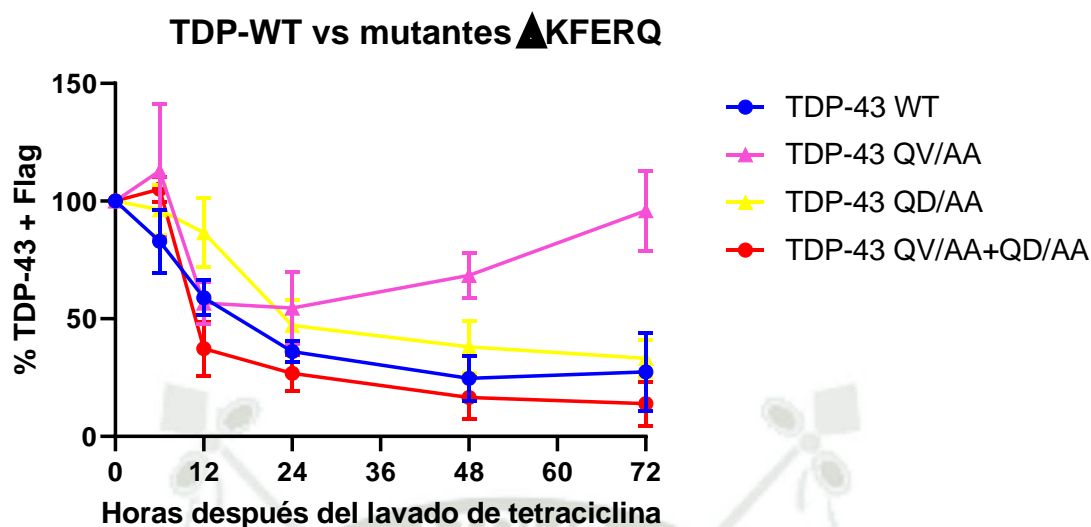


Figura N°. 36. Degradación de TDP-43 en líneas mutantes con motivos KFERQ editados. La gráfica muestra los niveles de la proteína TDP-43 recombinante presente en los puntos de tiempo indicados (hasta 72 h) después de una inducción con tetraciclina para cada línea celular: (azul) HEK293 TDP-43 WT, (rosado) HEK293 TDP-43 QV/AA, (amarillo) HEK293 TDP-43 QV/AA y (rojo) HEK293 TDP-43 QD/AA + QV/AA.

Tabla N°. 06. Degradación de TDP-43 en los modelos con motivo KFERQ mutado.

DECAIMIENTO DE UNA FASE				
Valores con mejor ajuste	WT	QV	QD	QV+QD
Y₀ (%TDP-43)	102.9	106.4	106.4	109.9
Plateau (%TDP-43)	23.35	71.7	24.91	10.79
K	0.06559	0.1359	0.03712	0.06662
Vida media (h)	10.57	5.099	18.67	10.4
τ (h)	15.25	7.357	26.94	15.01
Alcance (%TDP-43)	79.54	34.71	81.51	99.07

Por otra parte, en la Tabla N°. 06 se tiene que X = tiempo (horas) después del lavado de la tetraciclina, Y = porcentaje (%) de los niveles de la proteína TDP-43 marcadas con la etiqueta molecular Flag; Y_0 y *Plateau* tienen las mismas unidades que Y ; K = constante de velocidad igual al recíproco de la descomposición de TDP-43 (cambio porcentual a lo largo de los puntos de tiempo); τ o **tau** (recíproco de K) es la constante de tiempo, expresada en las mismas unidades que X , es decir, horas; la **vida media** está en horas. se calcula como $\ln(2)/K$; *Span* es la diferencia entre Y_0 y *Plateau*, expresada en las mismas unidades que sus valores, vale decir: porcentaje (%) de los niveles de TDP-43 etiquetada con Flag.

El perfil decaimiento con un intervalo de confianza del 95 % (que es un rango de valores en los que puede estar seguro al 95 % que contiene la verdadera media de las muestras trabajadas) se indica al final del Anexo 3.

NIVEL DE LAMP-2A

En las líneas HEK293 Flp-In, HEK293 TDP-43 WT y HEK293 TDP-43 12xQ/N se hicieron transfecciones transientes de LAMP-2A (Figura N°. 37 y Anexo IV) con pCMV6-Entry, empleando Effectene®; se seleccionaron con G418 y se mantuvieron con G418 y también con Hygromycin B. Luego se realizó una electrotransferencia para la identificación de LAMP-2A en los extractos celulares.

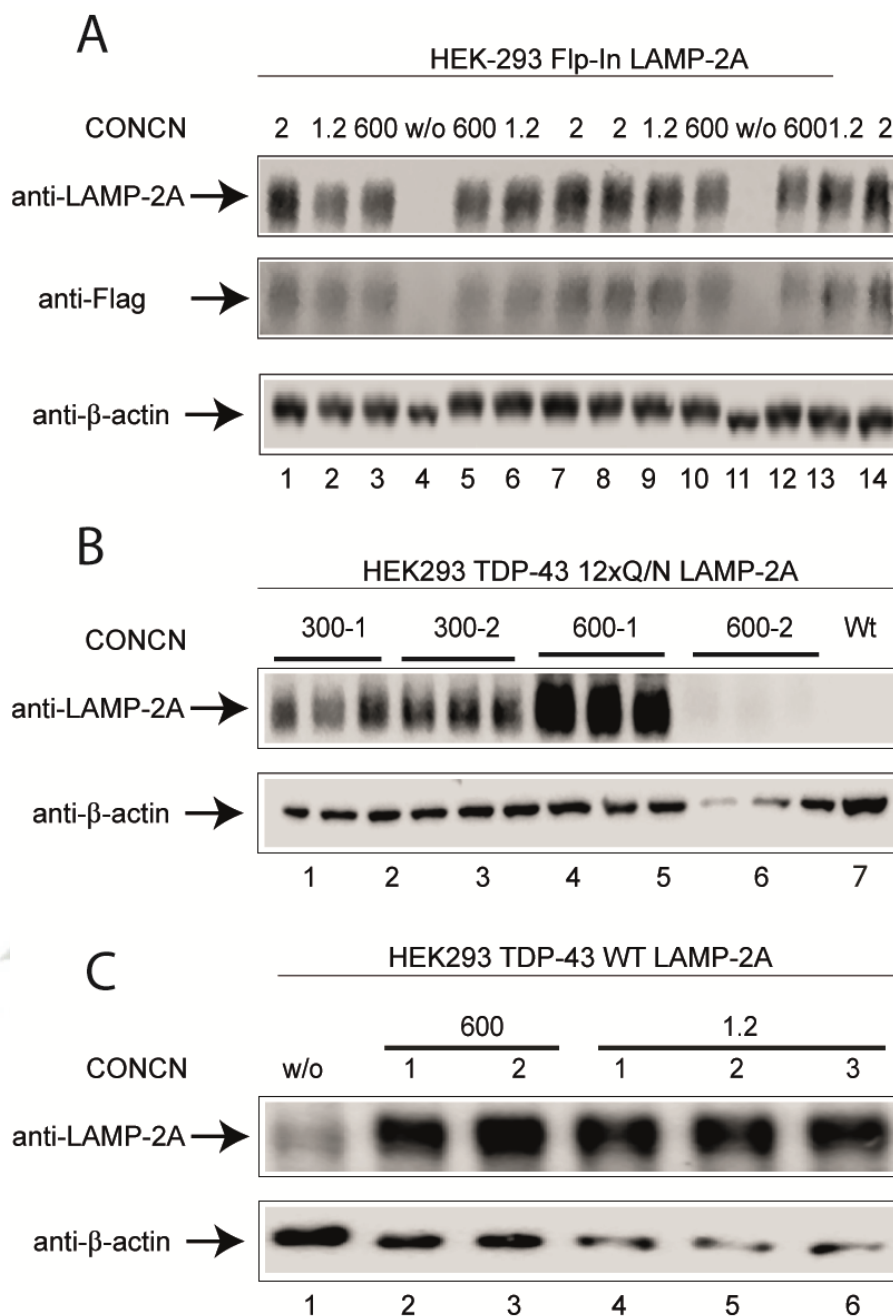


Figura N° 37. Niveles proteicos de LAMP-2A en las líneas transgénicas HEK293. Los niveles de la proteína de LAMP-2A recombinante presente en las líneas celulares seleccionadas con G418 ($600 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$; $1.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ y $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) (A) HEK293 Flp-In LAMP-2A, (B) HEK293 TDP-43 12xQ/N y (C) HEK293 Flp-In TDP-43 WT.

INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

Las líneas celulares HEK293 Flp-In, HEK293 TDP-43 WT y HEK293 TDP-43 12xQ/N fueron sembradas en placas de seis pozos con láminas cubreobjetos con con poli-L-lisina, fijadas con PFA y se analizaron empleando los anticuerpos primarios Ab₁ (1:200) anti-Flag y anti-TDP43; los anticuerpos secundarios Ab₂ (1:500) anti-mouse-Alexa Fluor 594 y anti-rabbit-Alexa Fluor 488; y Hoescht 33342 (1:5000) para teñir el núcleo celular, viéndoselas en el microscopio Nikon Eclipse Ti-E. Cada lámina se visualizó usando un microscopio de epifluorescencia y se analizó con Fiji (Figura N°. 38).

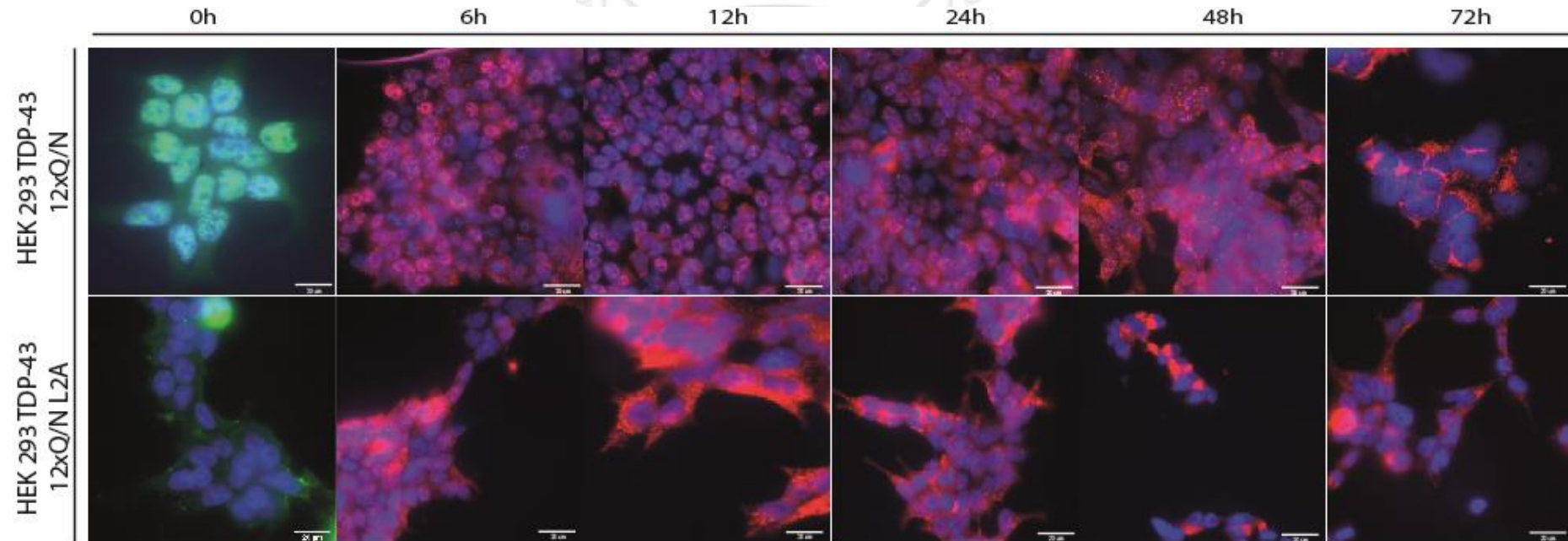


Figura N°. 38. Línea transgénica HEK293 TDP-43 12xQ/N LAMP-2A. En la figura muestra la nueva línea celular HEK293 TDP-43 12xQ/N LAMP-2A que sobre-expresa la proteína LAMP-2A recombinante en distintos puntos de tiempo (desde 0h hasta 72h) *versus* su control HEK 293 TDP-43 12xQ/N.

DISCUSIÓN

Dentro de las primeras 24 h de iniciada la inducción con tetraciclina, la línea celular HEK293 TDP-43 QV/AAA, correspondiente al motivo descrito mutado, presentó un comportamiento anómalo al incrementar su presencia a las 6 h; a las 12 h se evidenció una degradación similar a la acaecida en la línea control, para de ahí aumentar ligeramente su presencia hasta pasada las 24 h. A partir del primer día de sobre-estimulación, la cantidad de TDP-43 se incrementó hasta terminado el experimento a las 72 h post-inducción de tetraciclina. Respecto a la línea con el motivo putativo mutado, HEK293 TDP-43 QD/AAA, sí manifestó una reducción de TDP-43, pero fue menor al control y a las otras líneas desarrolladas, hasta las 18h post inducción, para las 24 h, el porcentaje de TDP-43 etiquetada con Flag fue mayor a la línea con el motivo QV, pero menor que el control y la doble mutante.

Por otra parte, la línea doble mutante, HEK293 TDP-43 QV/AAA + QD/AAA, a las 6h post-inducción arrojó un similar porcentaje al de la línea HEK293 TDP-43 QV/AAA, pero luego se dio un descenso del nivel de la proteína TDP-43 a las 12 h y se mantuvo hasta las 72 h, siendo mayor que todas las líneas empleadas. Las modificaciones de los motivos tipo KFERQ rememoran a un trabajo similar, que fue el que se realizó en una investigación del 2018, donde se construyó un anticuerpo que reconocía a TDP-43, se le añadió una secuencia aminoacídica tipo KFERQ. Al tener éste pentapéptido, el anticuerpo se volvió un sustrato de la CMA, reforzándose así esta reacción catabólica. Además de mostrarse una mejorara en su eliminación por parte del proteasoma²².

En la investigación ejecutada por Ormeño *et al.* en el 2020²³, único trabajo que sirve como antecedente a esta tesis, se evidenció que TDP-43 era un sustrato *in vivo* de la CMA, ya que trabajos previos sólo exploraron la propuesta como blanco de la CMA a nivel *in vitro*, aunque con una serie de experimentos por realizar¹¹ para confirmar esto.

En la investigación del suscrito se bloqueó la CMA por medio de la modificación de los motivos tipo KFERQ, mientras que en el trabajo de Ormeño, se empleó un siRNA o ARN pequeño de interferencia o de silenciamiento para LAMP-2A que actuó en el modelo de Budini *et al.*²⁰², que es capaz de expresar una forma de TDP-43 propensa a agregarse, Flag-TDP-12xQ/N, y también trabajar sobre forma endógena de TDP-43 y en la proteína Flag-TDP-43 WT que es sintetizada por un segundo modelo celular: HEK293 TDP-43 WT. La eficiencia del silenciamiento fue del 60%, mientras que en la presente tesis se superó el 90% de la disminución de los niveles de TDP-43; así se evidenció que la pérdida de actividad de la CMA a través de la disminución de LAMP-2A afectó el recambio de TDP-43 endógena, así como las exógenas (Flag-TDP-43 WT y Flag-TDP-12xQ/N)²³ y que la modificación de los motivos tipo KFERQ es una tecnología superior en cuanto eficacia y eficiencia para la detención de la actividad de la CMA.

En el mismo trabajo de Ormeño se vio que la agregación de TDP-43 sobre-regula la actividad de la CMA a través de la variación de la expresión de LAMP-2A y de HSPA8 en la línea HEK293 TDP-12xQ/N, empero no en HEK293 TDP-43 WT o HEK 293 Flp-In; por lo que, en el modelo HEK293 TDP-12xQ/N sí ocurre una sobre-regulación o sobre-producción de LAMP-2A y de HSPA8 en respuesta a sobre-expresión de TDP-43 por inducción con tetraciclina²³.

Después, la línea HEK293 TDP-43 12xQ/N LAMP-2A no presentó proteína TDP-43 agregada al compararla con su contraparte HEK293 TDP-43 12xQ/N. Esto se puede comparar con un trabajo realizado sobre la regulación de los niveles proteicos de los neurofilamentos de sub-unidad pesada o NF-H (cuya secuencia aminoacídica es poseedora de cuatro motivos KFERQ). Estos NF-H son importantes en la citoarquitectura neuronal, con una implicancia en el crecimiento radial axonal y la transmisión de señales eléctricas a lo largo de los axones. Aquí, se vio que la sub-expresión de LAMP-2A indujo un temprano (6h) desarrollo axonal de la línea celular NSC-34²¹⁶. Por otra parte, una sobre-regulación de la CMA (mayor producción de LAMP-2A) en células con la proteína Htt mutante afectó su actividad macroautofágica¹²⁵.

En éste trabajo del 2020²³, se vio que la agregación de TDP-43 afectó a los lisosomas positivos a LAMP-2A, ya que sus niveles de mRNA se elevaban, además de que co-localizaba con Flag-TDP-12xQ/N, aunque a partir de las 24 h hasta las 72 h decreció constantemente esta co-localización. Al final, Ormeño y demás co-autores demostraron que la acumulación de TDP-43 promueve la sobre-expresión de LAMP-2A y que la CMA; comparado con el trabajo realizado en esta tesis, se ven similitudes al incrementar el nivel de LAMP-2A, como lo son: el refuerzo de la actividad de la CMA y la conservación de la proteína TDP-43 que no se encuentra agregada, pero se observa la aparición de la desagregación de TDP-43 que se ve difuminada alrededor del núcleo celular.

En una investigación de Ormeño²¹⁷, se postuló que CMA podría participar en la diferenciación de adipocitos (de pre-adipocitos a adipocitos maduros capaces de almacenar lípidos) a través de la degradación cronometrada de proteínas reguladoras. La diferenciación de adipocitos se asoció con un aumento de los niveles del ARNm y de la proteína de LAMP-2A²¹⁷, esto, junto a los resultados de Ormeño²³, ayuda a comprender que la CMA controla los niveles proteicos de la forma agregada de TDP-43. Además, hay que tener presente que los substratos proteicos deben ser desenrollados y los agregados proteicos no son fáciles de degradar por CMA, por lo que la CMA puede ser afectada negativamente después de una prolongada exposición de agregados de TDP-43.

Por otra parte, es posible que los monómeros u oligómeros de TDP-43 sean más fáciles de degradar por la CMA, tal como Ormeño²¹⁷ y esta tesis indican al observarse una alta presencia de TDP-43 distribuida difusamente en el citoplasma después de una sobre-regulación de LAMP-2A. Si comparamos con otra proteína en un contexto neurodegenerativo como la α -synuclein, una proteína neuronal expresada con abundancia en el cerebro y presente en la EP y Demencia de Cuerpos de Lewy, en el trabajo de Wu y compañeros¹³² se vio que la α -synuclein podía ser degradada por compuestos provenientes de plantas medicinales y que hacían que la proteína en cuestión co-localizara con LAMP-2^a haciéndola más proclive a su degradación lisosomal.

Coligiendo lo anterior, se puede indicar que la CMA tiene como diana a TDP-43, tanto en su forma silvestre como la propensa a agregarse; además, la síntesis de un motivo tipo KFERQ o la modificación de éste puede mejorar la actividad catabólica de la CMA para poder procesar agregados de TDP-43. Paralelamente, la sobre-expresión de un componente de la CMA, LAMP-2A, desarma agregados de TDP-43 y genera una alta cantidad de monómeros u oligómeros de TDP-43 que se llegan a ubicar en la zona perinuclear.

CONCLUSIONES

- La mutación de los motivos tipo KFERQ: QV y del putativo QD, de la proteína TDP-43, promovieron la reducción significativa de la proteína TDP-43 en la línea celular HEK293 TDP-43 QV/AAA + QD/AAA. Por lo que no bloqueó la degradación de TDP-43 por la CMA y se indujo un incremento de la desestabilización y/o degradación y/o de TDP-43.
- HEK293 TDP-43 12xQ/N LAMP-2A no presentó TDP-43 agregada al compararla con su contraparte HEK293 TDP-43 12xQ/N. Entonces, la estimulación de CMA reduce o elimina la formación de agregados de TDP-43, por lo que se generaron líneas estables con niveles aumentados de LAMP-2A y se determinó que la estimulación de CMA reduce la formación de agregados de TDP-43 al desestabilizar y/o degradar la estructura proteica.
- No se pudo determinar si la estimulación de CMA rescató la pérdida de función de TDP-43 causada por su agregación, dada la falta de tiempo para la ejecución de éste ensayo, sólo se logró generar las líneas estables con niveles aumentados de LAMP-2A, faltó extraer el ARN para hacer una RT-PCR para POLDIP3 y así confirmar si hubo o no una pérdida de función de TDP-43 a través de la detección de la desregulación del *splicing* alternativo del exón 3 de POLDIP3.
- Dado lo anterior, sí se pudo determinar que la estabilidad y agregación de la proteína TDP-43 fueron reguladas por la autofagia mediada por chaperona (CMA), sólo quedando pendiente la determinación de su función.

RECOMENDACIONES

1. Realizar extracción de ARN para ejecutar una RT-PCR para POLDIP3 y así confirmar la pérdida de función de TDP-43 a través de la detección de la desregulación del *splicing* alternativo del exón 3 de POLDIP3 en las líneas con motivo KFERQ mutante y con LAMP-2A sobre expresada.
2. Trabajar en diferentes condiciones experimentales, como provocar tensión por falta de nutrientes, por hipoxia hipobárica, entre otras, para observar el comportamiento de la agregación de TDP-43.
3. Emplear tecnología GFP (proteína fluorescente verde) como biFC (complementación de fluorescencia bimolecular) y triFC (trimolecular) para estudiar la localización de LAMP-2A, de los agregados de TDP-43, tanto en las líneas con motivo KFERQ mutante como en HEK293 TDP-43.
4. Usar secuenciación masiva por RNA-Seq para formar transcriptomas que ayuden a explorar el impacto de la sobre-expresión de LAMP-2A y la agregación de TDP-43 en la degradación, señalización y transporte proteico.
5. Utilizar compuestos provenientes de plantas oriundas del Perú con aplicaciones neuroprotectoras como la maca (*Lepidium meyenii*), jerjo o mito (*Carica Candicans Gray*), aguaje (*Mauritia flexuosa*) o el camu-camu (*Myrciaria dubia*), entre otras, para revertir los efectos generados por la agregación de TDP-43 y restaurar su función, tanto en las líneas con motivo KFERQ mutante como en HEK293 TDP-43.
6. Estudiar el rol de TDP-43 en la espermatogénesis, la degeneración de la retina del ojo y la infertilidad masculina, así como en la producción de leche materna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. Garland Science; 2014. 1465 p.
2. Clark D, Pazdernik N, McGehee M. *Molecular biology* [Internet]. *Molecular Biology*. Elsevier; 2018. 1–1006 p. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20150062293>
3. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Dice's "wild" idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(8):535–41. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3150>.
4. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(9):814–22. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-814>.
5. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(7):1125–36. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>.
6. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem*. 2000;275(40):31505–13. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M002102200>.
7. Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1990; 8:305–9. Disponible desde: [http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](http://dx.doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8).
8. Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2007;3(4):295–9. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.4161/auto.4144>.
9. Ou SI, Wu F, Harrich D, García-Martínez LF, Gaynor RB. Cloning and Characterization of a Novel Cellular Protein, TDP-43, That Binds to Human Immunodeficiency Virus Type 1 TAR DNA Sequence Motifs. *J Virol*. 1995;69(6):3584–96.
10. Prasad A, Bharathi V, Sivalingam V, Girdhar A, Patel BK. Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2019;12(febrero):1–36p.
11. Huang CC, Bose JK, Majumder P, Lee KH, Huang JTJ, Huang JK, et al. Metabolism and mis-metabolism of the neuropathological signature protein TDP-43. *J Cell Sci*. 2014 ;127(14) :3024–38. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.136150>. Disponible en : <https://jcs.biologists.org/content/127/14/3024.long>.
12. Kim SH, Shi Y, Hanson KA, Williams LM, Sakasai R, Bowler MJ, et al. Potentiation of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated TDP-43 aggregation by the proteasome-targeting factor, ubiquilin 1. *J Biol Chem*. 2009;284(12):8083–92. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M808064200>.
13. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EMC, et al. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J Cell Biol*. 2007;179(3):485–500p. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200702115>.

14. Liu G, Coyne AN, Pei F, Vaughan S, Chaung M, Zarnescu DC, et al. Endocytosis regulates TDP-43 toxicity and turnover. *Nat Commun* [Internet]. 2017. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02017-x>.
15. Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006;314(5796):130–3. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1134108>.
16. Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;351(3):602–11. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.136150>.
17. Budini M, Baralle FE, Buratti E. Expert Opinion on Therapeutic Targets Targeting TDP-43 in neurodegenerative diseases Targeting TDP-43 in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2014; 8222:617–32. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2014.896905>.
18. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018 Jun 6;19(6):365–81. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
19. Arias E, Cuervo AM. Pros and Cons of Chaperone-Mediated Autophagy in Cancer Biology. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2020;31(1):53–66. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.09.007>.
20. Alfaro IE, Albornoz A, Molina A, Moreno J, Cordero K, Criollo A, et al. Chaperone mediated autophagy in the crosstalk of neurodegenerative diseases and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(ENE):1–13. Disponible desde; <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00778>.
21. Budini M, Buratti E, Morselli E, Criollo A. Autophagy and Its Impact on Neurodegenerative Diseases: New Roles for TDP-43 and C9orf72. *Front Mol Neurosci*. 2017 ;10(may) :1–21. Disponible desde : <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2017.00170>.
22. Tamaki Y, Shodai A, Morimura T, Hikiami R, Minamiyama S, Ayaki T, et al. Elimination of TDP-43 inclusions linked to amyotrophic lateral sclerosis by a misfolding-specific intrabody with dual proteolytic signals. *Sci Rep* [Internet]. 2018 ;8(1) :1–16. Disponible desde : <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24463-3>.
23. Ormeño F, Hormazabal J, Moreno J, Riquelme F, Rios J, Criollo A, et al. Chaperone Mediated Autophagy Degrades TDP-43 Protein and Is Affected by TDP-43 Aggregation. *Front Mol Neurosci*. 2020;13(feb):1–17. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.3389/fnmol.2020.00019>.
24. Castiglia, VC. Metodología de la investigación biomédica. Fundamentos. 1ra ed. 2016.
25. Hernández-Sampieri R, Mendoza Torres CP. Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. 1ra ed. Mc Graw Hill; 2018.
26. Muñoz Razo C. Cómo elaborar y asesorar una investigación de tesis. 2da ed. Pearson. Prentice Hall ; 2011.
27. Who.int. 2021. Dementia. [online] Disponible en : <https://www.who.int/health-topics/dementia#tab=tab_2>.

28. World Health Organization. Global action plan on the public health response to dementia 2017 – 2025. Geneva World Heal Organ. 2017.
29. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2011;21:718–79.
30. Prince M, Prina M, Guerchet M. Journey of Caring: An Analysis of Long-Term Care for Dementia. In: *World Alzheimer Report 2013.* 2013.
31. Farooqui AA. Molecular mechanisms of dementia: Biomarkers, neurochemistry, and therapy. *Molecular Mechanisms of Dementia: Biomarkers, Neurochemistry, and Therapy.* 2019. 375 p.
32. Cardona-Gómez GP, Lopera F. Dementia, preclinical studies in neurodegeneration and its potential for translational medicine in South America. Vol. 8, *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2016.
33. Baez S, Ibáñez A. Dementia in Latin America: An emergent silent tsunami. Vol. 8, *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2016.
34. Custodio N, Wheelock A, Thumala D, Slachevsky A. Dementia in Latin America: Epidemiological evidence and implications for public policy. *Front Aging Neurosci.* 2017;9(JUL):1–11.
35. United Nations. World Population Ageing 2020 Highlights: Living arrangements of older persons. Vol. 40, *Choice Reviews Online.* 2020.
36. Malagón-Londoño G, Reynales- Londoño J. *Salud pública.* 3rd ed. Bogotá: Panamericana; 2020.
37. WHO Dementia flyer. Dementia: a public health priority [Internet]. Who.int. 2017. Disponible en : http://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/en
38. Landing [Internet]. Paho.org. 2021. Disponible en : <https://www.paho.org/hablemos-sobre-demencia/>
39. Do Carmo Costa M, Paulson HL. New hope for therapy in neurodegenerative diseases. *Cell Res.* 2013;23(10).
40. Ciechanover A, Kwon YT a. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. Vol. 47, *Experimental & molecular medicine.* 2015.
41. A.T. Nijholt D, De Kimpe L, L. Elfrink H, J.M. Hoozemans J, Scheper W. Removing Protein Aggregates: The Role of Proteolysis in Neurodegeneration. *Curr Med Chem.* 2011;18(16).
42. Instituto Nacional de Estadística e Informática [Internet]. M.inei.gob.pe. Disponible en: <http://m.inei.gob.pe/prensa/noticias/en-el-2021-ano-del-bicentenario-de-la-independencia-el-peru-contara-con-una-poblacion-de-33-millones-35-mil-304-habitantes-11624/#:~:text=El%20INEI%20inform%C3%B3%20que%20la,%2C%205%2C3%20a%C3%B1os%20menos.>
43. Custodio N, García A, Montesinos R, Escobar J, Bendezú L. Prevalencia de demencia en una población urbana de Lima-Perú: estudio puerta a puerta. *An la Fac Med.* 2013;69(4):233.
44. Lopes MA, Hototian SR, Reis GC, Elkis H, Bottino CM de C. Systematic review of dementia prevalence – 1994 to 2000. *Dement Neuropsychol.* 2007;1(3):230–40.

45. Nitrini R, Bottino CMC, Albala C, Custodio Capuñay NS, Ketzoian C, Llibre Rodríguez JJ, et al. Prevalence of dementia in Latin America: A collaborative study of population-based cohorts. *Int Psychogeriatrics*. 2009;21(4):622–30.
46. Gob.pe. 2019. Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores en Perú. [online] Disponible desde: <<https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/51175-alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru>>
47. Alva-Díaz C, Huerta-Rosario A, Pacheco-Barrios K, Molina RA, Navarro-Flores A, Aguirre-Quispe W, et al. Neurological diseases in Peru: A systematic analysis of the global burden disease study. *Enfermedades neurológicas en el Perú: un análisis sistemático del Global Burden Disease Study*. *Arq Neuropsiquiatr*. 2020;78(5):282–9.
48. mhGAP Intervention Guide – Version 2.0 [Internet]. Who.int. 2021 [cited 13 May 2021]. Disponible desde: <https://www.who.int/publications/i/item/mhgap-intervention-guide---version-2.0>
49. WHO First WHO Ministerial Conference on Global Action Against Dementia [Internet]. Who.int. 2021. Disponible en : https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/ministerial_conference_2015_report/en/
50. Aguirre-Milachay E, Alva-Díaz C. ¿Es posible reducir la prevalencia de demencia? Necesitamos nuevos enfoques para enfrentar la demencia. *Med Fam Semer*. 2018 ;44(8) :586–9.
51. Taudorf RKE, Id O, Article O, Brodaty H, Laursen TM, Waldemar G, et al. Dementia increases mortality beyond effects of co-morbid conditions: A national registry-based cohort study. *Europan J Neurol*. 2021 ;1–27.
52. Landing [Internet]. Paho.org. 2021. Disponible en : <https://www.paho.org/hablemos-sobre-demencia/>
53. GBD Compare | IHME Viz Hub [Internet]. Vizhub.healthdata.org. 2021. Disponible en: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
54. Alzheimer/Demencia en Paraguay [Internet]. World Life Expectancy. 2021. Disponible en: <https://www.worldlifeexpectancy.com/es/cause-of-death/alzheimers-dementia/by-country/>
55. Custodio N, Lira D, Herrera-Perez E, Prado LN del, Parodi J, Guevara-Silva E, et al. Cost-of-illness study in a retrospective cohort of patients with dementia in Lima, Peru. *Dement Neuropsychol*. 2015;9(1):32–41
56. Wimo A, Prince M. World Alzheimer Report 2010 – The Global Economic Impact of Dementia. *Alzheimer’s Disease International*. London. 2010
57. Coduras A, Rabasa I, Frank A, Bermejo-Pareja F, López-Pousa S, López-Arrieta JM, et al. Prospective one-year cost-of-illness study in a cohort of patients with dementia of Alzheimer’s disease type in Spain: The ECO study. *Journal of Alzheimer’s Disease*. 2010; 19(2)
58. Allegri RF, Butman J, Arizaga RL, Machnicki G, Serrano C, Taragano FE, et al. Economic impact of dementia in developing countries: An evaluation of costs of Alzheimer-type in Argentina. *International Psychogeriatrics*. 2007; 19(4)
59. Custodio N. Vivir con demencia en Perú: ¿El sistema de salud está enfrentando la sobrecarga? *Rev Neuropsiquiatr*. 2016;79(1):1

60. Rojas G, Bartoloni L, Dillon C, Serrano CM, Iturry M, Allegri RF. Clinical and economic characteristics associated with direct costs of Alzheimer's, frontotemporal and vascular dementia in Argentina. *International Psychogeriatrics*. 2011; 23(4)
61. Custodio N, Lira D, Herrera-Perez E, Prado LN del, Parodi J, Guevara-Silva E, et al. Informal caregiver burden in middle-income countries Results from Memory Centers in Lima – Peru. *Dement Neuropsychol*. 2014;8(4)
62. Ley N°. 30020 – Ley que crea el plan nacional para la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. 2013, mayo 13
63. Ley N°. 30795 – Ley para la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. 2018, junio 18
64. Decreto Supremo N° 030-2018-SA – Decreto Supremo que aprueba el Reglamento de la Ley N° 30795, Ley para la Prevención y Tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias. 2018, diciembre 28
65. Ley N°. 30947 – Ley de Salud Mental. 2019, mayo 23
66. Decreto Supremo N° 007-2020-SA – Decreto Supremo que aprueba el Reglamento de la Ley N° 30947, Ley de Salud Mental. 2020, marzo 05
67. Comex: Perú gasta en salud por debajo del promedio en América Latina [Internet]. *Gestion.pe*. 2019. Disponible en : <https://gestion.pe/economia/comex-peru-gasta-salud-debajo-promedio-america-latina-268172-noticia/?ref=gesr>
68. Mitchell C. OPS/OMS | Invertir en salud universal es fundamental para el desarrollo de las Américas, afirmó la directora de la OPS [Internet]. *Pan American Health Organization / World Health Organization*. 2021. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11993:invertir-en-salud-universal-es-fundamental-para-el-desarrollo-de-las-americas&Itemid=135&lang=es
69. Mitchell C. OPS/OMS | Expertos buscan maneras de aumentar hasta al menos el 6% del PBI la inversión pública en salud para lograr la salud universal [Internet]. *Pan American Health Organization / World Health Organization*. 2021 Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11500:2015-experts-see-ways-to-boost-public-spending-on-health-to-achieve-sdg&Itemid=1926&lang=es
70. Mazzetti P, Inca-Martínez M, Tirado-Hurtado I, Milla-Neyra K, Silva-Paredes G, Vishnevetsky A, et al. Neurogenética en el Perú, ejemplo de investigación traslacional. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(4):787–93
71. Gianetto R, De Duve C. Tissue fractionation studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. *Biochem J*. 1955;59(3):433–8.
72. De Duve C. The lysosome. *JAMA J Am Med Assoc*. 1963;192(4):321–2.
73. De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. Vol. 28, *Annual review of physiology*. 1966. P. 435–92.
74. Klionsky DJ. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740–3.
75. Karanasis E, Ktistakis NT. Autophagy at the Cell, Tissue and Organismal Level. *Autophagy at the Cell, Tissue and Organismal Level*. 2016. 107 p.

76. Ktistakis NT. In praise of M. Anselmier who first used the term “autophagie” in 1859. *Autophagy*. 2017;13(12):2015–7.
77. Ren Y, Xie H, Shen H. Regulation of Autophagy by AMPK. En: *Autophagy and 67ase67ic676767* [Internet], ed. Por Wong E, 1ra ed. Boca Ratón: CRC Press; 2018. P. 4. Disponible en: <https://doi.org/10.1201/9781315120638>
78. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2016 [Internet]. NobelPrize.org. 2016. Disponible en: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2016/ohsumi/lecture/>
79. Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *J Biol Chem*. 2018;293(15):5414–24
80. Anabolismo. Diccionario de la lengua 67ase67ic67. (2021). Disponible en <https://dle.rae.es/anabolismo?m=form>
81. Catabolismo. Diccionario de la lengua 67ase67ic67. (2021). Disponible en <https://dle.rae.es/catabolismo?m=form>
82. Metabolismo. Diccionario de la lengua 67ase67ic67. (2021). Disponible en <https://dle.rae.es/metabolismo?m=form>
83. Bento CF, Renna M, Ghislat G, Puri C, Ashkenazi A, Vicinanza M, et al. Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annu Rev Biochem*. 2016;85:685–713.
84. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. Vol. 24, *Cell Research*. 2014. P. 9–23. <https://www.nature.com/articles/cr2013169>
85. Fernández ÁF, López-Otín C. The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *J Clin Invest*. 2015;125(1):33–41.
86. Pellacani C, Costa LG. Role of autophagy in environmental neurotoxicity. *Environ Pollut* [Internet]. 2018;235:791–805. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.102>
87. He B, Wang X, Yang C, Zhu J, Jin Y, Fu Z. The regulation of autophagy in the aniricide-induced toxicity: Angel or demon? [Internet]. Vol. 242, *Chemosphere*. Elsevier Ltd; 2020. P. 125138. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125138>
88. Fu Q, Lyu D, Zhang L, Qin Z, Tang Q, Yin H, et al. Airborne particulate matter (PM2.5) triggers autophagy in human corneal epithelial cell line. *Environ Pollut* [Internet]. 2017;227:314–22. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.078>
89. Deng X, Zhang F, Rui W, Long F, Wang L, Feng Z, et al. PM2.5-induced oxidative stress triggers autophagy in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2013;27(6):1762–70. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.004>
90. Lee KY, Chiang LL, Ho SC, Liu W Te, Chen TT, Feng PH, et al. Associations of autophagy with lung diffusion capacity and oxygen saturation in severe COPD: Effects of particulate air pollution. *Int J COPD*. 2016;11(1):1569–78.
91. Park SY, Byun EJ, Lee JD, Kim S, Kim HS. Air pollution, autophagy, and skin aging: Impact of particulate matter (PM10) on human dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9).
92. Bai KJ, Chuang KJ, Wu SM, Chang L Te, Chang TY, Ho KF, et al. Effects of diesel exhaust particles on the expression of tau and autophagy proteins in human neuroblastoma cells. *Environ Toxicol Pharmacol* [Internet].

- 2018;62(January):54–9. Disponible desde:
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.06.007>
93. Peters R, Ee N, Peters J, Booth A, Mudway I. Air Pollution and Dementia : A Systematic Review. *J Alzheimer’s Dis.* 2019;70.
 94. Barnhill LM, Khuansuwan S, Juarez D, Murata H, Araujo JA, Bronstein JM. Diesel exhaust extract exposure induces neuronal toxicity by disrupting autophagy. *Toxicol Sci.* 2020;176(1):193–202.
 95. Chuang H-C, Wu D, Kang J-H. Particulate air pollution and neurological diseases: The role of tauopathies. *Environ Dis.* 2018;3(1):4.
 96. Grande G, Ljungman PLS, Eneroth K, Bellander T, Rizzuto D. Association Between Cardiovascular Disease and Long-term Exposure to Air Pollution With the Risk of Dementia. 2020;77(7):801–9.
 97. Autophagy – Search Results – PubMed [Internet]. PubMed. 2021. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Autophagy&filter=dates.1000%2F1%2F1-1999%2F12%2F31&sort=date&sort_order=asc
 98. Autophagy – Search Results – PubMed [Internet]. PubMed. 2021. Disponible en <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=autophagy&filter=dates.2020%2F1%2F1-2020%2F12%2F31&sort=date>
 99. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, Abdellatif M, Abdoli A, Abel S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. Vol. 17, *Autophagy.* 2021. P. 1–382
 100. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011;469(7330):323–35.
 101. Zuleger T, Proikas-Cezanne T. Signal Regulation of WIPI Protein Function in Macroautophagy. En: *Autophagy and 68ase68ic686868* [Internet], ed. Por Wong E, 1ra ed. Boca Ratón: CRC Press; 2018. P. 25. Disponible en: <https://doi.org/10.1201/9781315120638>.
 102. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2008;182(4):685–701.
 103. Biazik J, Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL. Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy.* 2015;11(3):439–51.
 104. Kern A, Dikic I, Behl C, Gap RAB, Gtpase RAB. The integration of autophagy and 68ase68ic trafficking pathways via RAB GAPs. *Auto.* 2015;11(December):2393–7.
 105. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct.* 2002;27(6):421–9.
 106. Tesseraud S, Avril P, Bonnet M, Bonniet A, Cassar-Malek I, Chabi B, et al. Autophagy in farm animals: current knowledge and future challenges. *Autophagy* [Internet]. 2021 Aug 3;17(8):1809–27. Disponible desde: <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1798064>
 107. Suryawan A, Davis TA. Regulation of protein degradation pathways by amino acids and insulin in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Anim Sci Biotechnol* [Internet]. 2014 Dec 17;5(1):8. Disponible desde: <https://jasbsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/2049-1891-5-8>

108. Yin Z, Lian L, Zhu F, Zhang Z-H, Hincke M, Yang N, et al. The transcriptome landscapes of ovary and three oviduct segments during chicken (*Gallus gallus*) egg formation. *Genomics* [Internet]. 2020 Jan;112(1):243–51. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.02.003>
109. Herpin A, Lescat L, Bobe J, Jenny A, Seiliez I. Lighting chaperone-mediated autophagy (CMA) evolution with an ancient LAMP: the existence of a functional CMA activity in fish. *Autophagy* [Internet]. 2020 Oct 2;16(10):1918–20. Disponible desde: <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797344>
110. Lescat L, Véron V, Mourot B, Péron S, Chenais N, Dias K, et al. Chaperone-Mediated Autophagy in the Light of Evolution: Insight from Fish. Chang B, editor. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2020 Oct 1;37(10):2887–99. Disponible desde: <https://academic.oup.com/mbe/article/37/10/2887/5841670>
111. Lescat L, Herpin A, Mourot B, Véron V, Guiguen Y, Bobe J, et al. CMA restricted to mammals and birds: myth or reality? *Autophagy* [Internet]. 2018 Jul 3;14(7):1267–70. Disponible desde: <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1460021>
112. Yabu T, Imamura S, Mizusawa N, Touhata K, Yamashita M. Induction of Autophagy by Amino Acid Starvation in Fish Cells. *Mar Biotechnol* [Internet]. 2012 Aug 31;14(4):491–501. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10126-012-9432-9>
113. Jackson MP, Hewitt EW. Cellular proteostasis: Degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem*. 2016;60(2):173–80
114. Juste YR, Cuervo AM. Analysis of Chaperone-Mediated Autophagy. In: *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2019. P. 703–27. Disponible desde: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-8873-0_47
115. Albornoz A, Sequeira A, Rodríguez C, Budini M. Chaperone-mediated autophagy—mechanisms and disease role. In: Rothermel BA, Diwan A, editors. *Autophagy in Health and Disease* [Internet]. 2nd ed. Elsevier; 2022. P. 399–412. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128220030000048>
116. Agarraberes FA, Dice JF. A molecular chaperone complex at the 69ase69ic6969 membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* [Internet]. 2001 Jul 1;114(13):2491–9. Disponible desde: <https://journals.biologists.com/jcs/article/114/13/2491/34874/A-molecular-chaperone-complex-at-the-lysosomal>
117. Koga H, Martínez-Vicente M, Macian F, Verkhusha V V., Cuervo AM. A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy. *Nat Commun* [Internet]. 2011 Sep 12;2(1):386. Disponible desde: <http://www.nature.com/articles/ncomms1393>
118. Dong S, Aguirre-Hernandez C, Scrivo A, Eliscovich C, Arias E, Bravo-Cordero JJ, et al. Monitoring spatiotemporal changes in chaperone-mediated autophagy in vivo. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Dec 31;11(1):645. Disponible desde: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-14164-4>
119. Caballero B, Wang Y, Diaz A, Tasset I, Juste YR, Stiller B, et al. Interplay of pathogenic forms of human tau with different autophagic pathways. *Aging Cell* [Internet]. 2018 Feb;17(1):e12692. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.12692>

120. Auzmendi-Iriarte J, Matheu A. 70ase70ic7070 Chaperone-Mediated Autophagy in Brain Aging: Neurodegenerative Diseases and Glioblastoma. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2021 Jan 28;12(January):1–17. Disponible desde: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2020.630743/full>
121. Sirtori R, Riva C, Ferrarese C, Sala G. HSPA8 knock-down induces the accumulation of neurodegenerative disorder-associated proteins. *Neurosci Lett* [Internet]. 2020;736(July):135272. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135272>
122. Park J-S, Kim D-H, Yoon S-Y. Regulation of amyloid precursor protein processing by its KFERQ motif. *BMB Rep* [Internet]. 2016 Jun 30;49(6):337–43. Disponible desde: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1MBB7&py=2016&vnc=v49n6&sp=337>
123. Xu X, Sun Y, Cen X, Shan B, Zhao Q, Xie T, et al. Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. *Protein Cell* [Internet]. 2021 Oct 21;12(10):769–87. Disponible desde: <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00858-3>
124. Bauer PO, Goswami A, Wong HK, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, et al. Harnessing chaperone-mediated autophagy for the selective degradation of mutant huntingtin protein. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2010 Mar 28;28(3):256–63. Disponible desde: <http://www.nature.com/articles/nbt.1608>
125. Koga H, Martinez-Vicente M, Arias E, Kaushik S, Sulzer D, Cuervo AM. Constitutive Upregulation of Chaperone-Mediated Autophagy in Huntington's Disease. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Dec 14;31(50):18492–505. Disponible desde: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.3219-11.2011>
126. Qi L, Zhang X-D, Wu J-C, Lin F, Wang J, DiFiglia M, et al. The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Huntingtin Degradation. Li X-J, editor. *PloS One* [Internet]. 2012 Oct 11;7(10):e46834. Disponible desde: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046834>
127. Li Xi, Wang J. Maintenance of chaperone-mediated autophagy activity in cultured cells expressing mutant huntingtin. *Biomed Reports* [Internet]. 2014 Jul;2(4):529–32. Disponible desde: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2014.278>
128. Choi SH, Cho K. LAMP2A-mediated autophagy involved in Huntington's disease progression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2021 Jan;534:561–7. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.042>
129. Cao B-Y, Yang Y-P, Luo W-F, Mao C-J, Han R, Sun X, et al. Paeoniflorin, a potent natural compound, protects PC12 cells from MPP+ and acidic damage via autophagic pathway. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2010 Aug;131(1):122–9. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.009>
130. Xilouri M, Brekk OR, Landeck N, Pitychoutis PM, Papasilekas T, Papadopoulou-Daifoti Z, et al. Boosting chaperone-mediated autophagy in vivo mitigates α -synuclein-induced neurodegeneration. *Brain* [Internet]. 2013 Jul;136(7):2130–46. Disponible desde: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awt131>
131. Campbell P, Morris H, Schapira A. Chaperone-mediated autophagy as a therapeutic target for Parkinson disease. *Expert Opin Ther Targets* [Internet].

- 2018 Oct 3;22(10):823–32. Disponible desde:
<https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1517156>
132. Wu J-Z, Ardah M, Haikal C, Svanbergsson A, Diepenbroek M, Vaikath NN, et al. Dihydromyricetin and Salvianolic acid B inhibit 71ase71-synuclein aggregation and enhance chaperone-mediated autophagy. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2019 Dec 15;8(1):18. Disponible desde:
<https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-019-0159-7>
133. Kon M, Kiffin R, Koga H, Chapochnik J, Macian F, Varticovski L, et al. Chaperone-Mediated Autophagy Is Required for Tumor Growth. *Sci Transl Med* [Internet]. 2011 Nov 16;3(109):1–30. Disponible desde:
<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003182>
134. Hao Y, Kacal M, Ouchida AT, Zhang B, Norberg E, Vakifahmetoglu-Norberg H. Targetome 71ase71ic71 of chaperone-mediated autophagy in cancer cells. *Autophagy* [Internet]. 2019 Sep 2;15(9):1558–71. Disponible desde:
<https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1586255>
135. Andrade-Tomaz M, de Souza I, Rocha CRR, Gomes LR. The Role of Chaperone-Mediated Autophagy in Cell Cycle Control and Its Implications in Cancer. *Cells* [Internet]. 2020 Sep 22;9(9):2140. Disponible desde:
<https://www.mdpi.com/2073-4409/9/9/2140>
136. Rios J, Sequeira A, Albornoz A, Budini M. Chaperone Mediated Autophagy Substrates and Components in Cancer. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Feb 12;10(February):1–9. Disponible desde:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.614677/full>
137. Peng J, Han S, Chen Z, Yang J, Pei Y, Bao C, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates apoptosis and the proliferation of colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020 Feb;522(2):348–54. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.11.081>
138. Bonam, Ruff, Muller. HSPA8/HSC70 in Immune Disorders: A Molecular Rheostat that Adjusts Chaperone-Mediated Autophagy Substrates. *Cells* [Internet]. 2019 Aug 7;8(8):849. Disponible desde: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/849>
139. Qiao L, Wang H, Xiang L, Ma J, Zhu Q, Xu D, et al. Deficient Chaperone-Mediated Autophagy Promotes Lipid Accumulation in Macrophage. *J Cardiovasc Transl Res* [Internet]. 2021 Aug 13;14(4):661–9. Disponible desde:
<https://link.springer.com/10.1007/s12265-020-09986-3>
140. Rodríguez-Navarro JA, Kaushik S, Koga H, Dall'Armi C, Shui G, Wenk MR, et al. Inhibitory effect of dietary lipids on chaperone-mediated autophagy. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2012 Mar 20;109(12):E705–14. Disponible desde:
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.11130361091>. Ma SY, Sun KS, Zhang M, Zhou X, Zheng XH, Tian SY, et al. Disruption of Plin5 degradation by CMA causes lipid homeostasis imbalance in NAFLD. *Liver Int* [Internet]. 2020 Oct 7;40(10):2427–38. Disponible desde:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.14492>
141. Meneses-Salas E, García-Melero A, Blanco-Muñoz P, Jose J, Brenner M-S, Lu A, et al. Selective Degradation Permits a Feedback Loop Controlling Annexin A6 and Cholesterol Levels in Endolysosomes of NPC1 Mutant Cells. *Cells* [Internet].

- 2020 May 7;9(5):1152. Disponible desde: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1152>
142. Portovedo M, Reginato A, Miyamoto JÉ, Simino LA, Hakim MP, Campana M, et al. Lipid excess affects chaperone-mediated autophagy in hypothalamus. *Biochimie* [Internet]. 2020 Sep;176:110–6. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.06.008>
 143. Zhang T, Liu J, Shen S, Tong Q, Ma X, Lin L. SIRT3 promotes lipophagy and chaperon-mediated autophagy to protect hepatocytes against lipotoxicity. *Cell Death Differ* [Internet]. 2020 Jan 3;27(1):329–44. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/s41418-019-0356-z>
 144. Robert G, Jacquel A, Auberger P. Chaperone-Mediated Autophagy and Its Emerging Role in Hematological Malignancies. *Cells* [Internet]. 2019 Oct 16;8(10):1260. Disponible desde: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1260>
 145. Hosaka Y, Araya J, Fujita Y, Kuwano K. Role of chaperone-mediated autophagy in the pathophysiology including pulmonary disorders. *Inflamm Regen* [Internet]. 2021 Dec 1;41(1):29. Disponible desde: <https://inflammregen.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41232-021-00180-9>
 146. Schneider JL, Villarroya J, Diaz-Carretero A, Patel B, Urbanska AM, Thi MM, et al. Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell* [Internet]. 2015 Apr 23;14(2):249–64. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/accel.12310>
 147. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res* [Internet]. 2014 Jan 26;24(1):92–104. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.153>
 148. Xilouri M, Stefanis L. Chaperone mediated autophagy in aging: Starve to prosper. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2016 Dec;32:13–21. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163716301416>
 149. Dice JF, Chiang HL, Spencer EP, Backer JM. Regulation of 72ase72ic727272o f microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide. *J Biol Chem* [Internet]. 1986 May;261(15):6853–9. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819626943>
 150. Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, et al. Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PloS Biol* [Internet]. 2019;17(5):1–27. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3000301>
 151. Thompson LM, Aiken CT, Kaltenbach LS, Agrawal N, Illes K, Khoshnan A, et al. IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J Cell Biol* [Internet]. 2009 Dec 28;187(7):1083–99. Disponible desde: <https://rupress.org/jcb/article/187/7/1083/35759/IKK-phosphorylates-Huntingtin-and-targets-it-for>
 152. Quintavalle C, Di Costanzo S, Zanca C, Tasset I, Fraldi A, Incoronato M, et al. Phosphorylation-Regulated Degradation of the Tumor-Suppressor 72ase72ic PED by Chaperone-Mediated Autophagy in Lung Cancer Cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 2014 Oct;229(10):1359–68. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.24569>
 153. Park C, Suh Y, Cuervo AM. Regulated degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat Commun* [Internet]. 2015

- Nov 16;6(1):6823. Disponible desde:
<http://www.nature.com/articles/ncomms7823>
154. Kaushik S, Cuervo AM. AMPK-dependent phosphorylation of lipid droplet protein PLIN2 triggers its degradation by CMA. *Autophagy* [Internet]. 2016 Feb 1;12(2):432–8. Disponible desde:
<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2015.1124226>
155. Zhou J, Yang J, Fan X, Hu S, Zhou F, Dong J, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates proliferation by targeting RND3 in gastric cancer. *Autophagy* [Internet]. 2016 Mar 3;12(3):515–28. Disponible desde:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2015.1136770>
156. Lv L, Li D, Zhao D, Lin R, Chu Y, Zhang H, et al. Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tumor Growth. *Mol Cell*. 2011;42(6):719–30. Disponible desde
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276511003716>
157. Li L, Fang R, Liu B, Shi H, Wang Y, Zhang W, et al. Deacetylation of tumor-suppressor MST1 in Hippo pathway induces its degradation through HBXIP-elevated HDAC6 in promotion of breast cancer growth. *Oncogene* [Internet]. 2016 Aug 4;35(31):4048–57. Disponible desde:
<http://www.nature.com/articles/onc2015476>
158. Bonhoure A, Vallentin A, Martin M, Senff-Ribeiro A, Amson R, Telerman A, et al. Acetylation of translationally controlled tumor protein promotes its degradation through chaperone-mediated autophagy. *Eur J Cell Biol* [Internet]. 2017 Mar;96(2):83–98. Disponible desde:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933516301625>
159. Vasco Ferreira J, Rosa Soares A, Silva Ramalho J, Pereira P, Girao H. K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 11;5(1):10210. Disponible desde: <http://www.nature.com/articles/srep10210>
160. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. HSPA8/HSC70 chaperone protein. *Autophagy* [Internet]. 2013 Dec 5;9(12):1937–54. Disponible desde:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.26448>
161. Morozova K, Clement CC, Kaushik S, Stiller B, Arias E, Ahmad A, et al. Structural and Biological Interaction of hsc-70 Protein with Phosphatidylserine in Endosomal Microautophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Aug;291(35):18096–106. Disponible desde:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820321748>
162. Zuiderweg ERP, Hightower LE, Gestwicki JE. The remarkable multivalency of the Hsp70 chaperones. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2017 Mar 20;22(2):173–89. Disponible desde: <http://link.springer.com/10.1007/s12192-017-0776-y>
163. Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, et al. Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. *Curr Biol* [Internet]. 2010 Jan;20(2):143–8. Disponible desde:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982209020004>
164. Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, et al. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev Cell* [Internet].

- 2011 Jan;20(1):131–9. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580710005848>
165. Kriegenburg F, Ellgaard L, Hartmann-Petersen R. Molecular chaperones in targeting misfolded proteins for ubiquitin-dependent degradation. *FEBS J* [Internet]. 2012 Feb;279(4):532–42. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2011.08456.x>
166. Catarino S, Pereira P, Girão H. Molecular control of chaperone-mediated autophagy. Lane JD, Korolchuk VI, Murray JT, editors. *Essays Biochem* [Internet]. 2017 Dec 12;61(6):663–74. Disponible desde: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/61/6/663/78491/Molecular-control-of-chaperone-mediated-autophagy>
167. Chiang H, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF, Weinberger J, Baltimore D, et al. Fig. 1. A 73-kD 74ase74ic protein binds to Rnase. 1989;246(August):382–5. Disponible desde: www.sciencemag.org
168. Ferreira JV, Fofó H, Bejarano E, Bento CF, Ramalho JS, Girao H, et al. STUB1/CHIP is required for HIF1A degradation by chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2013 Sep 29;9(9):1349–66. Disponible desde: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.25190>
169. Stricher F, Macri C, Ruff M, Muller S. HSPA8/HSC70 chaperone protein. *Autophagy* [Internet]. 2013 Dec 5;9(12):1937–54. Disponible desde: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.26448>
170. Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Sep 15;28(18):5747–63. Disponible desde: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.02070-07>
171. Agarraberes FA, Terlecky SR, Dice JF. An Intralysosomal hsp70 Is Required for a Selective Pathway of Lysosomal Protein Degradation. *J Cell Biol* [Internet]. 1997 May 19;137(4):825–34. Disponible desde: <https://rupress.org/jcb/article/137/4/825/593/An-Intralysosomal-hsp70-Is-Required-for-a>
172. Gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee [Internet]. Genenames.org. 2021. Disponible desde: https://www.genenames.org/data/gene-symbol-report/#!/hgnc_id/HGNC:5241
173. HSPA8 – Heat shock cognate 71 kDa protein – Homo sapiens (Human) – HSPA8 gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2021 [citado el 6 de diciembre de 2021]. Disponible desde: <https://www.uniprot.org/uniprot/P11142>
174. Cuervo AM, Dice JF, Knecht E. A Population of Rat Liver Lysosomes Responsible for the Selective Uptake and Degradation of Cytosolic Proteins. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Feb;272(9):5606–15. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818412501>
175. Cuervo AM, Knecht E, Terlecky SR, Dice JF. Activation of a selective pathway of 74ase74ic7474 proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 1995 Nov 1;269(5):C1200–8. Disponible desde: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.1995.269.5.C1200>
176. Cuervo AM, Dice JF. Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J Cell Sci* [Internet]. 2000 Dec 15;113(24):4441–50. Disponible desde:

- <https://journals.biologists.com/jcs/article/113/24/4441/26357/Unique-properties-of-lamp2a-compared-to-other>
177. Kaushik S, Massey AC, Cuervo AM. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *EMBO J* [Internet]. 2006 Sep 6;25(17):3921–33. Disponible desde: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601283>
 178. LAMP2 – Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 – Homo sapiens (Human) – LAMP2 gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2021 [citado el 9 de diciembre de 2021]. Disponible desde: <https://www.uniprot.org/uniprot/P13473#P13473>
 179. Konecki DS, Foetisch K, Zimmer KP, Schlotter M, Konecki UL. An Alternatively Spliced 75ase75ic the Human Lysosome-Associated Membrane Protein-2 Gene Is Expressed in a Tissue-Specific Manner. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1995 Oct 13;215(2):757–67. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85725284>
 180. Fujiwara Y, Hase K, Wada K, Kabuta T. An Rnautophagy/Dnautophagy receptor, LAMP2C, possesses an arginine-rich motif that mediates RNA/DNA-binding. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015 May;460(2):281–6. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.025>
 181. Pérez L, McLetchie S, Gardiner GJ, Deffit SN, Zhou D, Blum JS. LAMP-2C Inhibits MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens by Disrupting Chaperone-Mediated Autophagy. *J Immunol* [Internet]. 2016 Mar 15;196(6):2457–65. Disponible desde: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1501476>
 182. Bandyopadhyay U, Sridhar S, Kaushik S, Kiffin R, Cuervo AM. Identification of Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol Cell* [Internet]. 2010 Aug;39(4):535–47. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510006143>
 183. Terasawa K, Kato Y, Ikami Y, Sakamoto K, Ohtake K, Kusano S, et al. Direct homophilic interaction of LAMP2A with the two-domain architecture revealed by site-directed photo-crosslinks and steric hindrances in mammalian cells. *Autophagy* [Internet]. 2021 Apr 14;00(00):1–19. Disponible desde: <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1911017>
 184. Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E. 75ase75ic7575 a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jun 20;275(35):27447–56. Disponible desde: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M001394200>
 185. Wing SS, Chiang HL, Goldberg AL, Dice JF. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver and heart, but not skeletal muscle, of fasted rats. *Biochem J* [Internet]. 1991 Apr 1;275(1):165–9. Disponible desde: <https://portlandpress.com/biochemj/article/275/1/165/27007/Proteins-containing-peptide-sequences-related-to>
 186. Chiang H-L, Terlecky SR, Plant CP, Dice JF. A Role for a 70-Kilodalton Heat Shock Protein in Lysosomal Degradation of Intracellular Proteins. *Science* (80-) [Internet]. 1989 Oct 20;246(4928):382–5. Disponible desde: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2799391>

187. Rout AK, Strub M-P, Piszczek G, Tjandra N. Structure of Transmembrane Domain of Lysosome-associated Membrane Protein Type 2^a (LAMP-2^a) Reveals Key Features for Substrate Specificity in Chaperone-mediated Autophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Dec;289(51):35111–23. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819560501>
188. Wilke S, Krausze J, Büsow K. Crystalline structure of the conserved domain of the DC 76ase76ic7676 associated membrane protein: implications for the 76ase76ic7676 glycoalyx. *BMC Biol* [Internet]. 2012 Dec 19;10(1):62. Disponible desde: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-10-62>
189. Arias E, Koga H, Diaz A, Mocholi E, Patel B, Cuervo AM. Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol Cell* [Internet]. 2015 Jul;59(2):270–84. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276515003974>
190. Cuervo AM. Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the 76ase76ic7676 receptor. *EMBO J* [Internet]. 2003 Jan 2;22(1):47–59. Disponible desde: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdg002>
191. Cuervo AM, Dice JF. Regulation of Lamp2a Levels in the Lysosomal Membrane. *Traffic* [Internet]. 2000 Jul;1(7):570–83. Disponible desde: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0854.2000.010707.x>
192. Kiffin R, Kaushik S, Zeng M, Bandyopadhyay U, Zhang C, Massey AC, et al. Altered dynamics of the 76ase76ic7676 receptor for chaperone-mediated autophagy with age. *J Cell Sci* [Internet]. 2007 Mar 1;120(5):782–91. Disponible desde: <https://journals.biologists.com/jcs/article/120/5/782/34384/Altered-dynamics-of-the-lysosomal-receptor-for>
193. Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov E V., et al. Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 Jan 2;118(2):777–8. Disponible desde: <http://content.the-jci.org/articles/view/32806>
194. Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow E-M, et al. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of 76ase76ic7676 processing. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 Nov 1;18(21):4153–70. Disponible desde: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddp367>
195. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* (80-) [Internet]. 2004 Aug 27;305(5688):1292–5. Disponible desde: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1101738>
196. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild Type α -Synuclein Is Degraded by Chaperone-mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Aug;283(35):23542–56. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M801992200>
197. Taylor JP, Brown RH, Cleveland DW. Decoding ALS: from genes to mechanism. *Nature* [Internet]. 2016 Nov 9;539(7628):197–206. Disponible desde: <http://www.nature.com/articles/nature20413>
198. Van Es MA, Hardiman O, Chio A, Al-Chalabi A, Pasterkamp RJ, Veldink JH, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* [Internet]. 2017 Nov

- 4;390(10107):2084–98. Disponible desde: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31287-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31287-4)
199. Panza F, Lozupone M, Seripa D, Daniele A, Watling M, Giannelli G, et al. Development of disease-modifying drugs for frontotemporal dementia spectrum disorders. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2020 Apr 23;16(4):213–28. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-020-0330-x>
200. TARDBP – TAR DNA-binding protein 43 – Homo sapiens (Human) – TARDBP gene & protein [Internet]. Uniprot.org. 2020. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q13148>
201. Fuentealba RA, Udan M, Bell S, Wegorzewska I, Shao J, Diamond MI, et al. Interaction with polyglutamine aggregates reveals a Q/N-rich domain in TDP-43. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Ago 20;285(34):26304–14. Disponible desde: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820595951>
202. Budini M, Romano V, Quadri Z, Buratti E, Baralle FE. TDP-43 loss of cellular function through aggregation requires additional structural determinants beyond its C-terminal Q/N prion-like domain. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2015 Ene 1;24(1):9–20. Disponible desde: <https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddu415>
203. Afroz T, Hock E-M, Ernst P, Foglieni C, Jambeau M, Gilhespy LAB, et al. Functional and 77ase77ic polymerization of the ALS-linked protein TDP-43 antagonizes its pathologic aggregation. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Dec 29;8(1):45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00062-0>
204. Floare M-L, Allen SP. Why TDP-43? Why Not? Mechanisms of Metabolic Dysfunction in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosci Insights* [Internet]. 2020 Ene 17;15:263310552095730. Disponible desde: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2633105520957302>
205. Ayala YM, De Conti L, Avendaño-Vázquez SE, Dhir A, Romano M, D’Ambrogio A, et al. TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *EMBO J* [Internet]. 2011 Ene 19;30(2):277–88. Disponible desde: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2010.310>
206. Cragnaz L, Romano V, Baralle FE. La agregación de TDP-43 como posible blanco terapéutico contra la Esclerosis Lateral Amiotrófica. *Acta Bioquim Clin Latinoam* [Internet]. 2016;50(4):649–55. Disponible desde: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53550527013.pdf>
207. Jackson MP, Hewitt EW. Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. Van Oosten-Hawle P, editor. *Essays Biochem* [Internet]. 2016 Oct 15;60(2):173–80. Disponible desde: <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/2/173/78290/Cellular-proteostasis-degradation-of-misfolded>
208. Jo M, Lee S, Jeon Y-M, Kim S, Kwon Y, Kim H-J. The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: integrating insights from clinical and experimental studies. *Exp Mol Med* [Internet]. 2020 Oct 13;52(10):1652–62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-020-00513-7>
209. Cordero Fernández KA. Análisis transcriptómico en un modelo celular de agregación de la proteína TDP-43 [Maestría]. Universidad Andrés Bello; 2019.
210. Cézard F. Biotecnología en 26 fichas. Editorial Acribia. ISBN: 978-84-200-1159-2.

211. Perera J, Torno A, García JL. Ingeniería genética. Volumen I. Preparación, análisis, manipulación y clonaje del DNA. Síntesis; 2002. 527 p.
212. Izquierdo Rojo M. Curso de genética molecular e ingeniería genética. 1^{ra} ed. Madrid: Pirámide; 2014.
213. HEK293 Cell Line. HEK293 Cell Line Origins, Cytogenetics, and Expression. [Internet]. Disponible en: <https://www.hek293.com>
214. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol [Internet]. 1977 Jul 1;36(1):59–74. Disponible desde: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-36-1-59>
215. Motulsky H. J. Equation: One phase decay. GraphPad Curve Fitting Guide. Disponible en: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/curve-fitting/reg_exponential_decay_1phase.htm
216. Moreno J, Ormeño F, Alfaro I, Budini M, 2018. Regulation of NF-H protein levels and celular localization by Chaperone Mediated Autophagy in a Motor Neuron cell line model. Presentación de poster.
217. Kaushik S, Juste YR, Lindenau K, Dong S, Macho-González A, Santiago-Fernández O, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates adipocyte differentiation. Sci Adv [Internet]. 2022 Nov 16;8(46):1–16. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abq2733>

ANEXOS

ANEXO I

Ensayo #1. Inducción TR y extracción proteica

Se realizó, en triplicado, el cultivo de las líneas celulares HEK-293-TDP-WT, HEK-293-Flp-In & HEK-293-12X en 6-well plate. Se tomaron muestras en los tiempos de inducción con tetraciclina (TR): 0h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h, luego se realizó la cuantificación proteica por BCA y luego se realizó el cálculo de carga por pocillo para realizar la electroforesis.

Tabla N°. 01. Distribución de la Curva de estándares en duplicado a 560 nanómetros (ηm)

STD	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS \bar{X}	DIL (μl)	BSA (μl)	CONCN
A	2.378	2.329	2.354	2.262	0	300	2000
B	1.781	1.909	1.845	1.754	125	375	1500
C	1.456	1.408	1.432	1.341	325	325	1000
D	1.108	1.165	1.137	1.045	175	175	750
E	0.785	0.825	0.805	0.714	325	325	500
F	0.474	0.472	0.473	0.382	325	325	250
G	0.288	0.275	0.282	0.190	325	325	125
H	0.113	0.119	0.116	0.025	400	100	25
I	0.091	0.092	0.092	0.000	400	0	0

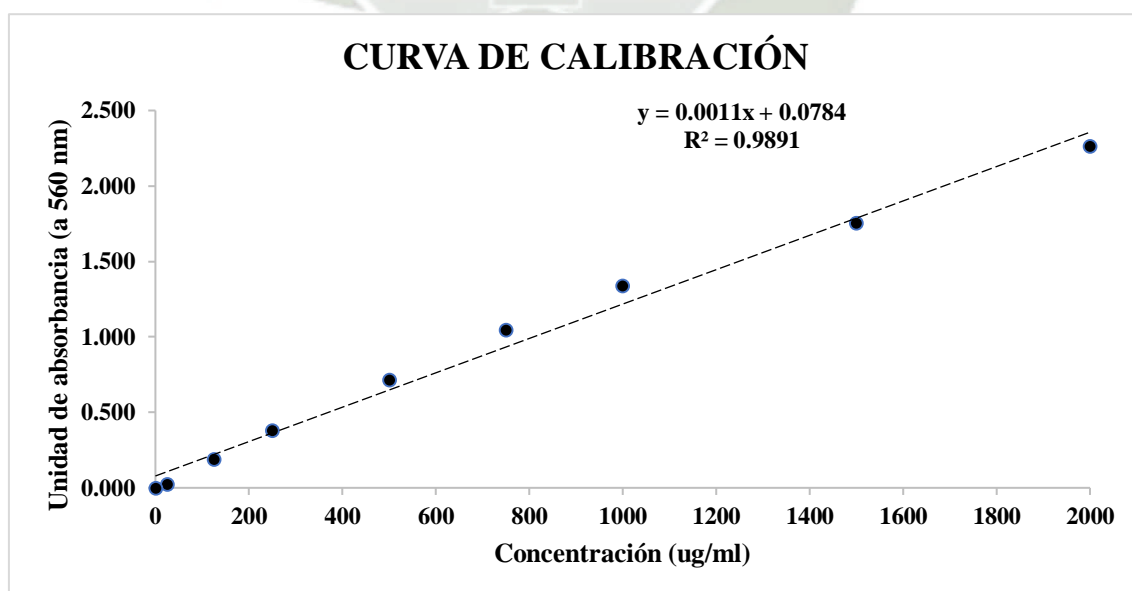


Figura N°. 01. Curva de calibración

Tabla N°. 02. Determinación de volumen para corrida de electroforesis

Muestras			Absorbancia ($\lambda=560$ nm)				CONCN		WB		
N	h	línea	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS \bar{X}	ug/ml	ug/ul	lisado (μ l)	LB 5X	Σ
1	0	1	0.415	0.394	0.405	0.313	213.273	1.066	9.4	4.7	14.1
1	6	1	0.343	0.301	0.322	0.231	138.273	0.691	14.5	7.2	21.7
1	12	1	0.790	0.698	0.744	0.653	521.909	2.610	3.8	1.9	5.7
1	24	1	0.543	0.475	0.509	0.418	308.273	1.541	6.5	3.2	9.7
1	48	1	0.549	0.482	0.516	0.424	314.182	1.571	6.4	3.2	9.5
1	72	1	0.550	0.589	0.570	0.478	363.273	1.816	5.5	2.8	8.3
1	0	2	0.587	0.593	0.590	0.499	381.909	1.910	5.2	2.6	7.9
1	6	2	2.295	1.624	1.960	1.868	1626.909	8.135	1.2	0.6	1.8
1	12	2	0.920	0.929	0.925	0.833	686.000	3.430	2.9	1.5	4.4
1	24	2	0.785	0.732	0.759	0.667	535.091	2.675	3.7	1.9	5.6
1	48	2	0.728	0.794	0.761	0.670	537.364	2.687	3.7	1.9	5.6
1	72	2	0.910	0.841	0.876	0.784	641.455	3.207	3.1	1.6	4.7
1	0	3	0.380	0.360	0.370	0.279	181.909	0.910	11.0	5.5	16.5
1	6	3	0.334	0.358	0.346	0.255	160.091	0.800	12.5	6.2	18.7
1	12	3	0.665	0.688	0.677	0.585	460.545	2.303	4.3	2.2	6.5
1	24	3	0.398	0.390	0.394	0.303	203.727	1.019	9.8	4.9	14.7
1	48	3	0.443	0.442	0.443	0.351	247.818	1.239	8.1	4.0	12.1
1	72	3	0.430	0.424	0.427	0.336	233.727	1.169	8.6	4.3	12.8
2	0	1	0.362	0.345	0.354	0.262	166.909	0.835	12.0	6.0	18.0
2	6	1	0.287	0.277	0.282	0.191	101.909	0.510	19.6	9.8	29.4
2	12	1	0.593	0.579	0.586	0.495	378.273	1.891	5.3	2.6	7.9
2	24	1	0.260	0.292	0.276	0.185	96.455	0.482	20.7	10.4	31.1
2	48	1	0.331	0.313	0.322	0.231	138.273	0.691	14.5	7.2	21.7
2	72	1	0.521	0.531	0.526	0.435	323.727	1.619	6.2	3.1	9.3
2	0	2	0.689	0.773	0.731	0.640	510.091	2.550	3.9	2.0	5.9
2	6	2	0.366	0.402	0.384	0.293	194.636	0.973	10.3	5.1	15.4
2	12	2	0.799	0.897	0.848	0.757	616.455	3.082	3.2	1.6	4.9
2	24	2	0.605	0.662	0.634	0.542	421.455	2.107	4.7	2.4	7.1
2	48	2	0.712	0.761	0.737	0.645	515.091	2.575	3.9	1.9	5.8
2	72	2	0.822	0.796	0.809	0.718	581.000	2.905	3.4	1.7	5.2
2	0	2	0.398	0.406	0.402	0.311	211.000	1.055	9.5	4.7	14.2
2	6	3	0.299	0.342	0.321	0.229	136.909	0.685	14.6	7.3	21.9
2	12	3	0.612	0.603	0.608	0.516	397.818	1.989	5.0	2.5	7.5
2	24	3	0.374	0.366	0.370	0.279	181.909	0.910	11.0	5.5	16.5
2	48	3	0.390	0.407	0.399	0.307	207.818	1.039	9.6	4.8	14.4
2	72	3	0.459	0.509	0.484	0.393	285.545	1.428	7.0	3.5	10.5
3	0	1	0.311	0.341	0.326	0.235	141.909	0.710	14.1	7.0	21.1
3	6	1	0.307	0.221	0.264	0.173	85.545	0.428	23.4	11.7	35.1
3	12	1	0.403	0.426	0.415	0.323	222.364	1.112	9.0	4.5	13.5
3	24	1	0.418	0.407	0.413	0.321	220.545	1.103	9.1	4.5	13.6

Tabla N°. 02. Determinación de volumen para corrida de electroforesis (continuación)

Muestras			Absorbancia ($\lambda=560$ nm)				CONCN		WB		
N	h	línea	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS \bar{X}	ug/ml	ug/ul	lisado (μ l)	LB 5X	Σ
3	48	1	0.339	0.340	0.340	0.248	154.182	0.771	13.0	6.5	19.5
3	72	1	0.373	0.395	0.384	0.293	194.636	0.973	10.3	5.1	15.4
3	0	2	0.460	0.408	0.434	0.343	240.091	1.200	8.3	4.2	12.5
3	6	2	0.679	0.749	0.714	0.623	494.636	2.473	4.0	2.0	6.1
3	12	2	0.656	0.720	0.688	0.597	471.000	2.355	4.2	2.1	6.4
3	24	2	0.648	0.608	0.628	0.537	416.455	2.082	4.8	2.4	7.2
3	48	2	0.747	0.785	0.766	0.675	541.909	2.710	3.7	1.8	5.5
3	72	2	0.816	0.821	0.819	0.727	589.636	2.948	3.4	1.7	5.1
3	0	2	0.554	0.531	0.543	0.451	338.727	1.694	5.9	3.0	8.9
3	6	3	0.309	0.327	0.318	0.227	134.636	0.673	14.9	7.4	22.3
3	12	3	0.852	0.955	0.904	0.812	666.909	3.335	3.0	1.5	4.5
3	24	3	0.342	0.380	0.361	0.270	173.727	0.869	11.5	5.8	17.3
3	48	3	0.340	0.357	0.349	0.257	162.364	0.812	12.3	6.2	18.5
3	72	3	0.484	0.443	0.464	0.372	266.909	1.335	7.5	3.7	11.2



Ensayo #2. Inducción TR y extracción proteica

Se realizó, en triplicado, el cultivo de las líneas celulares HEK-293-TDP-Wt, HEK-293-QD/AAAA, HEK-293-QV/AAA, y HEK-293 QD/AAA + QV/AAA en 6-well plate. Se tomaron muestras en los tiempos de inducción con tetraciclina (TR): 0h, 6h, 12h, 24h, 48h y 72h y luego se realizó la cuantificación proteica por BCA.

Tabla N°. 03. Distribución de la Curva de estándares en duplicado a 560 nanómetros (nm)

STD	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS	DIL (µl)	BSA (µl)	CONCN
A	1.899	1.890	1.895	1.803	0	300	2000
B	1.519	1.500	1.510	1.418	125	375	1500
C	1.134	1.137	1.136	1.044	325	325	1000
D	0.909	0.948	0.929	0.837	175	175	750
E	0.688	0.700	0.694	0.602	325	325	500
F	0.420	0.406	0.413	0.321	325	325	250
G	0.192	0.194	0.193	0.101	325	325	125
H	0.121	0.119	0.120	0.028	400	100	25
I	0.091	0.093	0.092	0.000	400	0	0

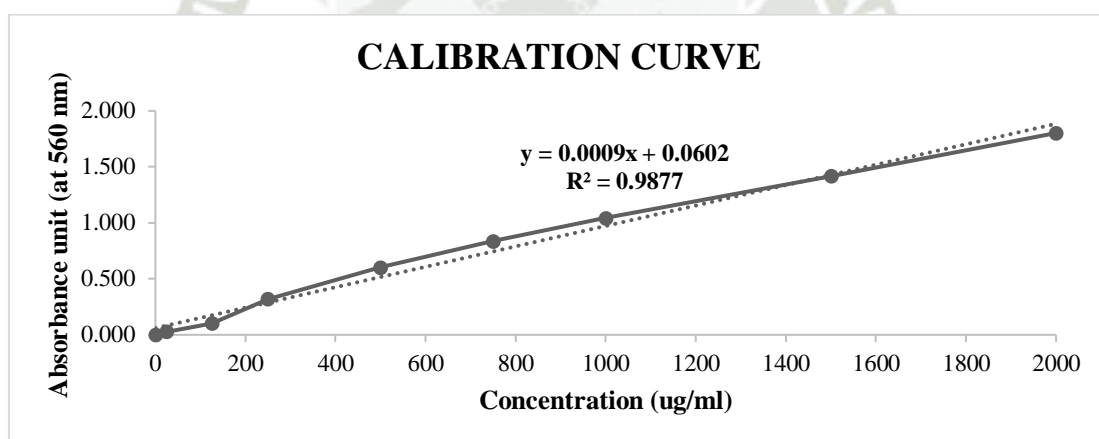


Figura N°. 02. Curva de calibración

Tabla N°. 04. Determinación de volumen para corrida de electroforesis

Muestras			Absorbancia ($\lambda=560$ nm)				CONCN		WB		
N	línea	h	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS	ug/ml	ug/ul	lisado (μ l)	LB 5X	Σ
1	WT	0	0.302	0.308	0.305	0.213	169.778	0.849	11.8	5.9	17.7
1	WT	6	0.374	0.417	0.396	0.304	270.333	1.352	7.4	3.7	11.1
1	WT	12	0.390	0.402	0.396	0.304	270.889	1.354	7.4	3.7	11.1
1	WT	24	0.454	0.425	0.440	0.348	319.222	1.596	6.3	3.1	9.4
1	WT	48	0.718	0.747	0.733	0.641	644.778	3.224	3.1	1.6	4.7
1	WT	72	0.977	0.770	0.874	0.782	801.444	4.007	2.5	1.2	3.7
1	2M	0	0.387	0.429	0.408	0.316	284.222	1.421	7.0	3.5	10.6
1	2M	6	0.479	0.423	0.451	0.359	332.000	1.660	6.0	3.0	9.0
1	2M	12	0.536	0.506	0.521	0.429	409.778	2.049	4.9	2.4	7.3
1	2M	24	0.440	0.408	0.424	0.332	302.000	1.510	6.6	3.3	9.9
1	2M	48	0.606	0.570	0.588	0.496	484.222	2.421	4.1	2.1	6.2
1	2M	72	0.919	0.920	0.920	0.828	852.556	4.263	2.3	1.2	3.5
1	QD	0	0.709	0.701	0.705	0.613	614.222	3.071	3.3	1.6	4.9
1	QD	6	0.664	0.756	0.710	0.618	619.778	3.099	3.2	1.6	4.8
1	QD	12	0.803	0.764	0.784	0.692	701.444	3.507	2.9	1.4	4.3
1	QD	24	0.811	0.896	0.854	0.762	779.222	3.896	2.6	1.3	3.8
1	QD	48	1.010	1.143	1.077	0.985	1027.000	5.135	1.9	1.0	2.9
1	QD	72	1.243	1.251	1.247	1.155	1216.444	6.082	1.6	0.8	2.5
1	QV	0	0.585	0.608	0.597	0.505	493.667	2.468	4.1	2.0	6.1
1	QV	6	0.644	0.698	0.671	0.579	576.444	2.882	3.5	1.7	5.2
1	QV	12	0.824	0.843	0.834	0.742	757.000	3.785	2.6	1.3	4.0
1	QV	24	0.785	0.825	0.805	0.713	725.333	3.627	2.8	1.4	4.1
1	QV	48	0.954	1.102	1.028	0.936	973.111	4.866	2.1	1.0	3.1
1	QV	72	1.171	1.245	1.208	1.116	1173.111	5.866	1.7	0.9	2.6



ANEXO II

Cuantificación de bandas para lotes TDP-43 WT

En el *Western blot*, la densitometría sirve para cuantificar la cantidad de proteína que se encuentra en una determinada banda revelada en una película de nitrocelulosa o una membrana de difluoruro de polivinilideno (*polyvinylidene difluoride*, PVDF). Se tienen algunos productos software que ejecutan la tarea en cuestión, pero en esta tesis se empleó Fiji que es un paquete de procesamiento de imágenes de código abierto basado en ImageJ.



Tabla N°. 01. Cuantificación de proteína Flag por densitometría. En la tabla se muestra las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 WT.

WT					WT N3					WT N4				
T	FLAG	ACT	Ratio	%	Time	Flag	Actin	Ratio	%	Time	Flag	Actin	Ratio	%
0	15,866,823	21750380	0.729496358	100.0	0	11,837,409	6,183,075	1.9145	100.0	0	19,059,966	17,818,480	1.0697	100.0
6	23,204,329	22015966	1.053977327	144.5	6	13,850,823	12,032,924	1.1511	60.1	6	14,297,652	16,053,702	0.8906	83.3
12	8,549,790	18207551	0.46957386	64.4	12	7,650,560	10,549,560	0.7252	37.9	12	11,220,823	17,861,137	0.6282	58.7
24	5,254,870	16444309	0.319555537	43.8	24	2,708,983	4,334,296	0.6250	32.6	24	8,600,974	16,807,702	0.5117	47.8
48	6,112,770	13105480	0.466428547	63.9	48	1,146,598	5,978,953	0.1918	10.0	48	789,749	11,642,217	0.0678	6.3
72	8443083	10539459	0.801092637	109.8	72	2,190,447	11,197,338	0.1956	10.2	72	496,263	3,260,569	0.1522	14.2
WT N5					WT N6					WT N7				
Time	Flag	Actin	Ratio	%	Time	Flag	Actin	Ratio	%	Time	Flag	Actin	Ratio	%
0	22,257,593	2,306,719	9.6490	100.0	0	13,578,986	12,829,702	1.0584	100.0	0	28,195,614	17,409,773	1.6195	100.0
6	23,736,078	4,513,075	5.2594	54.5	6	12,768,865	13,853,723	0.9217	87.1	6	21,962,593	19,886,187	1.1044	68.2
12	20,471,785	2,483,376	8.2435	85.4	12	6,386,803	15,425,723	0.4140	39.1	12	18,633,986	16,810,359	1.1085	68.4
24	15,121,572	5,187,660	2.9149	30.2	24	4,202,368	21,000,915	0.2001	18.9	24	14,311,673	20,565,602	0.6959	43.0
48	11,750,087	7,946,267	1.4787	15.3	48	1,980,619	19,181,137	0.1033	9.8	48	14,826,673	21,250,723	0.6977	43.1
72	10,322,551	12,622,945	0.8178	8.5	72	2,091,497	16,384,137	0.1277	12.1	72	3,993,296	25,385,380	0.1573	9.7

Tabla N°. 02. Cuantificación de proteína Flag en HEK293 TDP-43 WT. En la tabla se muestra un resumen de las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 WT.

HEK-293 TDP-43 WT						
T	N1	N2	N3	N4	N5	N6
0	100	100	100	100	100	100
6	144	60	83	55	87	68
12	64	38	59	85	39	68
24	44	33	48	30	19	43
48	64	10	6	15	10	43
72	110	10	14	8	12	10

Tabla N°. 03. Cuantificación de proteína Flag por densitometría. En la tabla se muestra las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 QV.

QV				RLP					
T	ACT	FLAG	Av Rel Den	FOLD	T	FLAG	ACT	Ratio	%
0	8298.619	10430.468	1.25689202	100	0	22617.276	13984.309	1.617332397	100
6	3942.548	10264.175	2.603436914	207.1329018	6	17977.912	13043.016	1.378355436	85.22400453
12	9534.669	3180.033	0.333523167	26.53554653	12	19306.154	19329.773	0.998778103	61.75465873
24	9645.426	93.95	0.009740368	0.774956637	24	17359.569	17788.48	0.975888272	60.3393757
48	9214.548	5342.861	0.579828875	46.1319561	48	9141.447	10813.217	0.845395686	52.27099185
72	5015.891	7284.983	1.452380644	115.5533348	72	14057.054	7053.426	1.992939885	123.2238894
T	FLAG	ACT	Av Rel Den	FOLD	T	FLAG	ACT	Ratio	%
0	9,710,924	8,446,631	1.149680151	100	0	19991.347	7093.083	2.818428461	100
6	16,350,430	9,787,409	1.67055755	145.3062879	6	13352.64	9400.74	1.4203818	50.39623392
12	7,206,924	8,165,338	0.882624087	76.77127303	12	17161.296	12767.154	1.34417553	47.69237713
24	15,019,602	13,837,602	1.085419425	94.41055619	24	22691.489	11804.69	1.922243532	68.20267248
48	11,802,581	16,472,087	0.716520074	62.32342742	48	21849.832	8768.205	2.491939	88.41590393
72	7,659,711	21,726,037	0.352559052	30.66583792	72	20944.267	6427.619	3.258479851	115.6133603
T	FLAG	ACT	RATIO	%					
0	13548.054	8600.69	1.575228732	100					
6	17558.539	14687.004	1.195515369	75.89471577					
12	22064.468	19825.953	1.112908318	70.65058523					
24	16785.296	21686.368	0.774002175	49.13585941					
48	18912.711	12918.811	1.463966846	92.93677909					
72	21355.347	14304.64	1.492896501	94.77331582					

Tabla N°. 04. Cuantificación de proteína Flag en HEK293 TDP-43 WT. En la tabla se muestra un resumen de las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 WT.

HEK-293 TDP-QV/AA					
Time	N1	N2	N3	N4	N5
0	100	100	100	100	100
6	207	145	76	85	50
12	27	77	71	62	48
24	1	94	49	60	68
48	46	62	93	52	88
72	116	31	95	123	116

Tabla N°. 03. Cuantificación de proteína Flag por densitometría. En la tabla se muestra las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 QD.

QD					QD	Hoja 3		
T	FLAG	ACT	Av Rel Den	RLP	T	FLAG	ACT	Av Rel Den
0	10155.104	6750.305	1.504391876	100.0	0	10434.598	7136.426	1.462160191
6	6949.518	3227.477	2.153235484	143.1	6	9402.305	8966.962	1.048549665
12	6951.518	6780.477	1.025225511	68.1	12	10017.598	11243.305	0.89098339
24	7194.811	8545.062	0.841984646	56.0	24	9087.841	9482.255	0.958405042
48	6685.69	8124.477	0.822907124	54.7	48	8096.477	6984.77	1.159161576
72	5291.154	9585.477	0.551996943	36.7	72	6715.234	7475.305	0.89832241
QD N2					QD N3			
Time	Flag	Actin	Ratio	%	Time	Flag	Actin	Ratio
0	19,273,128	30,711,827	0.627547427	100.0	0	5,901,146	28,065,108	0.2103
6	19,154,451	28,470,856	0.672773976	107.2	6	5,505,903	27,816,543	0.1979
12	21,102,037	23,912,250	0.882478102	140.6	12	8,671,045	29,756,078	0.2914
24	8,565,459	21,966,593	0.389931156	62.1	24	1,110,598	28,344,300	0.0392
48	10,224,874	23,351,149	0.437874556	69.8	48	946,820	29,549,300	0.0320
72	5,615,024	21,705,028	0.258696925	41.2	72	2,324,983	28,433,250	0.0818

Tabla N°. 03. Cuantificación de proteína Flag por densitometría. En la tabla se muestra las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 QD (continuación).

QD N1									
Time	Flag	Actin	Ratio	FOLD					
0	23,488,693	30,061,442	0.781356164	100					
6	21,178,451	29,157,170	0.726354821	93.0					
12	16,565,794	28,904,584	0.573119959	73.3					
24	1,758,205	31,644,685	0.055560831	7.1					
48	1,049,062	35,295,706	0.029722086	3.8					
72	780,749	32,130,321	0.024299446	3.1					
QD N4					QD				
Time	Flag	Actin	Ratio	FOLD	T	FLAG	ACT	Ratio	FOLD
0	21,198,279	32,331,350	0.6557	100.0	0	23811.054	22502.933	1.058131133	100.0
6	18,537,329	25,977,401	0.7136	108.8	6	16337.539	27613.933	0.591641147	55.9
12	12,809,187	23,046,037	0.5558	84.8	12	12458.054	29935.225	0.416167041	39.3
24	13,298,602	23,517,108	0.5655	86.2	24	10719.761	29196.225	0.36716257	34.7
48	2,796,518	25,047,593	0.1116	17.0	48	6321.276	22635.983	0.279257852	26.4
72	1,079,406	25,359,543	0.0426	6.5	72	10147.711	21427.518	0.473583128	44.8

Tabla N°. 04. Cuantificación de proteína Flag en HEK293 TDP-43 WT. En la tabla se muestra un resumen de las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP-43 QD.

HEK-293 TDP-43 QD							
Time	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
0	100	100	100	100	100	100	100
6	143	72	93	107	94	109	56
12	68	61	73	141	139	85	39
24	56	66	7	62	19	86	35
48	55	79	4	70	15	17	26
72	37	61	3	41	39	6	45

Tabla N°. 05. Cuantificación de proteína Flag por densitometría. En la tabla se muestra las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP QV+QD.

Time	Flag	Actin	Ratio	%	Flag	Actin	Ratio	%
0	8133.841	5105.719	1.593084343	100	20,946,744	22,337,865	0.9377	100
6	9646.719	6779.891	1.422842786	89	23,860,643	24,215,865	0.9853	105
12	11579.305	9340.134	1.239736496	78	6,093,317	22,587,501	0.2698	29
24	8924.477	10519.891	0.848343105	53	6,361,489	21,052,966	0.3022	32
48	8901.062	10681.891	0.83328523	52	1,352,506	21,181,794	0.0639	7
72	7312.305	8960.012	0.816104376	51	1,330,678	24,063,451	0.0553	6

Time	Flag	Actin	Ratio	%	Flag	Actin	Ratio	%	Flag	Actin	Ratio	%
0	26,893,815	24,293,501	1.1070	100	26,331,179	24,449,258	1.0770	100	23,269,350	27,111,966	0.8583	100
6	25,584,057	23,460,673	1.0905	99	33,096,685	26,846,501	1.2328	114	25,992,836	25,640,380	1.0137	118
12	10,517,338	23,942,794	0.4393	40	9,284,894	26,319,329	0.3528	33	1,532,912	24,198,087	0.0633	7
24	5,416,075	23,057,380	0.2349	21	5,342,903	24,660,258	0.2167	20	1,284,163	21,356,723	0.0601	7
48	2,075,506	21,720,087	0.0956	9	3,240,548	27,918,915	0.1161	11	840,335	21,639,380	0.0388	5
72	1,203,435	20,421,844	0.0589	5	1,430,506	25,051,622	0.0571	5	362,385	22,236,915	0.0163	2

Tabla N°. 06. Cuantificación de proteína Flag en HEK293 TDP-43 WT. En la tabla se muestra un resumen de las concentraciones de la proteína Flag según las horas de cosecha o de lavado post-inducción de TDP-43 con tetraciclina en la línea celular HEK293 TDP QV+QD.

HEK-293 TDP-QV/AA+QD/AA					
Time	N1	N2	N3	N4	N5
0	100	100	100	100	100
6	89	105	99	114	118
12	78	29	40	33	7
24	53	32	21	20	7
48	52	7	9	11	5
72	51	6	5	5	2

ANEXO III

Degradación de TDP-43

HEK293 TDP-WT vs HEK293 Δ KFERQ

24 horas

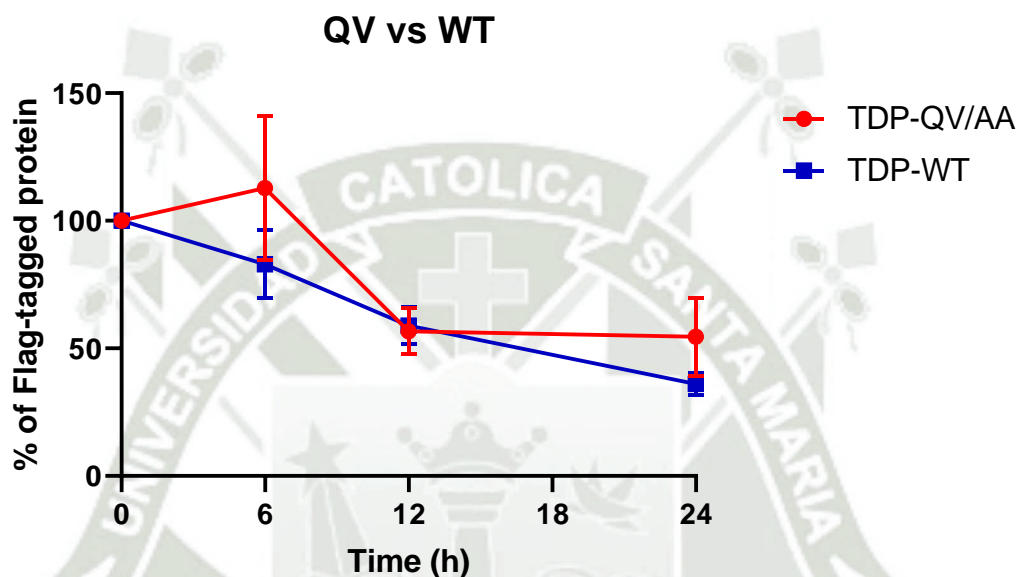


Figura N°. 01. Disminución de Flag-TDP-43. Luego de terminar la inducción de TDP-43 por tetraciclina en cultivos celulares de las líneas HEK293 TDP-43 WT y HEK293 TDP-QV/AA, se hizo una colecta o cosecha pasadas las primeras 24 h. Viéndose que la cepa silvestre degradaba el 50% de TDP-43 a las 12 horas post-inducción y, al cabo de las 24 h, la degradación de TDP-43 permanecía igual en ambas líneas o era mayor en la wild type que en la mutante TDP-QV/AA. Se observó un repunte o repique de producción de TDP-43 a las 6 h en HEK293 TDP-QV/AA, pero no se explica el porqué, ya que no hubo inducción con tetraciclina.

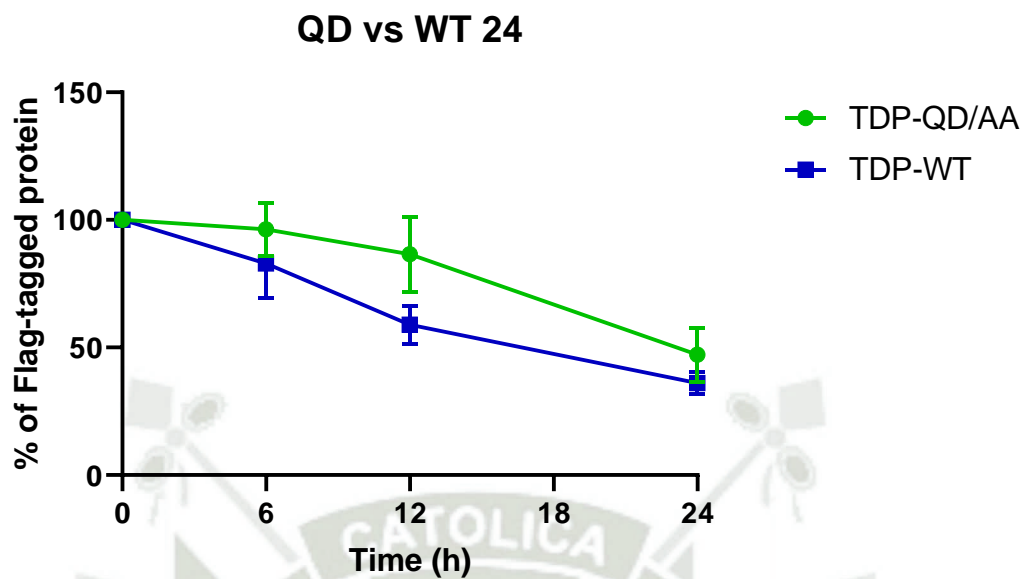


Figura N°. 02. Disminución de Flag-TDP-43. Luego de terminar la inducción de TDP-43 por tetraciclina en cultivos celulares de las líneas HEK293 TDP-43 WT y HEK293 TDP-QV/AA+QD/AA, se hizo una colecta o cosecha pasadas las primeras 24 h. Viéndose que la cepa silvestre degradaba a TDP-43 más que en la doble mutante TDP-QV/AA+QD/AA.

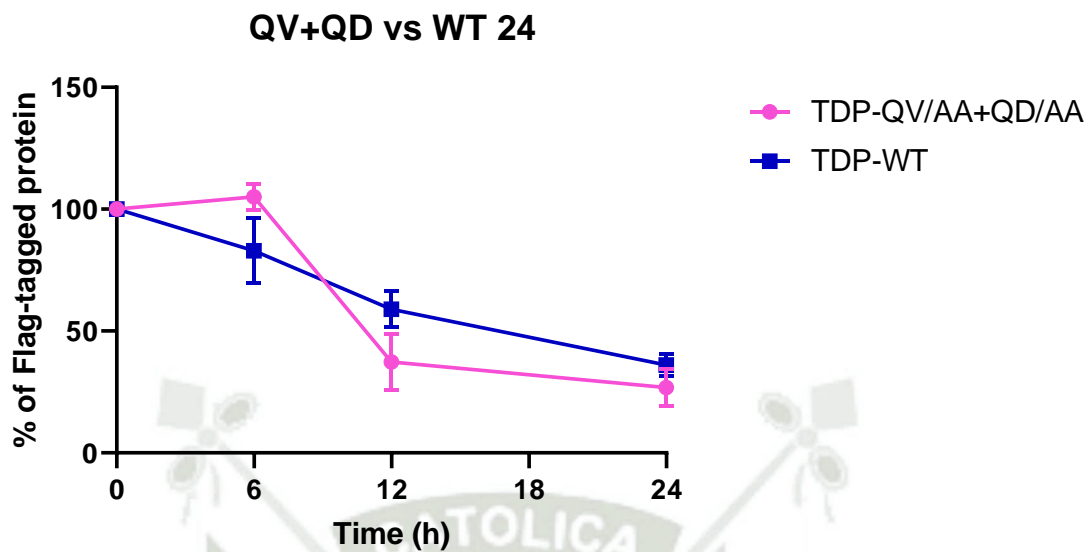


Figura N°. 03. Disminución de Flag-TDP-43. Luego de terminar la inducción de TDP-43 por tetraciclina en cultivos celulares de las líneas HEK293 TDP-43 WT y HEK293 TDP-QV/AA+QD/AA, se hizo una colecta o cosecha pasadas las primeras 24 h. Viéndose un despegue de producción de TDP-43 a las 6h, sin explicación alguna, pues la inducción ya se había detenido al lavar el medio para dejar sin tetraciclina; hasta las 6 h, la cepa wild type degradó más que la doble mutante, pero, a partir de ese momento y hasta el final del ensayo, la doble mutante mostró una degradación de TDP-43 mayor a la de la cepa silvestre.

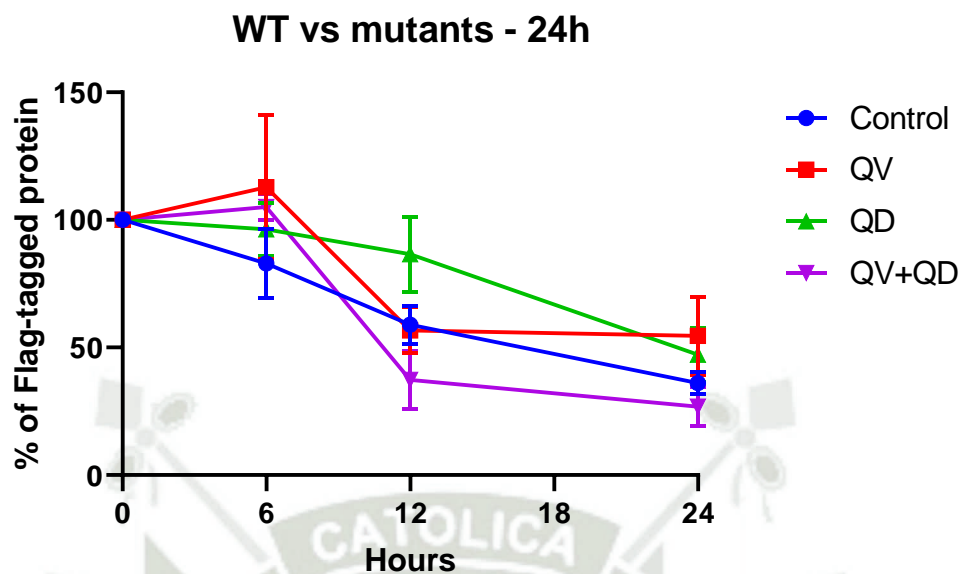


Figura N°. 04. Disminución de Flag-TDP-43. En esta gráfica se agrupan todos los desempeños de las cuatro líneas celulares respecto a la degradación de la proteína TDP-43 cuya sobre-expresión fue conseguida por la adición de tetraciclina al medio de cultivo. La evidencia indica que el mejor desempeño fue el de la línea celular HEK293 TDP-QV/AA+QD/AA, seguida de la *wild-type*, HEK293 TDP-43, siguiendo la HEK293 TDP-QD/AA y finalizando con HEK293 TDP-QV/AA. Además, se observa como las mutantes QV y QD tienden a sobre-producir TDP-43 a las 6 horas sin recibir inducción alguna.

HEK293 TDP-WT vs HEK293 Δ KFERQ

Entre 24 y 72 horas

QV vs WT 72

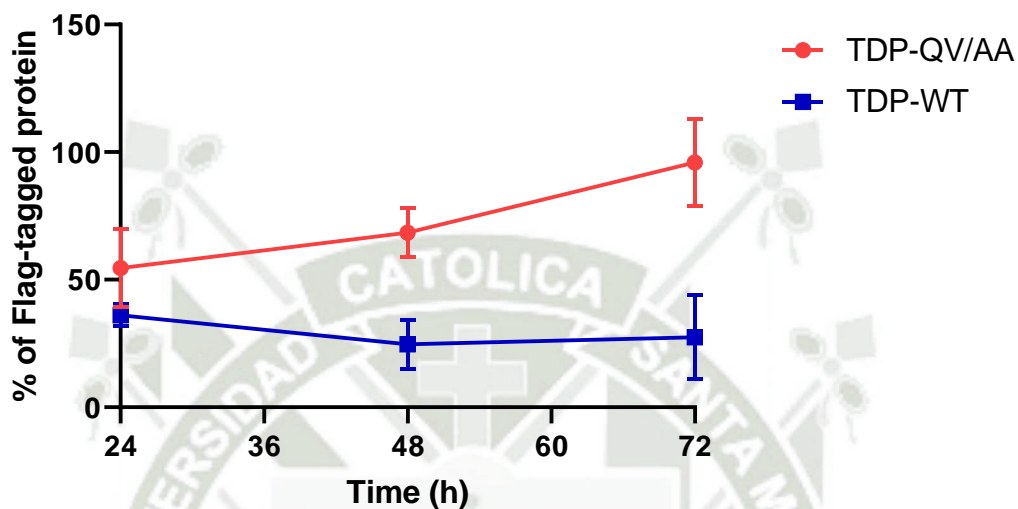


Figura N°. 05. Disminución de Flag-TDP-43. En la gráfica se ve el comportamiento de la degradación de TDP-43 entre las 24 h y las 72 h post lavado del medio para retirar la tetraciclina. Viéndose que la cepa silvestre continua degradando TDP-43 hasta las 72 h, aunque con un ligero incremento de TDP-43 entre las 48 h y 72 h, mientras que HEK293 TDP-QV/AA se comporta anormalmente y comienza a incrementar su nivel de TDP-43 sin explicación alguna.

QD vs WT 72

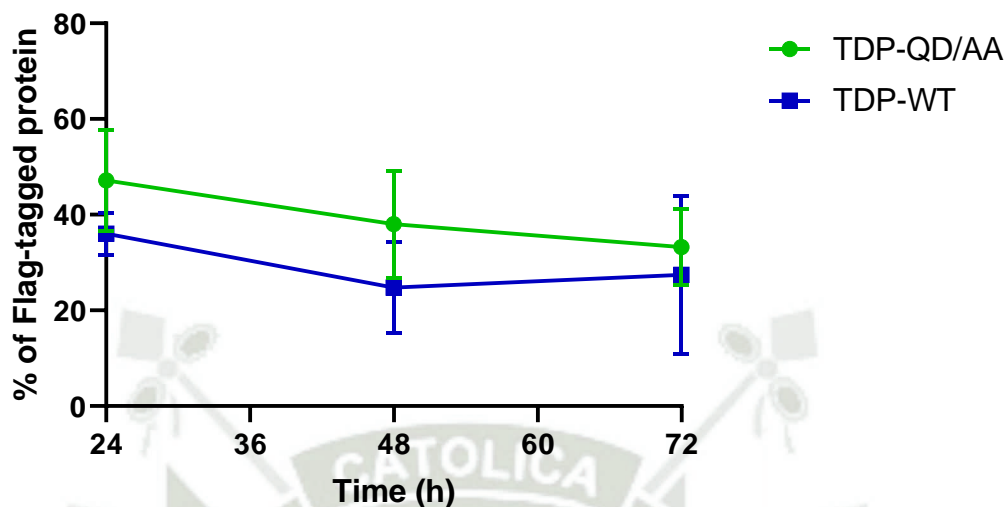


Figura N°. 06. Disminución de Flag-TDP-43. Respecto a HEK293 TDP-QD/AA y HEK293 TDP-43 WT, vemos que ambas continúan degradando TDP-43 hasta las 72 h, aunque WT presenta un incremento entre las 48 h y las 72 h; se observa que hay un mejor desempeño de la cepa silvestre en la degradación de TDP-43.

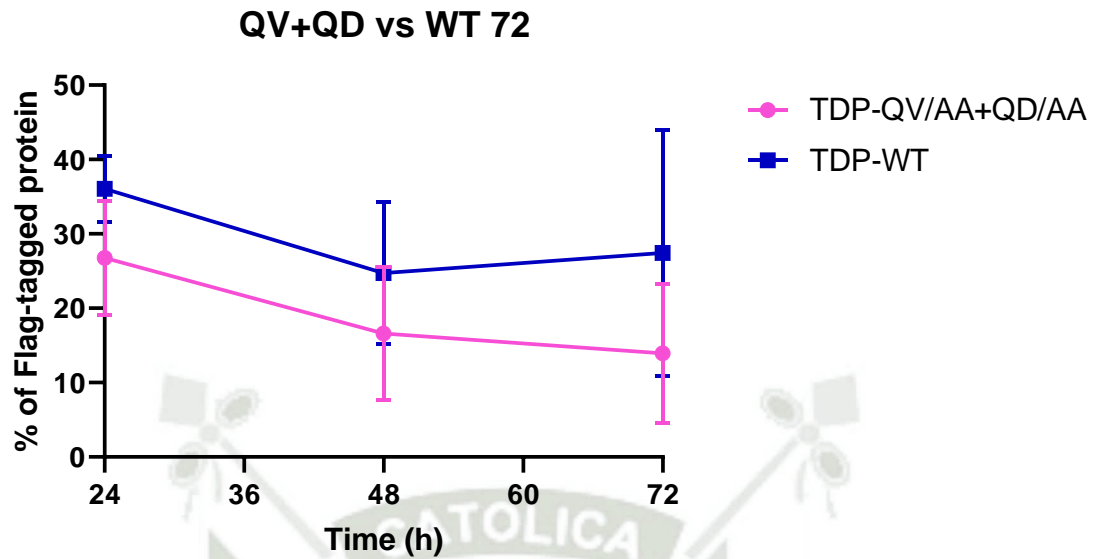


Figura N°. 07. Disminución de Flag-TDP-43. Sobre la línea doble mutante, su comportamiento es más eficaz que el de la línea silvestre, que también tiene una ligera producción de TDP-43 desde las 48 h hasta las 72 h.

WT vs mutants - 24-72h

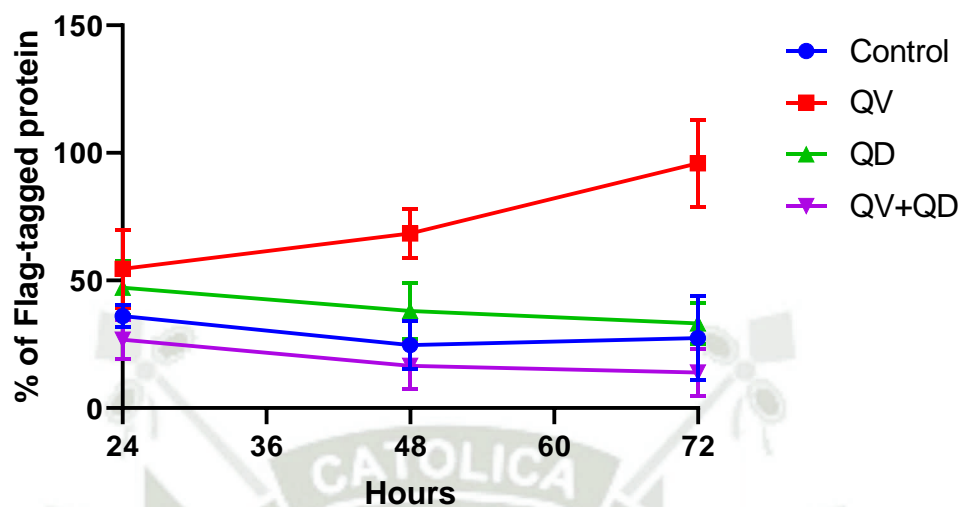


Figura N°. 08. Disminución de Flag-TDP-43. Al reunir todas las gráficas de las 4 líneas celulares, vemos que la degradación de TDP-43, pasadas las 24 h post-inducción, sólo HEK293 TDP-QV/AA no degrada a la proteína, sino aumentándolo de manera anormal; los comportamientos de WT y QD/AA son similares al término de las 72 h, aunque, entre las 24 h y 48, WT degrada mejor TDP-43; finalmente, QV+QD presenta una mejor degradación que estas dos.

HEK293 TDP-WT vs HEK293 Δ KFERQ

Entre 0 y 72 horas

QV vs WT

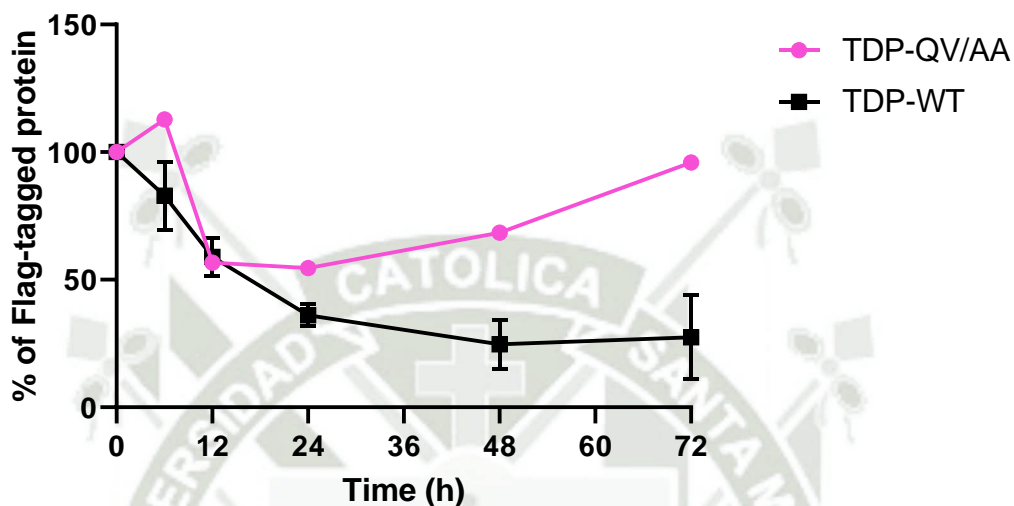


Figura N°. 09. Disminución de Flag-TDP-43. En la gráfica se ve el desarrollo completo de la degradación de TDP-43 por parte de la línea silvestre, así como el inexplicable repunte de TDP-43 por parte de TDP-QV/AA.

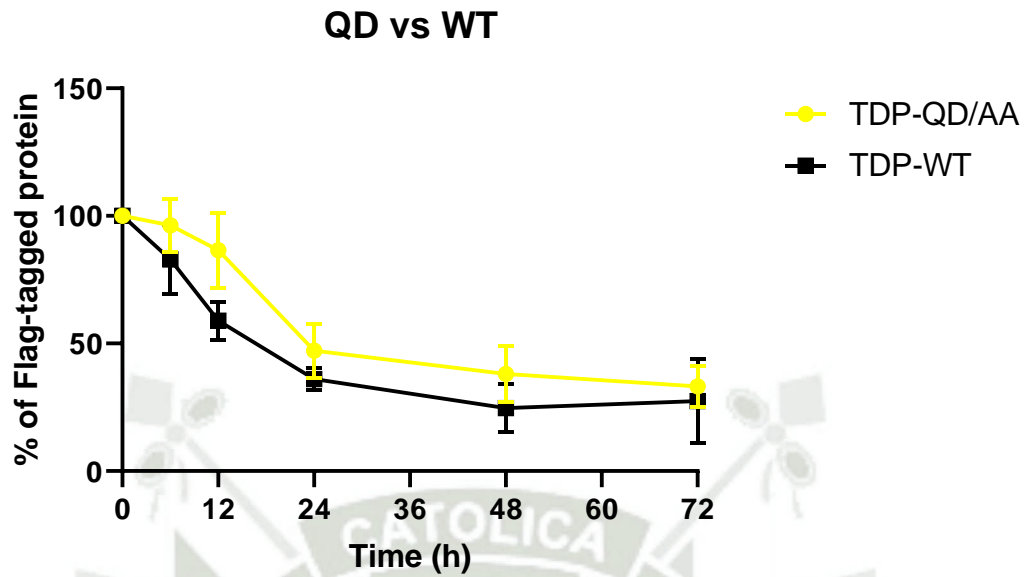


Figura N°. 10. Disminución de Flag-TDP-43. HEK293 TDP-43 WT degrada en más porcentaje a TDP-43 que lo que hace la línea celular HEK293 TDP-QD/AA. Ambas trabajaron bien, pero mejor fue la *wild-type*. Se aprecia un repunte de TDP-43 a partir de las 48 h hasta las 72 h en WT.

QV+QD vs WT

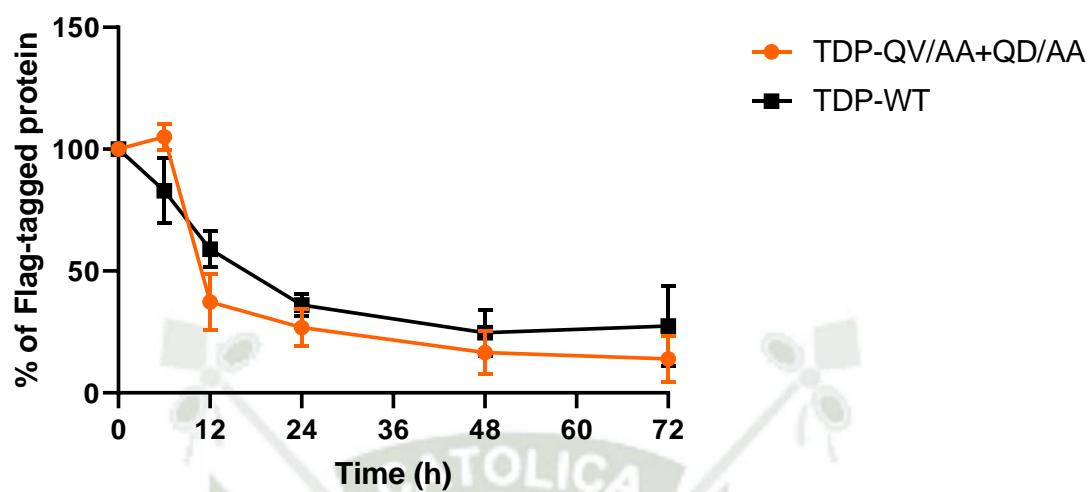


Figura N°. 11. Disminución de Flag-TDP-43. En esta figura se ve que HEK293 TDP-QV/AA+QD/AA presenta un despegue de producción de TDP-43 a las 6 h, sin inducción de ningún tipo, mientras que la cepa *wild type* degradó más que la doble mutante hasta alrededor de las 9 h, a partir de ese momento, la línea doble mutante superó al control y fue capaz de disminuir el porcentaje de presencia de Flag-TDP-43 presente en las células.

Tabla N° 01. Perfil de decaimiento proteico de una fase de TDP-43

DECAIMIENTO DE UNA FASE				
95% CI (perfil de probabilidad)	TDP-43 WT	TDP-43 QV/AA	TDP-43 QD/AA	TDP-43 QV+QD/AA
Y₀	85.00 to 121.5	73.81 a 140.3	89.34 a 124.4	91.16 a 129.0
Plateau	0.07074 to 38.21	-infinito a 90.48	-199.2 a 46.30	-10.19 a 26.21
K	0.02736 to 0.1257	??? a +infinito	0.003976 a 0.08115	0.03417 a 0.1113
Half-life	5.513 to 25.34	???	8.541 a 174.3	6.227 a 20.28
Tau (τ)	7.954 to 36.55	???	12.32 a 251.5	8.984 a 29.26

ANEXO IV

HEK293 Flp-In-LAMP-2A

Ensayo #1. Transfección L2A

Se realizó el cultivo de las líneas celulares HEK-293-Flp-In- a las cuales se les transfectó el gen LAMP-2A para sobre-producir la proteína LAMP-2A. Las células se cultivaron en 6-well plate. Se adicionó G418 para la selección de sólo positivas a la transfección: 2 mg, 1.2 mg, 600 ug y 1.2 mg sin transfectar y, para la confirmación, en duplicado sólo 2 mg y 1.2 mg, luego se realizó la cuantificación proteica por BCA y luego se realizó el cálculo de carga por pocillo para realizar la electroforesis. Para la cuantificación por BCA se conformó la curva de estándares con muestras en duplicado y midiendo a 560 nm.

Tabla N° . 01. Curva de calibración

Std	Abs 1	Abs 2	\bar{X}	Abs	CONCN
A	2.348	2.371	2.360	2.248	2000
B	1.725	1.823	1.774	1.663	1500
C	1.301	1.387	1.344	1.233	1000
D	1.012	1.136	1.074	0.963	750
E	0.807	0.883	0.845	0.734	500
F	0.541	0.569	0.555	0.444	250
G	0.35	0.365	0.358	0.246	125
H	0.158	0.175	0.167	0.055	25
I	0.11	0.113	0.112	0.000	0

Tabla N° . 02. Cálculo de volumen para electroforesis SDS-PAGE

Samples	Absorbance ($\lambda=560$ nm)				CONCN		WB		
	1	2	\bar{X}	Abs	ug/ml	ug/ul	ul	LB 5X	Σ
2 mg*ml ⁻¹ (1)	0.671	0.699	0.685	0.574	429.091	2.145	4.7	2.3	7.0
2 mg*ml ⁻¹ (2)	0.684	0.650	0.667	0.556	412.727	2.064	4.8	2.4	7.3
1.2 mg*ml ⁻¹ (1)	0.581	0.548	0.565	0.453	319.545	1.598	6.3	3.1	9.4
1.2 mg*ml ⁻¹ (2)	0.531	0.508	0.520	0.408	278.636	1.393	7.2	3.6	10.8
600 mg*ml ⁻¹	0.679	0.603	0.641	0.530	389.091	1.945	5.1	2.6	7.7
W/O 1.2 mg*ml ⁻¹	0.413	0.412	0.413	0.301	181.364	0.907	11.0	5.5	16.5

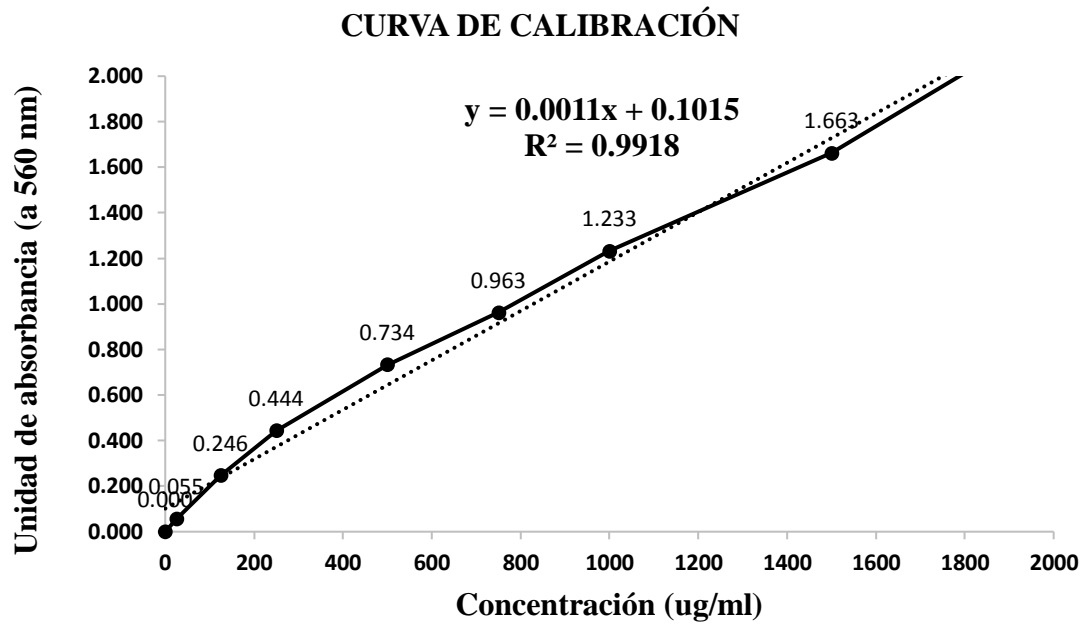


Figura N°. 01. Curva de calibración

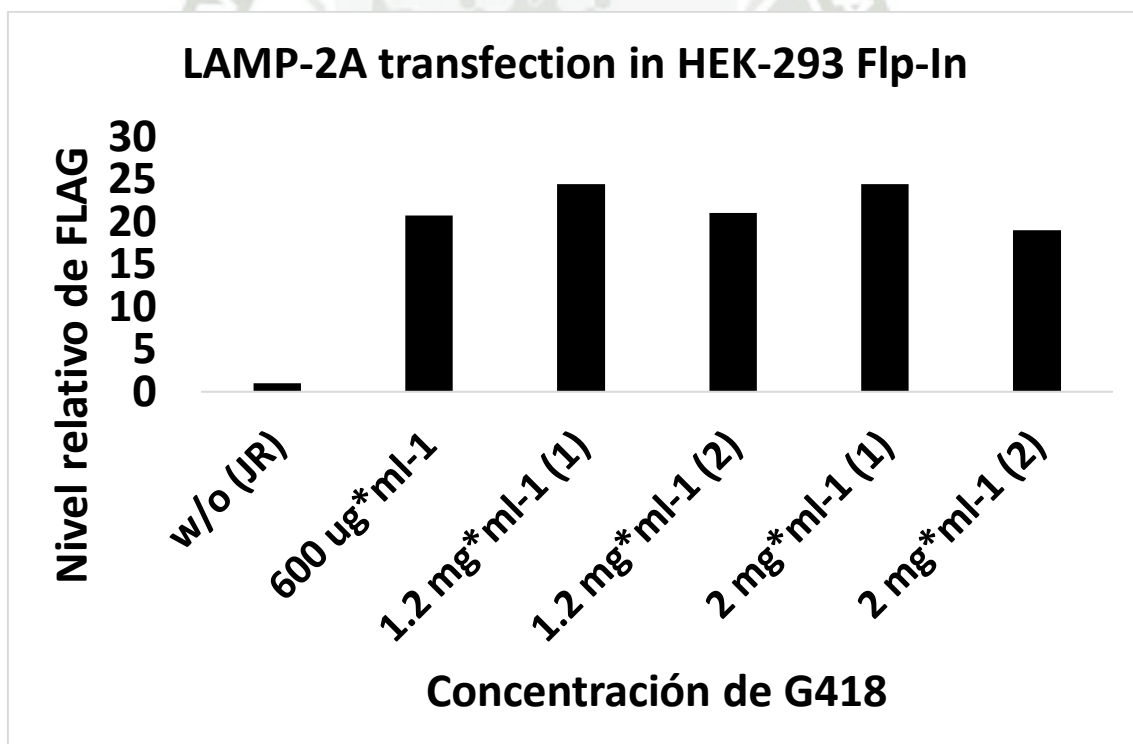


Figura N°. 02. En la gráfica se observa que, post selección positiva con G418, la aparición de Flag-TDP-43 en las 5 muestras, menos en el control negativo. Aquí se ve a Flag porque es el *tag* o etiqueta proteica que estará enlazada a LAMP-2A, por lo que si hay una sobre-producción de LAMP-2A, debe haber un incremento considerable de Flag.

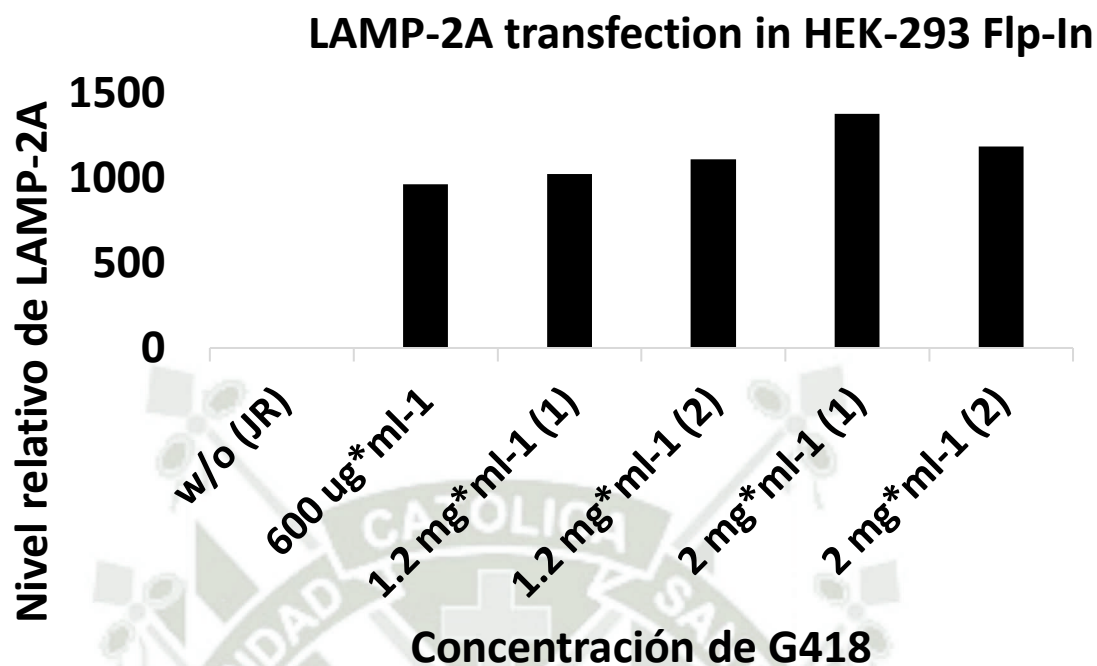


Figura N°. 03. El control negativo no expresó LAMP-2A como se planificó, y la línea celular si mostró sobre-producción de LAMP-2A a distintas concentraciones de G418, por lo que se logró desarrollar una línea celular en base a células HEK293 Flp-In que puedan ser capaces de sobre-expresar la proteína humana LAMP-2A

HEK293 TDP-43 WT LAMP-2A

Ensayo #1. Transfección L2A

Se realizó el cultivo de las líneas celulares HEK293 TDP-43 WT- a las cuales se les transfirió el gen LAMP-2A para sobre-producir la proteína LAMP-2A. Las células se cultivaron en 6-well plate. Se adicionó G418 para la selección de sólo positivas a la transfección: 2 mg, 1.2 mg, 600 ug y 1.2 mg sin transfectar y, para la confirmación, en duplicado sólo 2 mg y 1.2 mg, luego se realizó la cuantificación proteica por BCA y luego se realizó el cálculo de carga por pocillo para realizar la electroforesis. Para la cuantificación por BCA se conformó la curva de estándares con muestras en duplicado y midiendo a 560 nm.

Tabla N° 03. Concentración proteica de muestras de HEK293 TDP-43 WT

STD	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS	DIL (μ l)	BSA (μ l)	CONCN
A	2.158	2.126	2.142	2.053	0	300	2000
B	1.694	1.697	1.696	1.607	125	375	1500
C	1.293	1.312	1.303	1.214	325	325	1000
D	1.040	1.055	1.048	0.959	175	175	750
E	0.776	0.805	0.791	0.702	325	325	500
F	0.353	0.343	0.348	0.259	325	325	250
G	0.261	0.265	0.263	0.174	325	325	125
H	0.115	0.109	0.112	0.023	400	100	25
I	0.093	0.085	0.089	0.000	400	0	0

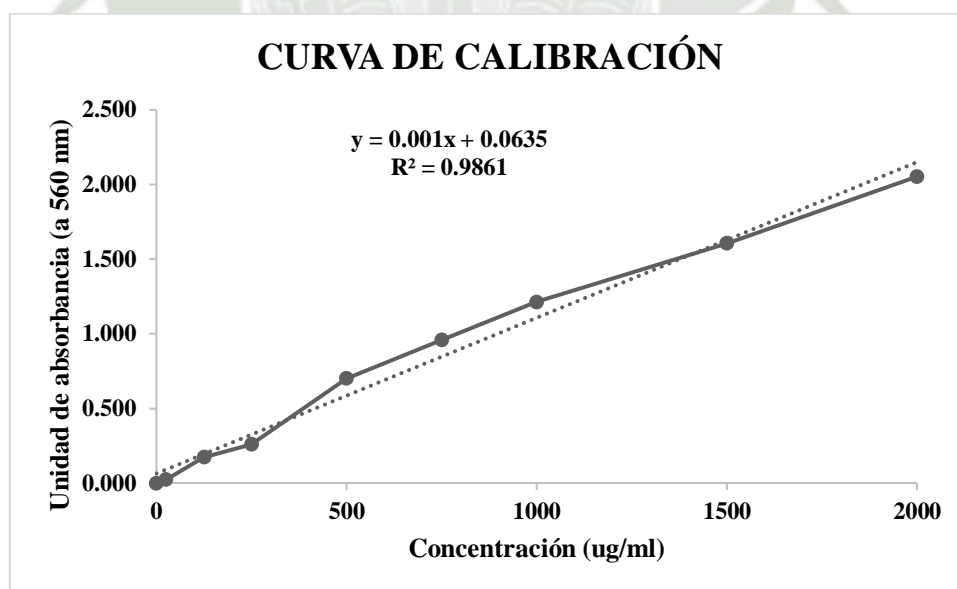


Figura N° .04. Curva de calibración

Tabla N° . 04. Determinación de volumen de carga por pocillo para corrida electroforética

Muestras		Absorbancia ($\lambda=560$ nm)					CONCN		WB		
N	línea	CONCN	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS	ug/ml	ug/ul	lisado (μ l)	LB 5X	d_{H_2O}
1	1	600	0.475	0.486	0.481	0.392	328.000	1.640	6.1	3.0	10.9
1	1	600	0.545	0.499	0.522	0.433	369.500	1.848	5.4	2.7	11.9
1	1	1.2	0.314	0.315	0.315	0.226	162.000	0.810	12.3	6.2	1.5
1	1	1.2	0.352	0.324	0.338	0.249	185.500	0.928	10.8	5.4	3.8
1	1	1.2	0.465	0.502	0.484	0.395	331.000	1.655	6.0	3.0	10.9



HEK293 TDP-12xQ/N LAMP-2A

Ensayo #1. Transfección L2A

Se realizó el cultivo de las líneas celulares HEK293 TDP-12xQ/N a las cuales se les transfirió el gen LAMP-2A para sobre-producir la proteína LAMP-2A. Las células se cultivaron en 6-well plate. Se adicionó G418 para la selección de sólo positivas a la transfección; luego se realizó la cuantificación proteica por BCA y luego se realizó el cálculo de carga por pocillo para realizar la electroforesis. Para la cuantificación por BCA se conformó la curva de estándares con muestras en duplicado y midiendo a 560 nm.

Tabla N°. 05. Concentración proteica de muestras de HEK293 TDP-12xQ/N LAMP-2A

STD	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS	DIL (μ l)	BSA (μ l)	CONCN
A	2.031	2.141	2.086	1.992	0	300	2000
B	1.626	1.787	1.707	1.612	125	375	1500
C	1.244	1.244	1.244	1.150	325	325	1000
D	1.007	1.035	1.021	0.927	175	175	750
E	0.704	0.804	0.754	0.660	325	325	500
F	0.432	0.457	0.445	0.350	325	325	250
G	0.288	0.313	0.301	0.206	325	325	125
I	0.093	0.096	0.095	0.000	400	0	0
H	0.053	0.056	0.055	-0.040	400	100	25

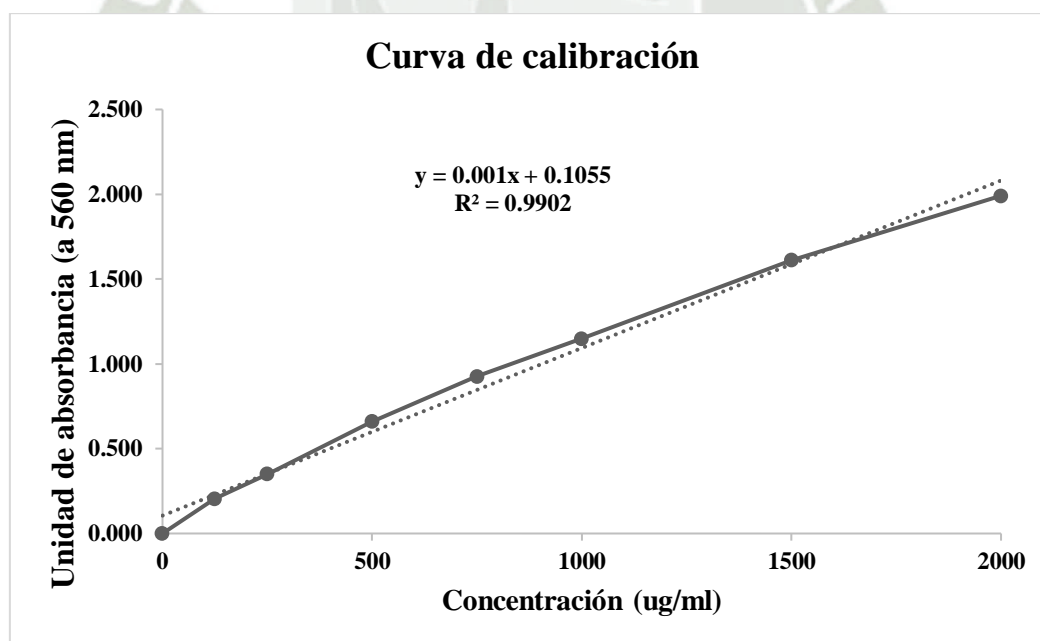


Figura N°. 05. Curva de calibración

Tabla N°. 06. Determinación de volumen de muestras para electroforesis

Muestras	Absorbancia ($\lambda=560$ nm)				CONCN		WB	
	ABS 1	ABS 2	\bar{X}	ABS	ug/ml	ug/ul	lisado(μ l)	LB 5X
300-1-A	0.654	0.596	0.625	0.531	425.000	2.125	4.7	2.4
300-1-B	0.489	0.510	0.500	0.405	299.500	1.498	6.7	3.3
300-1-C	0.554	0.512	0.533	0.439	333.000	1.665	6.0	3.0
300-2-A	0.396	0.413	0.405	0.310	204.500	1.023	9.8	4.9
300-2-B	0.388	0.386	0.387	0.293	187.000	0.935	10.7	5.3
300-2-C	0.416	0.411	0.414	0.319	213.500	1.068	9.4	4.7
600-1-A	0.290	0.303	0.297	0.202	96.500	0.483	20.7	10.4
600-1-B	0.347	0.351	0.349	0.255	149.000	0.745	13.4	6.7
600-1-C	0.318	0.334	0.326	0.232	126.000	0.630	15.9	7.9
600-2-A	0.246	0.263	0.255	0.160	54.500	0.273	36.7	18.3
600-2-B	0.260	0.271	0.266	0.171	65.500	0.328	30.5	15.3
600-2-C	0.417	0.441	0.429	0.335	229.000	1.145	8.7	4.4