



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS

**Evaluación del efecto de los fármacos antifibróticos Carvedilol y Tamsulosina sobre el
estrés en retículo endoplásmico en un modelo *in vitro***

PRESENTA

Juan Carlos Rivera Navarro

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TUTORES

Dr. Daniel Cervantes García

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Javier Ventura Juárez

Aguascalientes, Ags, 2 de marzo del 2022

Datos generales

Título del proyecto:

Evaluación del efecto de los fármacos antifibróticos Carvedilol y Tamsulosina sobre el estrés en retículo endoplásmico en un modelo *in vitro*

Datos del Alumno:

Nombre: Juan Carlos Rivera Navarro

ID: 194996

Correo electrónico: rivera25865@gmail.com

Comité Tutorial:

- Tutor del Núcleo Académico Básico: Dr. Daniel Cervantes García.

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Microbiología, Edificio 202.

- Cotutor: Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega.

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Patología Molecular e Inmunohistoquímica. Edificio 23.

- Asesor: Dr. Javier Ventura Juárez

Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Laboratorio de Ciencias Morfológicas, Edificio 202.

Autorizaciones

CARTA DE VOTO APROBATORIO COMITÉ TUTORAL

Dra. PAULINA ANDRADE LOZANO
DECANA DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **JUAN CARLOS RIVERA NAVARRO** con ID 194996 quien realizó la tesis titulado: **EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIFIBRÓTICOS CARVEDILOL Y TAMSULOSINA SOBRE EL ESTRÉS EN RETICULO ENDOPLÁSMICO EN UN MODELO IN VITRO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *el* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 2 de marzo de 2022.



Dr. Daniel Cervantes García
Tutor de tesis

Martin Humberto Muñoz Ortega

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Co-Tutor de tesis



Dr. Javier Ventura Juárez
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 07/03/22

NOMBRE: Juan Carlos Rivera Navarro ID 194996

PROGRAMA: Maestría en Investigación Biomédica LGAC (del posgrado): Biomedicina Molecular y Celular

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TITULO: Evaluación del efecto de los fármacos antifibróticos Carvedilol y Tamsulosina sobre el estrés en retículo endoplásmico en un modelo *in vitro*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): La tesis proyecta la posibilidad de encontrar un mecanismo reparador en estructuras anatómicas capaces de desarrollar fibrosis como parte de un proceso reparador o patológico

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>				
<i>si</i>				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>si</i>				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>si</i>				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>si</i>				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>si</i>				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>si</i>				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>si</i>				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>no</i>				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>si</i>				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>				
<i>si</i>				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>si</i>				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>si</i>				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>no</i>				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>si</i>				Coincide con el título y objetivo registrado
<i>si</i>				Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>si</i>				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>si</i>				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>				
<i>N.A.</i>				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
<i>N.A.</i>				El estudiante es el primer autor
<i>N.A.</i>				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
<i>N.A.</i>				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
<i>N.A.</i>				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
<i>N.A.</i>				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Submitted to Experimental and Therapeutic Medicine

Molecular effects of adrenergic blockers on endoplasmic reticulum homeostasis of HepG2 cells.

Running Title: Rivera-Navarro et al: Molecular effects of adrenoblockers on endoplasmic reticulum of HepG2 cells.

Key Words: Carvedilol, Tamsulosin, Reticular stress, HepG2

Submitted by: Martin Muñoz-ortega, created on 24-02-2022

Type of Article: Article

Abstract

Carvedilol and tamsulosin are drugs belonging to the family of adrenergic receptor antagonists, which have been proposed in multiple recent studies (in vitro and in vivo) for the treatment of liver and kidney fibrosis. However, there are reports of possible harmful effects that contradict their therapeutic properties in chronic liver damage, in addition, there is not enough toxicological information on these drugs to guarantee their safety. The present work studies the signaling pathways that can be activated when there is stress in the endoplasmic reticulum by means of a cell model derived from hepatocytes. Our findings with the MTT assays suggest that both drugs decrease cell viability in a time-dependent manner with a proliferative tendency at higher concentrations. The study of the gene expression kinetics of the UPR markers showed a moderate response in the PERK - ATF4 and IRE1 - XBP1 branch at 12 hours of treatment. GRP78 has an increase in expression within the first hours of treatment, however there were no significant differences in its synthesis evaluated with western blot. Finally, the study of the rate of protein synthesis was not altered by tamsulosin, but by carvedilol, which briefly reduced it. Our findings suggest that both carvedilol and tamsulosin favor the expression of genes involved in the response to malformed proteins, however, it is not enough to trigger the response.

Authors

Name	Institute	Email Address
Mr Juan Carlos Rivera-Navarro	Universidad Autónoma de Aguascalientes	rivera25865@gmail.com
Miss Mariana Yazmin Medina-Pizaño	Universidad Autónoma de Nuevo León	mariana93medina@gmail.com
Dr Sandra Luz Martínez-Hernández	Universidad Autónoma de Aguascalientes	lilith3050@hotmail.com
Ms Bertha Alicia Hernández-Mercado	Universidad Autónoma de Aguascalientes	alicia_hernandezm@outlook.com
Dr Paulino Barragán-Iglesias	Universidad Autónoma de Aguascalientes	paulino.barragani@gmail.com
Dr Javier Ventura-Juárez	Universidad Autónoma de Aguascalientes	javier.venturajuarez@gmail.com
Dr Daniel Cervantes-García [Corresponding]	Universidad Autónoma de Aguascalientes	daniel.cervantes@edu.uaa.mx
Dr Martín Humberto Muñoz-Ortega [Corresponding]	Universidad Autónoma de Aguascalientes	mhmunoz@correo.uaa.mx

Files

File Name	Type	Uploaded
Cover letter.docx	Letter to the Editor	24-02-2022
Manuscript Rivera-Navarro.docx	Manuscript	24-02-2022
Table 1.docx	Table	24-02-2022
Figura 1.jpg	Figures and Images	24-02-2022
Figura 2.jpg	Figures and Images	24-02-2022
Figura 3.jpg	Figures and Images	24-02-2022
Figura 4.jpg	Figures and Images	24-02-2022
Figura 5.jpg	Figures and Images	24-02-2022
Figura 6.jpg	Figures and Images	24-02-2022

Agradecimientos

Me resulta muy complicado resumir en unas palabras de gratitud lo que siento hacia todos aquellos que formaron parte mi vida en estos dos años, quienes contribuyeron a mi proceso de formación y todos los que lo hicieron posible. Así que sepan que lo que escribo a continuación solo es una muestra de lo que siento y quienes estuvieron ahí.

Agradezco al CONACYT, por las facilidades que nos brinda a los estudiantes para continuar nuestros estudios y su apoyo financiero. A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma de Aguascalientes, donde tuve la fortuna de estudiar y ser parte de su maravillosa comunidad. Al Centro de Ciencias de la Salud, por la iniciativa de la MIB. Especialmente por la respuesta coordinada de dichas instituciones frente a la contingencia sanitaria provocada por la COVID-19, priorizando nuestra salud y educación.

A mi comité tutorial, por su apoyo y motivarme a ser mejor estudiante. Al Dr. Daniel Cervantes García por su disposición y responsabilidad, al Dr. Javier Ventura Juárez por su imparcialidad y criterio experto, y al Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega por su paciencia, compromiso y dedicación excepcional.

A mis compañeros de maestría y a los miembros del laboratorio de patología molecular, neuroinflamación, y morfología, en quienes encontré amistad e inspiración. Agradezco especialmente a la M. en C. Mariana Medina Pizaño, por su instrucción, la Dra. Sandra Luz Martínez, quien estuvo dispuesta a ayudar en todo momento, a la AQB. Mariana Ramírez quien fue un vínculo especial de ambos laboratorios, al Dr. Paulino Barragán y la M. en C. Alicia Hernández que me apoyaron en el diseño y desarrollo de experimentos. A mis alumnos, el QFB. Cesar Daniel Barrios y la LBT. Diana Carolina Gaytán, de quienes estoy orgulloso y sé que serán profesionistas de bien. Y a mis amigos Leslie, Paco, Silvia, Roberto, Marisol y Samson, les deseo éxito y salud.

Dedicatorias

Con todo mi amor, para mi Familia.

A mis padres Roberto Rivera Sosa y Delia Leticia Navarro Márquez, que, por su amor y apoyo incondicional, fue posible lograr este proyecto. Sepan que sus valores son la base de mis logros.

A mi hermana Verónica Rivera Navarro y Erani Virgen Guerra, les agradezco sus enseñanzas y consejos.

A mis hermanos Roberto Rivera Navarro y Leticia Rivera Navarro, a quienes siempre tengo en mi corazón.

A Daniela Mitchell Ortiz Padilla, a quien tuve la fortuna de conocer durante mis estudios y la dicha de compartir tiempo. Te amo.

Gracias a todos por creer en mí.

A futuros estudiantes.

Ojalá encuentren en mi trabajo una referencia para sus estudios.

A la comunidad científica.

Espero que encuentren útil mi pequeña aportación y sea de ayuda para la humanidad.

Índice General

Índice General----- 1

Índice de Figuras.----- 4

Índice de tablas. ----- 5

Índice de Gráficas. ----- 6

Acrónimos ----- 7

Resumen -----11

Abstract -----12

Capítulo I-----13

1. Introducción y antecedentes -----13

 1.1. Tamsulosina-----13

 1.1.1. Generalidades -----13

 1.1.2. Propiedades Farmacodinámicas-----14

 1.1.3. Propiedades farmacocinéticas-----15

 1.1.4. Efecto Terapéutico -----16

 1.1.5. Tolerabilidad -----17

 1.1.6. Dosis y administración-----17

 1.2. Carvedilol-----18

 1.2.1. Generalidades -----18

 1.2.2. Propiedades Farmacodinámicas-----18

 1.2.3. Propiedades Farmacocinéticas -----19

 1.2.4. Efecto Terapéutico -----21

 1.2.5. Tolerabilidad -----22

 1.2.6. Dosis y Administración -----22

 1.3. Adrenoreceptores -----22

1.3.1.	Generalidades	22
1.3.2.	Adrenoreceptores Alfa 1	24
1.3.3.	Adrenoreceptores Alfa 2	25
1.3.4.	Adrenoreceptores Beta	26
1.4.	El hígado y su relación con el sistema nervioso simpático	27
1.5.	Fibrosis Hepática	30
1.5.1.	α/β Bloqueadores contra la fibrosis hepática.	31
1.6.	Toxicidad de los Fármacos Antifibróticos	33
1.7.	Homeostasis del Retículo Endoplásmico.	37
Capítulo II		45
2.	Planteamiento del Problema	45
3.	Justificación	45
4.	Objetivos	46
4.1.	Objetivos específicos	46
5.	Hipótesis	47
Capítulo III		48
6.	Diseño Experimental	48
7.	Variables	48
8.	Metodología	54
8.1.	Cultivo Celular	54
8.2.	Estímulos Farmacológicos	55
8.3.	Ensayo de Viabilidad MTT	56
8.4.	Expresión Genética	57
8.4.1.	Extracción y Evaluación de ARN	57
8.4.2.	Retrotranscripción	57

8.4.3.	Diseño y Validación de los Oligonucleótidos	58
8.4.4.	RT q PCR	60
8.5.	Expresión Proteica	61
8.5.1.	Caracterización de Proteínas	61
8.5.2.	Análisis de la Síntesis Proteica	62
8.6.	Análisis Estadístico	63
Capítulo IV		65
9.	Resultados	65
9.1.	Crecimiento Celular	65
9.2.	Citotoxicidad de los Adrenobloqueadores.	65
9.3.	Expresión Genética de Biomarcadores.	69
9.3.1.	Calidad del Material Genético y Validación de los Oligonucleótidos	69
9.3.2.	Chaperonas Moleculares Residentes del RE	72
9.3.3.	Rama PERK - ATF4	75
9.3.4.	Rama IRE - XBP1	77
9.3.5.	Rama ATF6.	78
9.3.6.	Activación de Bax y Bcl2.	79
9.3.7.	Apoptosis	81
9.3.8.	Macroautofagia	82
9.4.	Expresión Proteica.	84
9.4.1.	Tinción de las Membranas.	84
9.4.2.	Caracterización de GRP78.	86
9.4.3.	Caracterización de LC3A/B.	87
9.4.4.	Síntesis Global de Proteínas.	88

Capítulo V -----	93
10. Discusión de Resultados-----	93
11. Conclusiones-----	108
Capítulo VI -----	110
12. Referencias-----	110
Anexos-----	125

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura química de la tamsulosina-----	14
Figura 2. Productos metabólicos de la tamsulosina-----	16
Figura 3. Estructura química del carvedilol-----	19
Figura 4. Productos metabólicos del carvedilol-----	20
Figura 5. Biosíntesis de catecolaminas-----	24
Figura 6. Arquitectura celular del lobulillo hepático-----	28
Figura 7. Partes del retículo endoplásmico-----	38
Figura 8. Funciones del retículo endoplásmico-----	39
Figura 9. Diagrama de los tres brazos de la UPR-----	41
Figura 10. Diseño metodológico-----	48
Figura 11. Integridad del ARN total-----	70
Figura 12. Evaluación del cADN y oligonucleótidos-----	71
Figura 13. Curva de fusión y amplificación del ARNm ribosomal 18S-----	72
Figura 14. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de chaperonas reticulares-----	75
Figura 15. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de la rama PERK - ATF4-----	76
Figura 16. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de la rama IRE1α - XBP1-----	78

Figura 17. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de la rama ATF6

79

Figura 18. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de Bcl2-----81

Figura 19. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Muerte celular -----82

Figura 20. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Autofagia -----84

Figura 21. Tinción con rojo de Ponceau-----85

Figura 22. Efectos de los tratamientos farmacológicos en la expresión de GRP78 -----86

Figura 23. Efectos de los tratamientos farmacológicos en la expresión de LC3A/B-----88

Figura 24. Comparación estructural de la puromicina y aa-ARnt-----89

Figura 25. Efectos de los tratamientos farmacológicos en la síntesis global de proteínas 91

Índice de Tablas

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de la tamsulosina-----15

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos del carvedilol-----20

Tabla 3. Operacionalización de las variables-----53

Tabla 4. Recipientes utilizados en el cultivo celular -----54

Tabla 5. Genes diana para el análisis RT qPCR-----60

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios -----63

Tabla 7. Concentraciones séricas de los adrenobloqueadores ----- 129

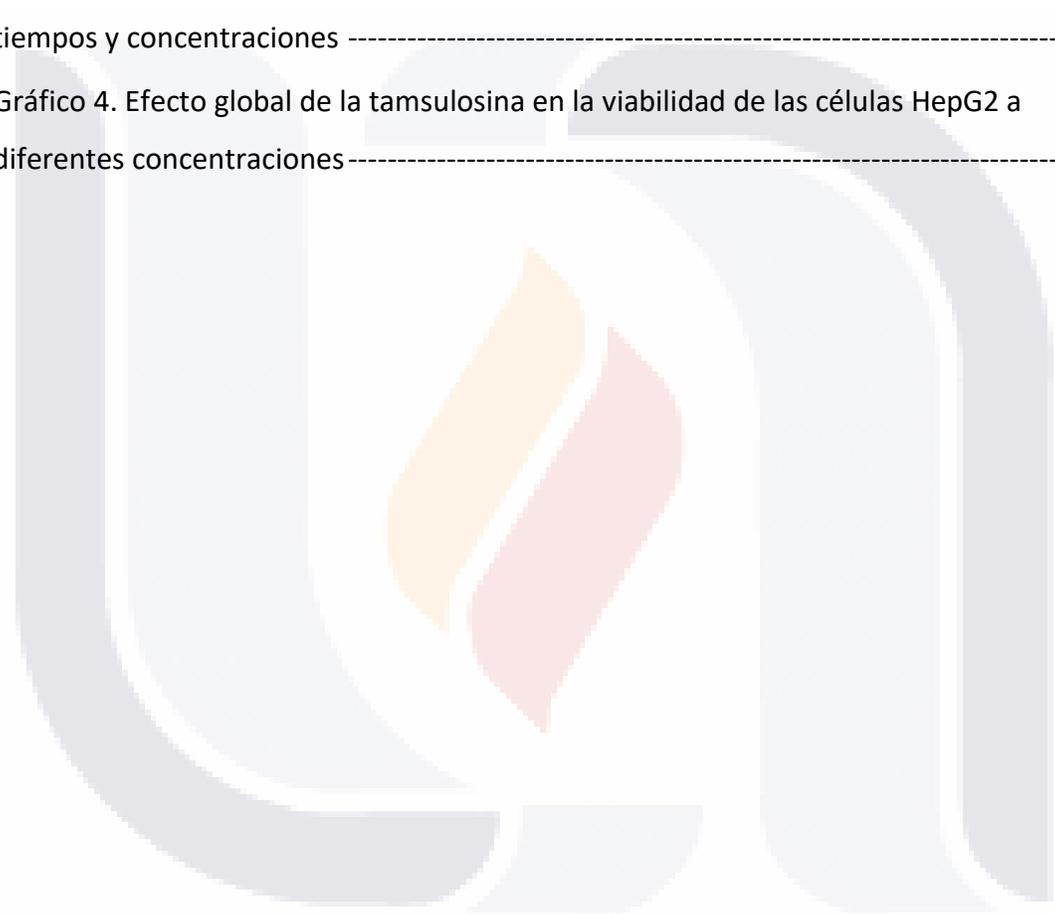
Índice de Gráficas.

Gráfico 1. Efectos del carvedilol en la viabilidad de las células HepG2 en diferentes tiempos y concentraciones -----66

Gráfico 2. Efecto global del carvedilol en la viabilidad de las células HepG2 a diferentes concentraciones -----67

Gráfico 3. Efectos de la tamsulosina sobre la viabilidad de las células HepG2 en diferentes tiempos y concentraciones -----68

Gráfico 4. Efecto global de la tamsulosina en la viabilidad de las células HepG2 a diferentes concentraciones -----69



Acrónimos

ABC: Área bajo la curva

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AR: Adrenoreceptores

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: Ácido ribonucleico de transferencia

ASK: *Apoptosis signal-regulating kinase 1*

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATF3: *Activation of transcription factor 3*

ATF4: *Activation of transcription factor 4*

ATF6: *Activation of transcription factor 6*

ATP: Adenosín Trifosfato

Bak: *Bcl-2 homologous antagonist killer*

Bax: *Bcl2 associated X protein*

BBNE: Beta bloqueadores no específicos

Bcl2: *B-cell lymphoma 2*

Bid: *BH3 interacting-domain death agonist*

Bim: *Bcl-2-like protein 11*

Bip: *Binding immunoglobulin protein*

bp: Par de bases

BSA: Albúmina sérica bovina

bZIP: *Basic Leucine Zipper Domain*

C/EBP: *CCAAT-enhancer-binding proteins*

cADN: ADN complementario

CaMKII: *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico

CEHs: Células estrelladas hepáticas

c-jun: *AP-1 transcription factor subunit*

C_{max}: Concentración máxima

COHs: Células ovas hepáticas

CYP: Citocromo

CHOP: *C/EBP CCAAT/enhancer binding protein homologous protein*

Da: Dalton

DDIT3: *DNA damage-inducible transcript 3*

DMEM: *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: *Deoxynucleotide triphosphates*

EDEM: *ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein*

eIF2 α : *Eukaryotic initiation factor 2 alpha*

EPI: Epinefrina

ERAD: *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*

ERE: Estrés del retículo endoplásmico

ERO1 α : *Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 alpha*

ERSE: *ER stress-response element*

EUA: Estados Unidos de América

FDA: *Food and Drug Administration*

FEVI: Fracción de eyección del ventrículo izquierdo

GADD153: *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 153*

GADD34: *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 34*

GCN2: *General control nonderepressible 2*

GRP78: *Glucose-regulated protein 78*

GRP79: *Glucose-regulated protein 79*

GRP94: *Glucose-regulated protein 94*

HHT: Homoharringtonina

HPB: Hiperplasia prostática benigna

HRI: *Heme regulated inhibitor*

Hsps: *Heat Shock Proteins*

ICC: *Insuficiencia cardiaca crónica*

IFN- α : *Interferón alfa*

IP3R1: *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type1*

IPSS: *International Prostate Symptom Score*

IRE1 α : *Inositol-Requiring Enzyme 1 α*

JIK: *C-Jun N-terminal inhibitory kinase*

JNK: *C-Jun N-terminal kinase*

LDL: *Lipoproteínas de baja densidad*

M: *Molar*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases*

MAPKKK: *Mitogen Activated Protein kinase kinase kinase*

MEC: *Matriz extracelular*

MTT: *Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol*

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NEPI: *Norepinefrina*

NF-Y: *Nuclear factor subunit Y*

NF- κ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NIH: *National institute of health*

NOX2: *NADPH Oxidase 2*

Nrf-2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

OMS: *Organización mundial de la salud*

OPB: *Obstrucción prostática benigna*

ORF: *Open Reading frame*

PBS: *Phosphate-buffered saline*

PCR: *Polymerase chain reaction*

PDGF: *Platelet derived growth factor*

PERK: *Protein Kinase R/PKR-like ER kinase*

PKR: *Protein kinase RNA-activated*

PPIC: *Protein phosphatase I catalytic subunit*

Q_{max}: Flujo máximo

RE: Retículo Endoplásmico

REL: Retículo endoplásmico Liso

RER: Retículo Endoplásmico Rugoso

RIDD: *IRE1 α -dependent decay*

ROS: *Reactive oxygen species*

RT qPCR: *Quantitative reverse transcription PCR*

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema nervioso central

SNS: Sistema nervioso simpático

STUI: Síntomas del tracto urinario inferior

SUP: Sistema Ubiquitina - Proteasoma

TEMED: N, N, N, N-Tetrametiletilendiamina

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TM: Tunicamicina

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

TRAF: *Tumor necrosis factor receptor associated factors*

UE: Unión europea

UPR: *Unfolded protein response*

UPRE: *Unfolded protein response elements*

UTR: *Untranslated region*

XBP1: *X-box binding protein 1*

Resumen

El carvedilol y tamsulosina son fármacos pertenecientes a la familia de antagonistas de los receptores adrenérgicos, que se han propuesto en múltiples estudios recientes (*in vitro* e *in vivo*) para tratar la fibrosis hepática. Sin embargo, hay reportes de posibles efectos perjudiciales que contradicen sus propiedades terapéuticas, además, no se cuenta con suficiente información toxicológica de dichos medicamentos para garantizar su seguridad. La presente tesis nace de la necesidad de dilucidar los efectos que pueden tener estos medicamentos en el parénquima hepático a nivel celular. Estudios previos encaminaron la investigación al estudio específico de las vías de señalización que se activan cuando hay estrés en el retículo endoplásmico, que se logró por medio de un modelo celular derivado de hepatocitos (HepG2). En el presente trabajo se informa que ambos medicamentos disminuyen la viabilidad celular de manera tiempo dependiente con una tendencia proliferativa a mayores concentraciones. El estudio de la cinética de expresión génica de los marcadores de la UPR mostró una respuesta moderada en la rama de PERK - ATF4 e IRE1 - XBP1 a las 12 hrs de los tratamientos. También se vio un incremento en la expresión de las chaperonas GRP78, Calreticulina y del gen Bcl2/Bax dentro de las primeras horas de los tratamientos. La rama de ATF6 se vio regulada a la baja, así como la expresión de genes implicados en la autofagia y apoptosis. Por otro lado, la evidencia de los ensayos de inmunotransferencia muestran que la tasa de síntesis de proteínas no se ve alterada por la tamsulosina, pero sí por el carvedilol, que la redujo brevemente. Los resultados sugieren que tanto el carvedilol como la tamsulosina favorecen la sobreexpresión de genes implicados con la respuesta a proteínas mal conformadas como posible mecanismo de supervivencia ante el posible estrés que generan estos medicamentos.

Palabras Clave: Antagonistas adrenérgicos, Estrés reticular, HepG2

Abstract

Carvedilol and tamsulosin are drugs belonging to the family of adrenergic receptor antagonists, which have been proposed in multiple recent studies (*in vitro* and *in vivo*) to treat liver fibrosis. However, there are reports of possible harmful effects that contradict their therapeutic properties, and there is not enough toxicological information on these drugs to guarantee their safety. This thesis arises from the need to elucidate the effects that these drugs can have on the liver parenchyma at the cellular level. Previous studies led the investigation to the specific study of the signaling pathways that are activated when there is stress in the endoplasmic reticulum, which was attained by employing a cellular model derived from hepatocytes (HepG2). In the present work, it is reported that both drugs decrease cell viability in a time-dependent manner with a proliferative tendency at higher concentrations. The study of the gene expression kinetics of the UPR markers showed a moderate response in the PERK-ATF4 and IRE1-XBP1 branch at 12 hrs of the treatments. An increase in the expression of the chaperones GRP78, Calreticulin, and the Bcl2/Bax gene was also seen within the first hours of the treatments. The ATF6 branch was downregulated, as well as the expression of genes involved in autophagy and apoptosis. On the other hand, the evidence from immunoblot tests shows that the rate of protein synthesis is not altered by tamsulosin, but by carvedilol, which reduced it briefly. The results suggest that both carvedilol and tamsulosin favor the upregulation of genes involved in the response to poorly shaped proteins as a possible survival mechanism in the face of the possible stress generated by these drugs.

Key Words: Adrenergic antagonists, Reticular stress, HepG2

Capítulo I

1. Introducción y antecedentes

1.1. Tamsulosina

1.1.1. Generalidades

La Tamsulosina es un antagonista selectivo de adrenoreceptores (ARs) tipo α_{1A} y α_{1D} , y agonista inverso de α_{1B} (1–3) ubicados en la glándula, cápsula y uretra prostática y la vejiga, asociados con la relajación de los músculos lisos que lleva a la mejora del flujo de orina (Q_{max}) (4). Fue aprobada por primera vez por la *Food and Drug Administration* (FDA) el 15 de abril de 1997 (5).

Se emplea para tratar los síntomas del tracto urinario inferior (STUI), que incluyen la frecuencia de orinar, indecisión, debilitamiento, urgencia y nicturia (necesidad de orinar por las noches). Generalmente se asocian estos síntomas con el agrandamiento e hiperplasia prostática benigna (HPB), obstrucción prostática benigna (OPB) u obstrucción en la salida de la vejiga. Los STUI también pueden ser resultado del incremento de la contracción del músculo prostático liso y disfunción de la vejiga (6). Los antagonistas de ARs α_1 se desarrollaron en un principio para tratar problemas de hipertensión: muchos de los efectos adversos asociados con el tratamiento farmacológico para pacientes con STUI es su acción en la presión sanguínea (4).

Aproximadamente el 61% de la población en México reporta sintomatología prostática, a partir de los 55 años; 25% sufre de datos obstructivos a los 75 años, y el 50% refiere disminución de la fuerza y calibre del chorro urinario, 40% de los hombres mayores de 60 años y 20-30% de los hombres a partir de la quinta década de la vida presentan STUI (6). Los síntomas relacionados con el almacenamiento tienen un efecto más ligado a la calidad de vida de los pacientes. Muy probablemente los antagonistas de α_1 AR actúan a través de la reducción de la excitabilidad del reflejo miccional a través de receptores en los ganglios intramurales de la vejiga o en la médula espinal para aliviar estos síntomas (4).

1.1.2. Propiedades Farmacodinámicas

Ensayos *in vitro* han demostrado que la tamsulosina es un antagonista selectivo de ARs subtipo α_1 , con una mayor afinidad por tejidos prostáticos y submaxilares (donde abundan receptores del tipo 1α), que por los aórticos o esplácnicos (principalmente del tipo 1β). La forma comercial de la tamsulosina es el isómero R(-) por su mejor afinidad que el S(+).

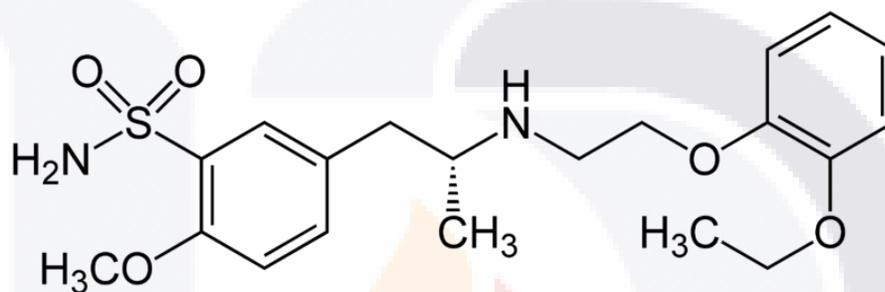


Figura 1. Estructura química de la tamsulosina. 5 - [(2R) -2- [2- (2-etoxifenoxi) etilamino] propil] -2-metoxibencenosulfonamida (IUPAC). Imagen tomada de Wikipedia (7).

Datos muestran que la eficacia de la tamsulosina se atribuye al bloqueo de los ARs α_{1A} en la glándula prostática, que disminuye la contracción del músculo liso y mejora los síntomas de vaciado dinámicos, que lleva a un mejor Q_{max} (de orina). El bloqueo de ARs α_{1A} y α_{1D} en la vejiga provoca la inhibición de las contracciones del músculo detrusor, se estabiliza y mejora los síntomas de almacenamiento (4).

La Tamsulosina está asociada a una menor capacidad vasodilatadora que otros medicamentos como la prazosina, terazosina, doxazosina o alfuzosina, debido a su selectividad con tejidos prostáticos: La afinidad para la próstata sobre el tejido arterial mesentérico es 10 veces mayor (según la proporción de afinidades molares). Estudios de unión de radioligandos han mostrado que la Tamsulosina es de 3.9 a 38 veces más afín a ARs α_{1A} que a α_{1B} , y de 3 a 20 veces más que α_{1D} . (4).

1.1.3. Propiedades farmacocinéticas

La Tamsulosina muestra una cinética lineal después de la administración de dosis únicas y múltiples. Las concentraciones plasmáticas se asocian con una considerable variabilidad interindividual, y las concentraciones plasmáticas en estado estacionario generalmente se alcanzan en 4 a 7 días. La tamsulosina de liberación modificada tiene una biodisponibilidad de 100% bajo condiciones de ayuno, con incrementos del 30% en el área bajo la curva (ABC) de la concentración de droga en plasma contra el tiempo, y de 40 a 70% en la concentración media máxima de fármaco en plasma (C_{max}) relativo a la administración después de la comida (4).

Parámetro	Valores
C_{max}	2.5-3.6 ^a y 3.1-5.3 ^b µg/L
T_{max}	≈ 6 hrs
F	100 %
Vd	16 L/kg
$T_{1/2}$	9-13 ^c y 14-15 ^d hrs
CL	2.88 L/h

Tabla 1. Parámetros farmacocinéticos de la tamsulosina. Datos obtenidos de la administración oral (4).

^a Dosis de 0.8 mg; ^b Dosis de 0.4 mg (5).

^c En voluntarios sanos; ^d En ancianos.

C_{max} = Concentración máxima; T_{max} = Tiempo para alcanzar C_{max} ; F= Biodisponibilidad; Vd= Volumen de distribución; $T_{1/2}$ = Tiempo de eliminación media; CL= aclaramiento sistémico cuerpo.

Se metaboliza en el hígado vía citocromo (CYP) P450, principalmente por CYP3A4 y CYP2D6. La mayor parte de la droga se mantiene inalterada en el plasma sanguíneo (81%) tras 0.5 y 4 horas después de la administración oral (cuantificado con 0.2 mg de tamsulosina radiomarcada). 62% de la dosis total se recupera a través de la orina tras 24 horas. Se han identificado metabolitos derivados del ácido glucurónico, sulfatos y 8.7% de la dosis intacta en su desecho (4). No hay información respecto a pacientes con disfunción hepática aguda.

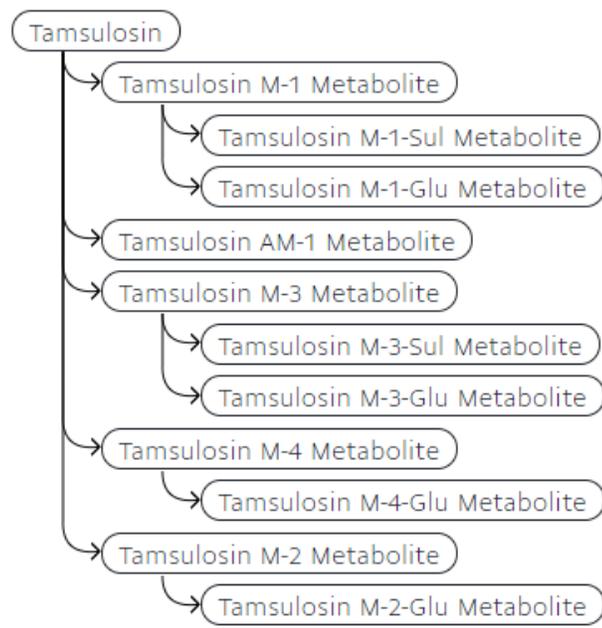


Figura 2. Productos metabólicos de la tamsulosina. La biotransformación de la tamsulosina ocurre principalmente en el hígado por el sistema enzimático citocromo P450. CYP3A4 puede desacetilar o realizar una desaminación oxidativa de la tamsulosina y generar los metabolitos derivados M1 y AM1 respectivamente. CYP2D6 puede hidroxilar o desmetilar para generar M3 o M4. Una enzima desconocida puede hidroxilar la tamsulosina en otra posición para generar M2. Los metabolitos 1, 2, 3 y 4 pueden conjugarse con ácido glucurónico. Por otro lado, los metabolitos 1 y 3 pueden conjugarse con sulfato para formar otros metabolitos antes de la excreción. Imagen tomada de DrugBank (5).

1.1.4. Efecto Terapéutico

Diversos estudios han reportado la mejoría de los pacientes con STUI tratados con tamsulosina en la disminución (mejoría) en la puntuación total de síntomas de *Boyarsky* o de Índice Internacional de Síntomas Prostáticos (IPSS por sus siglas en inglés); El índice de síntomas de *Boyarsky* era una escala previamente utilizada para evaluar los síntomas de la vía urinaria inferior, que posteriormente el IPSS fue la herramienta validada y mayor utilizado por su sencillez y eficacia, aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1992 (8). En una serie de estudios realizados en la Unión Europea (UE) y Estados Unidos de América (EUA) han validado la efectividad de la tamsulosina (4).

Las mejoras en los parámetros de eficacia con tamsulosina 0.4mg una vez al día se mantuvieron en estudios a largo plazo por hasta 4 años, y los datos agrupados preliminares

de pacientes que recibieron 0.4 o 0.8 mg una vez al día indican el mantenimiento de la eficacia por hasta 6 años (4).

1.1.5. Tolerabilidad

El perfil de tolerabilidad de la tamsulosina es de 0.4 mg al día. De acuerdo con los datos de la UE, los efectos adversos describen mareos y eyaculación anormal, en menor grado también podría causar dolor de cabeza, astenia (fatiga), hipotensión postural y palpitaciones anormales (ocurre en 1 - 2% de los pacientes con el tratamiento). Según la prescripción y efectos secundarios de EUA concuerda con el dolor de cabeza, mareos, eyaculación anormal, y además indica la rinitis (inflamación en el revestimiento mucoso de la nariz) e infecciones (4).

1.1.6. Dosis y administración

La UE aprueba las dosis de 0.4 mg, una vez al día después del desayuno para incrementar su concentración plasmática, en Japón y EUA se recomiendan dosis de 0.2 mg y 0.8 mg respectivamente. Las cápsulas deben ser tragadas enteras y debe evitar romperse, masticarse o abrirse. Sin embargo, no se ve afectada su eficacia por su administración o sincronización, a diferencia de otros α bloqueadores no selectivos. Las dosis y administración no deben ajustarse en pacientes ancianos o con disfunción de leve a moderada disfunción hepática o renal. No se han evaluado las funciones en pacientes en estado terminal de enfermedades renales, y está contraindicado para paciente con disfunción hepática severa (4).

1.2. Carvedilol

1.2.1. Generalidades

El Carvedilol es un fármaco utilizado para tratar insuficiencia cardíaca, hipertensión, e incluso para personas que han sufrido un ataque cardíaco (5), su estructura química es una aril etanolamina con que actúa bloqueando ARs tipo β_1 , β_2 y α_1 (9). Sus propiedades vasodilatadoras se deben principalmente al bloqueo de ARs tipo α_1 , esto provoca que muchos de los efectos no deseados asociados con vasodilatadores y β bloqueadores como taquicardia o vasoconstricción periférica (10). El carvedilol también se emplea en el tratamiento de la Insuficiencia Cardíaca Crónica (ICC), que es un problema con una prevalencia de 0.5 – 2% a nivel mundial asociado con altas proporciones de morbilidad y mortalidad, donde las rutas neurohormonales como el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema renina-angiotensina se activan inicialmente para compensar la respuesta y mantener la presión sanguínea, sin embargo llevan al deterioro de la función ventricular (10). Obtuvo la aprobación de la FDA el 14 de septiembre de 1995 (5).

1.2.2. Propiedades Farmacodinámicas

El medicamento se compone de una mezcla racémica de sus dos enantiómeros, R(+) y S(-) (9), bloquea β_1 ARs con una constante de disociación (K_d) de 0.8 nmol/L, 1 nM para β_2 y de 11 nM para α_1 (10). El carvedilol reduce la taquicardia a través del antagonismo adrenérgico beta y disminuye la presión arterial a través del antagonismo adrenérgico alfa (5).

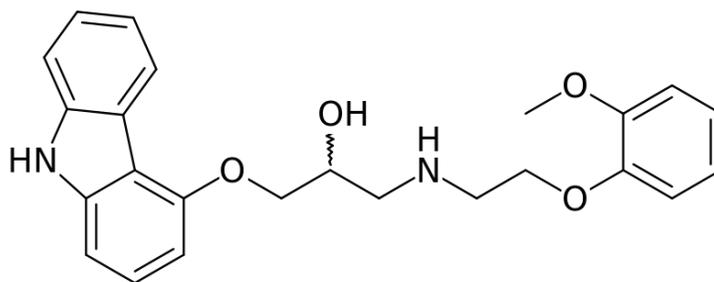


Figura 3. Estructura química del carvedilol. (RS)-[3-(9H-carbazol-4-iloxi)-2-hidroxiopropil][2-(2-metoxifenoxi) etil]amina de acuerdo con la IUPAC. Imagen tomada de Wikipedia (11).

Los efectos a largo plazo del tratamiento con carvedilol se asocia con una reducción en el ritmo cardiaco en pacientes con ICC, y mejora la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI). Mostró mejores incrementos de la línea basal de los índices de volumen sistólico e índices de trabajo sistólico que el metoprolol, otro beta bloqueador no específico (10).

La actividad cardioprotectora que se ha reportado en el carvedilol se ha atribuido a sus efectos antioxidantes: Estudios *in vitro* han demostrado que inhibe la peroxidación de lípidos y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), previene la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y agotamiento de antioxidantes endógenos como el tocoferol y glutatión: Una parte de su estructura bioquímica es un carbazol, de ahí sus propiedades que no se han reportado con la misma intensidad en otros β bloqueadores (10,12–14).

1.2.3. Propiedades Farmacocinéticas

El carvedilol es rápidamente absorbido tras su administración oral, en pacientes con cirrosis, la C_{max} y su biodisponibilidad es significativamente mayor que los controles y una menor tasa de aclaramiento (9): En pacientes saludables la biodisponibilidad está entre un 22 y 24% debido a su primer paso sustancial por el metabolismo hepático. La velocidad de absorción es ligeramente menor después de consumir con alimentos, es altamente lipofílico

y se distribuye en tejidos extravasculares. Hay una relación lineal en las dosis de carvedilol y las concentraciones séricas (5).

Parámetro	Valores
C _{max}	21-67 ^a y 66-122 ^b µg/L
T _{max}	1-2 hrs
F	≈ 25%
Vd	1.5 -2 L/kg
T _{1/2}	7-10 hrs
CL	30-42 L/h

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos del carvedilol. Datos obtenidos de su administración vía oral en estudios de dosis única y múltiple, en voluntarios sanos y pacientes con hipertensión (10).

^a Dosis de 25 mg; ^b Dosis de 50 mg.

C_{max}= Concentración máxima; T_{max}= Tiempo para alcanzar C_{max}; F= Biodisponibilidad; Vd= Volumen de distribución; T_{1/2}= Tiempo de eliminación media; CL= aclaramiento total del cuerpo.

Su metabolismo se hace principalmente en el hígado, predominantemente en el CYP P450 CYP2D6 y CYP2C9 con una eliminación menor al 2% vía urinaria (9). Es esterosectivo para la forma S(-)- que el R(+)- ya que dura más tiempo en el plasma sanguíneo, esto además puede indicar una carencia anormal de debrisoquina (10).

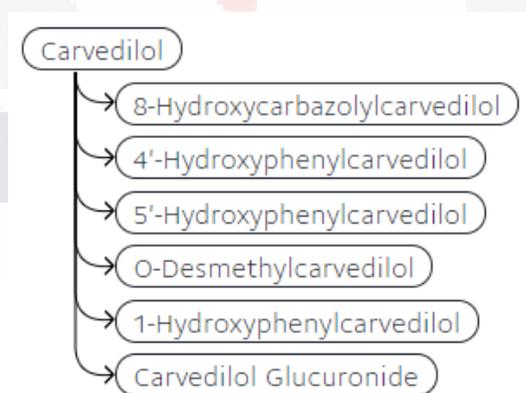


Figura 4. Productos metabólicos del carvedilol. El carvedilol se metaboliza en el hígado vía citocromo P450. CYP2D6, CYP1A2 o CYP1A1 pueden hidroxilar el carvedilol en la posición 1 para generar 1-hidroxifenilcarvedilol; CYP2D6, CYP2E1, CYP2C9 o CYP3A4 en la posición 4 para formar 4'-hidroxifenilcarvedilol; CYP2D6, CYP2C9 o CYP3A4 en la posición 5 para formar 5'-hidroxifenilcarvedilol; CYP1A2, CYP3A4 o CYP1A1 en la posición 8 para formar 8-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hidroxicarbazolilcarvedilol. El carvedilol también puede ser desmetilado por CYP2C9, CYP2D6, CYP1A2 o CYP2E1 para formar O-desmetilcarvedilol u O-glucuronidado por UGT1A1, UGT2B4 y UGT2B7 para formar glucurónido de carvedilol. El carvedilol y sus metabolitos pueden conjugarse con un grupo sulfato o glucurónico adicional antes de su eliminación. Imagen tomada de DrugBank (5).

1.2.4. Efecto Terapéutico

De acuerdo con los estudios del El Programa de Ensayos de Insuficiencia Cardíaca de Carvedilol de EUA, que incluyó con cuatro ensayos clínicos aleatorios controlados doble ciego controlados con placebo, sobre pacientes con ICC de etiología isquémica o no isquémica de gravedad variable (clase II-IV), reveló que la mortalidad por todas las causas fue significativamente menor en carvedilol (con dosis de 12.5 – 100 mg/día) que el placebo. Además, el riesgo de hospitalización por cualquier causa cardiovascular fue significativamente menor (10).

El ensayo de supervivencia acumulada aleatoria prospectiva de Carvedilol (COPERNI-CUS) demostró que dosis de 25 mg dos veces al día se reduce el riesgo de mortalidad por todas las causas, y el punto final combinado de muerte u hospitalización por cualquier en pacientes con ICC grave. Análisis adicionales de los datos revelaron que el carvedilol tuvo efectos beneficiosos en otros puntos finales clínicos, como la tasa combinada de muerte u hospitalización por causa cardiovascular y la tasa combinada de muerte u hospitalización por insuficiencia cardíaca en pacientes que recibieron o no espirolactona concomitante (10).

En el ensayo CAPRICORN, el carvedilol en combinación con la terapia convencional redujo la mortalidad e inhibió la remodelación miocárdica en mayor medida que el placebo y la terapia convencional en pacientes con disfunción ventricular izquierda siguiendo MI agudo. Además, se encontraron efectos benéficos de la terapia con carvedilol en puntos finales clínicos adicionales como, arritmias supraventriculares y ventriculares (10).

1.2.5. Tolerabilidad

El carvedilol es bien tolerado en pacientes con ICC en ensayos aleatorizados, doble ciego, tolerabilidad, controlados con placebo. Sin embargo los eventos adversos asociados con los efectos de bloqueo α y β del medicamento ocurrieron con mayor frecuencia en el grupo con carvedilol que en el placebo de pacientes con insuficiencia cardíaca leve a grave (9). En general, la incidencia de eventos adversos graves fue significativamente menor con carvedilol que con placebo. El inicio de la terapia con carvedilol fue bien tolerado.

El carvedilol tuvo una tolerabilidad similar al metoprolol en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva leve a grave en el ensayo COMET aleatorizado, doble ciego (10).

1.2.6. Dosis y Administración

De acuerdo con la información de Reino Unido y EUA, se administra vía oral para pacientes con falla cardíaca media o aguda, que se utiliza usualmente con inhibidores ACE, diurético y digoxina (opcional). En EUA se aprueba para reducir la mortalidad en pacientes que son clínicamente estables después del infarto al miocardio agudo y quienes tienen disfunción en el ventrículo izquierdo. Pacientes con ICC suelen tratarse con 3.125 mg dos veces por día al inicio de la terapia. Puede incrementarse de ser necesario. La dosis máxima recomendada en pacientes con falla cardíaca moderada con más de 85 Kg son 50 mg dos veces por día (10).

1.3. Adrenoreceptores

1.3.1. Generalidades

Los ARs pertenecen a la amplia familia de los receptores acoplados a proteínas G, que son la familia más grande de proteínas de membrana que median la mayoría de las respuestas celulares. Se caracterizan por la presencia de siete segmentos α -helicoidales que abarcan

membranas separados por un bucle intracelular y extracelular alterno (15), su activación depende de la hidrólisis de guanosín trifosfato (16).

Tienen una identidad de aminoácidos del 32 al 54 % entre sí. Son los encargados de mediar los diversos efectos de los neurotransmisores del SNS a través de la señalización con adrenalina o epinefrina (EPI), y noradrenalina o norepinefrina (NEPI) en prácticamente todos los sitios del cuerpo (17). Se ven implicados en señales hormonales, neurotransmisores, percepción de luz, gusto olfato etc.

Juegan un papel importante en trastornos psiquiátricos como depresión y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, en la modulación de la hemodinámica, la regulación de la temperatura corporal y del metabolismo (18).

Los ARs se han dividido en tres principales categorías tras estudiarla en clonas, sin embargo hay datos farmacológicos que sugieren la existencia de subtipos, que ahora parece probable que este resulta de múltiples "estados de afinidad" de un particular subtipo de AR (17). Sus ligandos son las catecolaminas, más específicamente adrenalina (hormona) y noradrenalina (neurotransmisor). Estas moléculas se sintetizan a partir de L-tirosina o fenilalanina por células catecolaminérgicas (Figura 5). Tienen un grupo catecol (benceno dihidroxilado) y una cadena lateral etil amina modificada que les confiere su nombre (19).

Los estímulos nerviosos que llegan a las neuronas del SNS preganglionares libera el neurotransmisor acetil-colina, quien estimula a los receptores nicotínicos en neuronas post ganglionares o en feocromocitos, que a su vez liberan EPI y NEPI (19).

Las glándulas suprarrenales se ubican en la parte superior de los riñones. Su corteza produce glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos, mientras que el interior, denominado médula (alrededor del 10-20% de su tamaño) sintetiza EPI y NEPI. Los nervios del sistema nervioso simpático liberan NEPI en órganos efectores (20). Estas catecolaminas se liberan en situaciones de estrés, ira, ansiedad, o bien, por reacciones alérgicas o hipotensión.

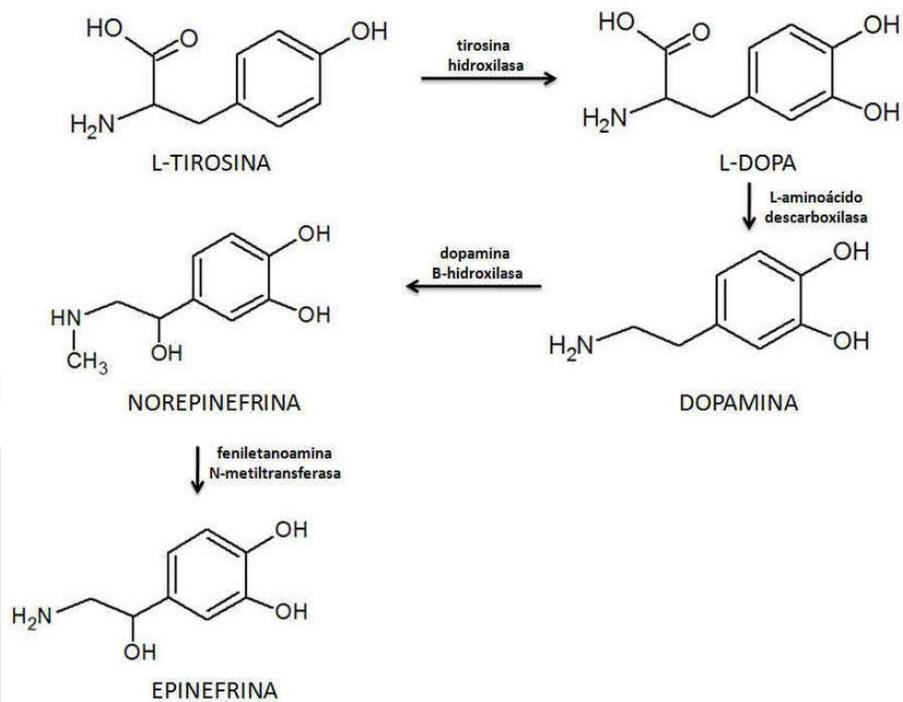


Figura 5. Biosíntesis de catecolaminas. En el esquema se representa la estructura química y la ruta metabólica que siguen las células catecolaminérgicas para producir Dopamina, Epinefrina y Norepinefrina. Imagen tomada de Melin Coloma (2014) (21).

1.3.2. Adrenoreceptores Alfa 1

Se encuentran ampliamente distribuidos en sitios centrales como periféricos, y se activan por la NEPI liberada del nervio simpático, terminales o por la EPI liberada por la médula suprarrenal y algunas neuronas adrenérgicas centrales. En la periferia median una variedad de funciones, incluida la contracción del músculo liso, estimulación cardíaca, proliferación celular/apoptosis y activación de la gluconeogénesis y glucogenólisis hepáticas. En el sistema nervioso central (SNC) su activación generalmente da como resultado la despolarización y un aumento de la descarga neuronal. Estos receptores están acoplados a la proteína $G_{q/11}$, quien activa a la fosfolipasa C, que a su vez incrementa la concentración de inositol trifosfato y de calcio intracelular, aunque hay evidencia de activación de adenylil ciclase dentro del SNC (22).

Se han clonado tres tipos diferentes de AR $\alpha 1$ cuya distribución y función en los tejidos nativos es muy particular, la mayoría de los estudios se han hecho en modelos murinos, donde se analizaron las concentraciones más altas de ARNm de cada receptor. La información en el cerebro humano algo limitada (17).

- $\alpha 1A$. Se distribuyen en regiones del sistema olfativo, núcleos hipotalámicos y en regiones del tronco encefálico y espinal relacionados con la función motora. En el ser humano se encuentran en microvasos sanguíneos.
- $\alpha 1B$. Estudios mostraron una alta cantidad en la corteza cerebral, tálamo, núcleos del rafe, craneales y neuronas motoras espinales, así como la glándula pineal.
- $\alpha 1D$. Localizados principalmente en el bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, circunvolución dentada, núcleo talámico reticular, neuronas motoras, y el complejo olivar inferior.

Se distribuyen de manera diferente en los tejidos del cuerpo, lo que les da un perfil farmacológico muy interesante. La abundancia de proteínas los hace blanco de un tipo selectivo de antagonistas.

1.3.3. Adrenoreceptores Alfa 2

Se caracterizan por la inhibición mediada *pre junction* (antes de la sinapsis) de la liberación de neurotransmisores de muchas neuronas periféricas y centrales. Lo que da como resultado una acción simpatolítica. Estos receptores están acoplados a proteínas tipo G_i , que inhiben la enzima adenilato ciclasa y reduce los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). También están presentes en sitios de post sinapsis, donde median acciones como contracción muscular, agregación plaquetaria e inhibición de la secreción de insulina (17). Este tipo de receptores también se han estudiado tres clonas en modelos murinos.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- $\alpha 2A$. Es el más ampliamente distribuido, se encuentra en la corteza cerebral, locus coeruleus, amígdala, núcleo paraventricular hipotalámico, *nucleus tractus solitarii*, ventrolateral formación reticular, médula espinal y ganglios de la raíz dorsal. Ensayos de unión de radioligandos en el cerebro humano demuestran su presencia en la corteza frontal, el cerebelo y el hipocampo, con otro subtipo (2B o 2C) predominante en *neostriatum*.
 - $\alpha 2B$. Se encuentra casi exclusivamente en el tálamo.
 - $\alpha 2C$. Se encuentra en bulbo olfatorio, islas de calleja, cerebral y corteza cerebelosa, formación hipocampal y ganglios de la raíz dorsal.

1.3.4. Adrenoreceptores Beta

Tienen funciones muy variadas donde se incluyen la estimulación de la frecuencia cardíaca y fuerza, relajación vascular, urogenital y músculo liso bronquial, estimulación de la secreción de renina del aparato yuxtglomerular, estímulo de secreción de insulina y glucagón del sistema endocrino páncreas, estimulación de la glucogenólisis en el hígado y músculo esquelético, y estimulación de la lipólisis en adipocitos (17).

Los receptores *pre junction* están presentes en algunas terminales nerviosas centrales y periféricas, cuya estimulación provocada la liberación de neurotransmisores, la mayoría de ellas mediadas por la interacción del complejo agonista-receptor con Gs y la adenilil ciclasa. Provocando un aumento en la concentración de cAMP (22).

De este tipo de receptores se han clonado tres tipos diferentes, que están bien caracterizados en tejidos nativos y cuya abundancia se ha estudiado por medio de la presencia de ARNm en modelos murinos (17):

- $\beta 1$: Media la liberación de renina. Se encuentra abundante en el cerebro, estudios de radioligandos los asocian típicamente con estructuras del prosencéfalo (corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo).

- β_2 : Media la broncodilatación. Se encuentra en el bulbo olfatorio, formación del hipocampo, corteza piriforme y corteza cerebelosa.
- β_3 : Es responsable de la lipólisis en el tejido adiposo blanco y termogénesis en el tejido adiposo marrón (encontrado en roedores). No parece estar presente en el SNC.

Otras funciones atribuidas a los receptores adrenérgicos β centrales incluyen la adaptación al estrés, la memoria y el aprendizaje, el control de la respiración, y proliferación glial.

1.4. El hígado y su relación con el sistema nervioso simpático

El tejido hepático se conforma principalmente por hepatocitos o células parenquimatosas, constituyen alrededor del 80% del tejido y tienen un tamaño entre 15 - 25 μm . El 20% restante del hígado se conforma de las células no parenquimatosas como las de Kupffer (30%), las células sinusoidales endoteliales (60%) y las células estrelladas hepáticas (CEHs) o de Ito (10%), que suelen tener tamaños menores a los 10 μm . Existen otras células en el parénquima hepático, pero en una proporción mucho menor que cumplen otras funciones, como las células epiteliales del ducto biliar o las células dendríticas, que tienen características morfológicas y funcionales bien definidas (23).

Las CEHs y las células ovasales hepáticas (COHs) juegan un papel sumamente importante en la reparación del hígado. Las CEHs se activan tras una lesión hepática de cualquier tipo y pasan a un fenotipo parecido a los miofibroblastos, con capacidad proliferativa, contráctil y fibrogénica (24). Cuando se activan, tienen la capacidad de secretar citocinas proinflamatorias y de matriz extracelular (MEC) (25).

La transformación y proliferación de las CEHs está regulada por diversas señales que se dan dentro del mismo hígado, como las sustancias que liberan los hepatocitos dañados y las células de Kupffer activadas, el mismo infiltrado inflamatorio también contribuye en su activación (26).

Las COHs son células progenitoras residentes en el hígado que ayudan a regenerar el compartimento epitelial hepático. Se activan cuando los hepatocitos maduros alcanzan un número críticamente bajo, después de una lesión hepática, o cuando se evita que los hepatocitos maduros se dividan por fármacos hepatotóxicos (24). En condiciones las CEHs quiescentes cumplen principalmente como almacenamiento de la vitamina A en forma de gotas lipídicas, y se caracterizan por la expresión de una gran cantidad de genes adipogénicos y de marcadores neurales (27).

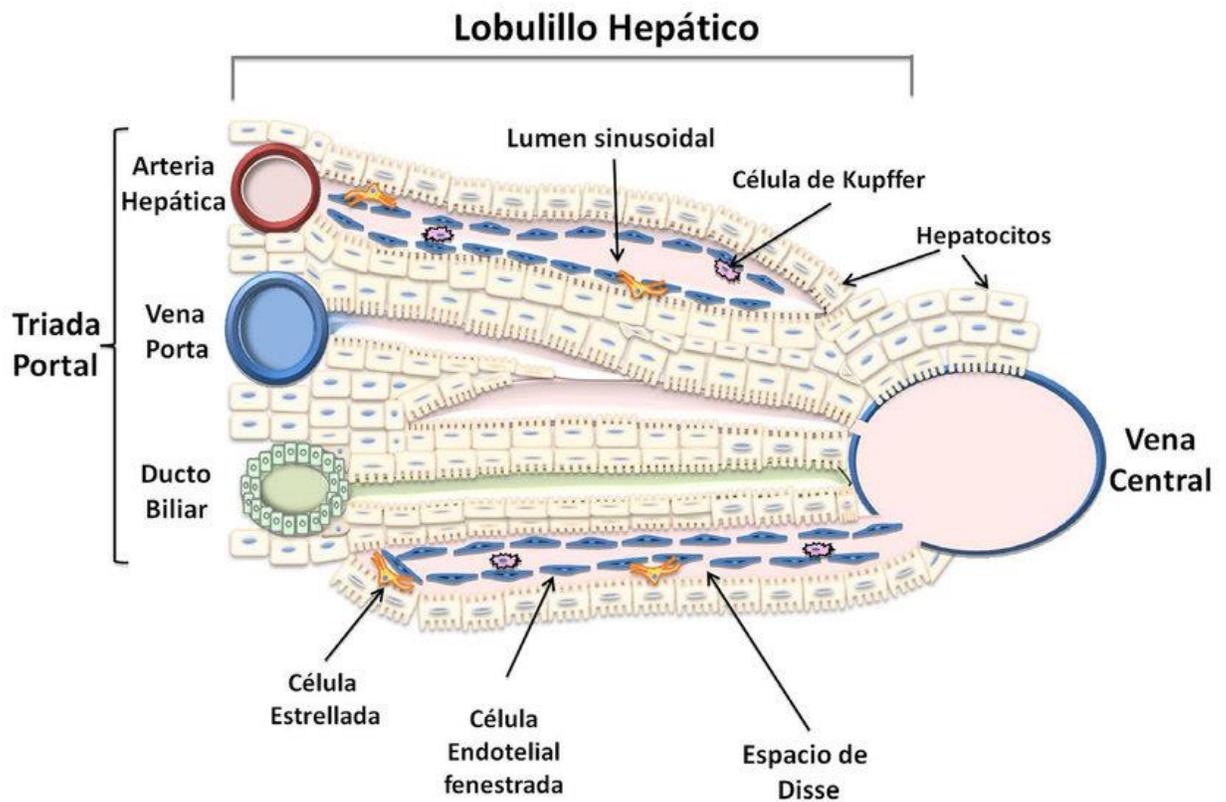


Figura 6. Arquitectura celular del lobulillo hepático. Se representa la distribución y población celular que conforman la unidad estructural del hígado. En una sección transversal se observaría como hexágonos cuyas las tríadas portales se localizan en los ángulos y la vena centrolobulillar en el centro. Imagen tomada de Delgado-Coello (2017) (28).

Para estudiar las células parenquimatosas del hígado, se han utilizado diversos modelos *in vivo* e *in vitro*, siendo uno de ellos la línea celular derivada del hepatoblastoma; es una

neoplasia maligna embrionaria de origen hepatocelular y el tumor vivo primario más común de la infancia, que a menudo se presenta en los primeros años de vida (29).

Las células HepG2 se han utilizado ampliamente como modelo para estudiar el comportamiento de las células en campos como el metabolismo del hígado, el desarrollo, la oncogénesis (quimiocarcinogénesis y mutagénesis) y la hepatotoxicidad (30).

El hígado está inervado por distintas fibras del SNS, en el parénquima hay varias fibras del sistema nervioso autónomo distribuido en el espacio de *Disse* (31): El plexo hepático consta de fibras simpáticas del plexo celíaco y fibras parasimpáticas del tronco vagal anterior y posterior. Estas fibras acompañan a los vasos y conductos biliares dentro de la tríada portal y se extienden en el órgano (32). El rol de los receptores del SNS en el proceso de fibrosis aún es un campo de estudio (31). En un análisis del lisado de CEHs primarias encontraron que expresan ARNm de los ARs α_{1B} , α_{1D} , β_1 y β_2 . Un estudio que se hizo para determinar si la NEPI endógena es importante para su crecimiento, se cultivaron en presencia y en ausencia de prazosina o propranolol en concentraciones de 10 μ M, y evaluaron su crecimiento. En los resultados se mostró que ambos medicamentos redujeron los números de CEHs en un 20%, y su combinación disminuyó el crecimiento en un 50%, lo que demostró que las acciones inhibitoras del crecimiento de los antagonistas son aditivos (24).

Se conoce que las células estelares hepáticas aisladas responden a la NEPI con la producción y liberación de prostaglandinas, que tienen un efecto antiproliferativo de las células activadas, por lo que se puede inferir que las catecolaminas tienen un efecto positivo contra la fibrosis (27,33). Otros estudios de CEHs cultivadas de ratones deficientes de NEPI mostraron que esta catecolamina es un factor de crecimiento autocrino, es decir que tiene una regulación local. Además, aumenta el crecimiento de la CEHs de una manera dependiente de la dosis. El neuropéptido Y también promueve su crecimiento (24).

1.5. Fibrosis Hepática

La fibrosis puede definirse como un complejo proceso de reparación que aparece tras un daño hepatocelular mantenido, donde intervienen diversos tipos celulares y citocinas profibrogénicas. En fases avanzadas, parte de la población normal de hepatocitos se sustituye por MEC, formada por colágeno fibrilar y otras proteínas como fibronectina y glucosaminoglicanos (25), que le confieren rigidez a los tejidos y bloquea físicamente la comunicación con otras células, la sobreexpresión de dichas proteínas forman nódulos fibrosos, que en el peor de los casos puede evolucionar hasta cirrosis (27). Dicho proceso de reparación tisular se lleva a cabo por las CEHs y fibroblastos portales, que responden ante un daño en el parénquima, que puede manifestarse en el cuadro clínico de diferentes enfermedades crónicas del hígado como hepatitis, hígado graso, alcoholismo entre otras (26). Se han descrito cuatro patrones de progresión de la fibrosis en relación con el sitio del daño, la participación de diferentes poblaciones de miofibroblastos y el mecanismo profibrogénico predominante (34):

- En puente o posnecrótica. Se encuentra típicamente en las infecciones de hepatitis viral crónica. Se inicia con la necrosis de hepatocitos en espacios porta con venas centrolobulillares (portocentral), resultado de la formación de septos portocentrales fibróticos.
- Perisinusoidal o pericelular. Común en la esteatohepatitis no alcohólica. El depósito en exceso de la MEC se encuentra distribuido principalmente en los espacios de *Disse* alrededor de los sinusoides o grupos de hepatocitos que lleva a la capilarización de las sinusoides. también puede estar asociada con la ingesta crónica de alcohol.
- Biliar. Se trata de un patrón sostenido con proliferación concomitante de ductos biliares reactivos y miofibroblastos periductulares en la interfase entre el área porta y el parénquima que da como resultado el desarrollo característico de septos fibróticos porta-porta.

- Centrolobulillar. Es secundaria y se debe a la alteración del flujo venoso como en el caso de la falla cardíaca crónica, característica de los septos fibróticos de vena central a vena central.

Factores de crecimiento como TGF- β y PDGF, adipocinas como la leptina y sustancias vasoactivas como endotelina 1, trombina y angiotensina II contribuyen a la acumulación de las CEHs activadas y además, ejercen una acción profibrogénica en hepatopatías crónicas (26). Por ello hace algunas décadas, el principal objetivo de las investigaciones respecto a tratamientos y maneras de revertir la fibrosis eran bloquear factores de crecimiento (35). Por otro lado, hay creciente evidencia de que las sustancias vasodilatadoras como óxido nítrico y diversas citocinas como el interferón alfa (IFN- α) o el factor de crecimiento insulínico (IGF) pueden inhibir la activación de las CEHs (26), por lo que se consideran como agentes terapéuticos potenciales. Aún no se han aprobado tratamientos que puedan revertir directa y efectivamente la fibrosis más que la eliminación directa del agente causal (25), las opciones más factibles siguen en fases de desarrollo.

1.5.1. α/β Bloqueadores contra la fibrosis hepática.

La relación entre los fármacos adrenobloqueadores y la supresión de la fibrosis reside en la relación que existe entre el SNS y el hígado. Se sabe que las células estelares hepáticas expresan α y β ARs así como la síntesis de catecolaminas para su regulación local (24) y que juegan un papel muy importante en la etiopatogenia de la fibrosis.

Recientes estudios han probado el efecto antifibrogénico de los fármacos, por su función antagonista que actúa sobre las células hepáticas encargadas del proceso de reparación por fibrosis: Un estudio evaluó marcadores de estrés en retículo endoplásmico (ERE) y daño hepático, concluyendo que el tratamiento con carvedilol mejora la condición en un modelo de cirrosis, posiblemente a través de las vías de señalización del retículo endoplásmico (RE) (36). También se ha reportado dicho efecto benéfico del carvedilol en la lesión hepática

inducida por el alcohol al tiempo que regula la expresión de factores inflamatorios a través de su efecto antioxidante (37).

Un estudio realizado en modelos de cirrosis (en ratas) tratados con 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) disminuye en un 60% la fibrosis inducida por 2 semanas con tetracloruro de carbono y 36% en animales con 6 semanas de inducción, siendo la 6-OHDA una toxina que destruye las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. También reportaron que las ratas inducidas por 2 semanas tratadas con prazosina (bloquea ARs tipo α_1) disminuyeron la fibrosis en un 83% (33).

Serna-Salas *et al.* (2018) reportó una recuperación del hígado en modelos animales de cirrosis tratados con doxazosina y carvedilol: disminuyen las fibras de colágeno, la expresión de inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-2) y aumenta la de colagenasas (MMP-13). También disminuyen los niveles de α -SMA y TGF- β . Sin embargo se registraron cambios morfológicos en hepatocitos tratados con doxazosina, y con carvedilol la expresión de biomarcadores fue irregular (38). Otro estudio realizado en hámsteres cirróticos tratados con carvedilol, doxazosina y curcumina (por separado y en combinación), reportaron resultados muy favorables: bajaron los niveles de colágeno tipo I sin afectar la morfología de los hepatocitos, los biomarcadores de función hepática presentaron niveles estables e incrementaron los niveles de expresión de ARNm de Nrf-2/NF- κ B (39). La prazosina y propranolol (α y β bloqueadores respectivamente) mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de las células estelares hepáticas (24), mientras que el carvedilol induce apoptosis y reduce la autofagia incrementando el pH lisosomal en LX-2, una línea celular derivada de CEHs (40).

Actualmente se recomienda no tratar a los pacientes con algún fármaco antifibrogénico. Se recomienda atender a los pacientes eliminando directamente el agente causal. Para los pacientes con hepatitis C crónica que no responden al tratamiento antivírico, se ha indicado que el IFN- α en bajas dosis podría disminuir del grado de fibrosis (25,41).

Una estrategia para enfermos no respondedores es el uso de medicamentos que inhiban el sistema renina-angiotensina, en especial los antagonistas de los receptores tipo 1 de la

angiotensina II (AT1). Asimismo, un estudio piloto en el que se administró losartán mostró que es bien tolerado en los pacientes con hepatitis crónica C y disminuye la expresión de genes fibrogénicos (42).

1.6. Toxicidad de los Fármacos Antifibróticos

De acuerdo con la información para prescribir, la tamsulosina está contraindicada para pacientes con hipersensibilidad al clorhidrato de tamsulosina, incluyendo angioedema inducido por el medicamento o por cualquiera de los excipientes, también para aquellos con antecedentes de hipotensión ortostática e insuficiencia hepática severa (43). No se requieren ajustes de dosis en función de la edad o insuficiencia hepática leve o moderada, a pesar de que no hay datos farmacocinéticos sobre tamsulosina en pacientes con insuficiencia hepática grave (4) ni para aquellos con insuficiencia renal (43) lo que hace cuestionable su uso en pacientes con disfunciones en el hígado.

En los registros publicados del Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK por sus siglas en inglés, Bethesda, EUA) hubo un caso publicado de lesión hepática aguda que se debió probablemente a la tamsulosina: El inicio fue 11 días después del inicio de la medicación, y el cuadro clínico fue similar a la colecistitis aguda con ictericia, dolor abdominal y fiebre, pero con un patrón hepatocelular de elevación de enzimas séricas. No se identificó evidencia de enfermedad biliar y el paciente se recuperó cuando se retiró la tamsulosina (44).

Estudios de toxicidad en modelos animales y celulares reportados por farmacéuticas señalan que hay alteraciones en el electrocardiograma en perros a dosis muy altas. También se ha observado un aumento en la incidencia de cambios proliferativos de las glándulas mamarias de ratas y ratones hembra (aumenta la tasa de fibroadenomas y adenocarcinomas), pero se desacredita su importancia clínica por las dosis manejadas. Por otro lado, no han descubierto propiedades genotóxicas relevantes (43). Incluso, se ha propuesto que tiene un efecto protector como lo sugiere Randle *et al.* (2008) quienes concluyeron que la tamsulosina (y otros alfa bloqueadores) protegen contra la

hepatotoxicidad inducida por paracetamol *in vivo* (45). En una revisión de diferentes estudios *in vitro* donde se evalúan los efectos de antagonistas de los receptores adrenérgicos α_1 sobre diferentes tipos de cáncer (PC-3, LNCaP y DU-145), demostraron que la doxazosina, prazosina y terazosina inducen apoptosis, disminuye el crecimiento y proliferación. El naftopidil detiene el ciclo celular (LNCaP-E9). Sin embargo los grupos tratados con tamsulosina, no mostraron dichos efectos (46). La tamsulosina se ha asociado con una tasa baja de elevaciones de las aminotransferasas séricas (<2%) que en los ensayos controlados no fue mayor que con el placebo o la terapia con agentes comparativos (44). La dosis letal media (LD50) del fármaco en ratas es de 650 mg/Kg (5).

Aún no hay evidencia concluyente que asocie casos de insuficiencia o lesión hepática con tamsulosina. No hay información sobre la reactividad cruzada de la lesión hepática entre los diversos antagonistas de los receptores adrenérgicos como alfuzosina, silodosina, doxazosina y terazosina, pero la similitud de la estructura química sugiere que puede haber sensibilidad cruzada (44).

El carvedilol por otro lado, está contraindicado para pacientes que presenten una reacción de hipersensibilidad al fármaco o cualquiera de los componentes de la forma farmacéutica, y aquellos con insuficiencia hepática clínicamente manifiesta e Insuficiencia cardiaca inestable/descompensada (47). Un conjunto de estudios clínicos realizados en poblaciones de pacientes con hipertensión e insuficiencia renal, muestran que el ABC de la concentración plasmática del fármaco a lo largo del tiempo indica que la vida media de eliminación y la C_{max} plasmática no cambian en forma significativa, por lo que no se sugieren cambios en la dosificación (48).

Una de las complicaciones más comunes en pacientes cirróticos es el desarrollo de ascitis, que consiste en la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal. Se estima que 60% de los pacientes con cirrosis desarrollarán ascitis después de 10 años desde su diagnóstico (49), cuyas tasas de supervivencia suelen ser de 85% durante el primer año y del 56% a los 5 años sin trasplante de hígado (50).

En su fisiopatogenesis, la hipertensión portal es el principal factor responsable del desarrollo de la vasodilatación esplácnica y de la disminución del volumen sanguíneo arterial efectivo debido a factores vasodilatadores (como óxido nítrico, monóxido de carbono y los cannabinoides endógenos). Lo anterior conduce a la activación de factores antinatriuréticos y vasoconstrictores (Sistema renina-angiotensina-aldosterona, SNS y arginina vasopresina) con la consiguiente retención de sodio (50).

Para tratar la hipertensión portal, descrita como una de las causas de la ascitis, suelen recomendarse beta bloqueadores no específicos (BBNE) (51), que son la única clase de fármaco aprobada para el tratamiento a largo plazo. Además se emplean para la profilaxis primaria y secundaria contra la hemorragia varicosa (junto con la ligadura con banda endoscópica), varios ensayos clínicos aleatorios controlados demuestran su eficacia (52). Sin embargo, un metaanálisis que incluyó nueve estudios observacionales en pacientes cirróticos con ascitis medicados con BBNE, diferenciando el tipo de ascitis (refractaria y no refractaria) y el tipo de bloqueador, no encontró diferencias significativas en la causa de muerte ni entre el propranolol y nadolol, pero sí un aumento de mortalidad en carvedilol por todas las causas (53). Además, los datos farmacocinéticos en pacientes cirróticos muestran que el ABC, la C_{max} y biodisponibilidad incrementa significativamente en comparación con los sujetos sanos.

Todo lo anterior pone en tela de juicio su seguridad en pacientes con lesiones en el hígado. El prospecto del carvedilol indica que menos del 2% de los pacientes tratados presentan aumentos en los niveles séricos de aminotransferasas (leves/moderados), éstos suelen ser transitorios y asintomáticos, que se resuelven incluso con la continuación del tratamiento (54,55).

En un estudio realizado por *McKee* y colaboradores (2013) con un modelo de esteatohepatitis no alcohólica tratado con el beta bloqueador propranolol, que también lo propuso ampliamente para revertir la fibrosis, sin embargo encontraron que empeora la condición del hígado (56). En un estudio de caso se relacionó la toma de carvedilol con la lesión hepática clínicamente aparente, surgió 6 meses después de comenzar el tratamiento y un patrón mixto de elevaciones de enzimas sin ictericia o signos de hipersensibilidad o

autoinmunidad (54). Otro caso presentó prurito en todo el cuerpo y las transaminasas séricas elevadas en el tratamiento de carvedilol y posteriormente, metoprolol (55).

En un reporte de hepatitis tóxica se relacionó con la medicación por carvedilol, los autores mencionan que es el segundo caso donde el fármaco conduce a la lesión de los conductos biliares por metabolitos tóxicos, lo que resultó en una hepatitis de patrón mixto con posible progresión a síndrome colestásico crónico y cirrosis (57). En todos los casos hubo una mejoría tras la suspensión inmediata de la medicación, sin embargo, se desconocen los mecanismos de la lesión hepática. Se sugiere que es por una reacción idiosincrásica al fármaco o un metabolito (54), en la etapa intrahepática del metabolismo farmacológico podría generarse la toxicidad por medio de la alteración de proteínas intracelulares por enlaces covalentes generados a través del CYP P450, disrupción de proteínas transportadoras de bilirrubina en la membrana canalicular, formación de aductos con potencial inmunogénico que conducen a la destrucción celular mediada por anticuerpos o por acción citotóxica directa, activación de la apoptosis a través de las vías TNF- α y Fas, lesión directa de la mitocondria con compromiso de la respiración aeróbica y estrés oxidativo, y lesión directa de los canalículos biliares por metabolitos tóxicos excretados en la bilis (57).

A pesar de su aprobación por la FDA desde los 90s, y las aplicaciones novedosas que se están estudiando, hay una falta de información respecto a los efectos toxicológicos que generan de manera aislada sobre las células que conforman el parénquima hepático; Tanto la tamsulosina como el carvedilol son fármacos que se metabolizan vía CYP P450 (4,10), que es un sistema multienzimático para metabolizar xenobióticos, distribuido principalmente en las membranas subcelulares de los hepatocitos (58). Son medicamentos contraindicados en pacientes con insuficiencia hepática, ya que la sustancia química o los metabolitos derivados de su biotransformación pueden alterar la homeostasis celular y llevar a más problemas de salud derivados de su toxicidad (59).

Los daños que pueden provocar los agentes farmacológicos en el hígado es un serio problema de salud que se ha estudiado con anterioridad, es la principal causa por la que se retiran medicamentos del mercado y de muerte por fallo hepático (60).

Uno de los principales problemas de la hepatotoxicidad que generan los medicamentos es la carencia de información que se tiene al respecto. Los principales obstáculos es que la mayoría de datos se obtienen de datos retrospectivos, notificaciones del personal sanitario y que no se disponen de biomarcadores específicos (60).

La hepatotoxicidad inducida por fármacos puede activar una serie de mecanismos celulares a consecuencia de su interacción con los fármacos. La exposición a los xenobióticos puede regular el metabolismo de fármacos (fase I, II y III), estrés intracelular, inhibición de la bomba de exportación de sales biliares, respuesta inmune (innata y adaptativa) y muerte celular (59).

1.7. Homeostasis del Retículo Endoplásmico.

Recientemente se ha reconocido el importante papel que desempeña el RE en la fisiopatología de varias enfermedades del hígado, como hepatitis, hígado graso, hepatotoxicidad inducida por fármacos entre otras (61). El RE cumple funciones vitales en la célula como la biosíntesis de lípidos, almacenamiento de calcio y en el proceso de síntesis, plegamiento, ensamblaje, tráfico, postmodulación y control de calidad de las proteínas. El estrés oxidativo, hipoxia, privación de energía, interacción con xenobióticos o desbalances en la homeostasis celular pueden desencadenar fallos de los controles de calidad, en la capacidad de plegamiento y eliminación de proteínas, lo que se le denomina estrés reticular (62), cuyos efectos se explican a detalle a continuación.

El RE, es el organelo más grande de la célula, forma parte del sistema endomembrana, y es un sitio muy importante de síntesis y transporte de proteínas, plegamiento de proteínas, síntesis de lípidos y esteroides, metabolismo de carbohidratos y almacenamiento de calcio (63). Su tamaño depende del tipo celular, en hepatocitos llega a representar hasta un 51%

de la superficie membranal y 13% del volumen, ya que en éstos se encuentra el sistema de detoxificación CYP P450 (58).

Clásicamente se divide en liso (REL) y rugoso (RER) en función de los ribosomas anclados en la superficie citosólica de la membrana. Una clasificación más contemporánea divide al RE en tres dominios: la envoltura nuclear, las cisternas en forma de lámina y la matriz poligonal de túbulos. (64) Dadas las condiciones tan específicas del ambiente, es muy sensible al estrés, puede perder la homeostasis lo que resulta en la acumulación y agregación de proteínas mal conformadas (62).

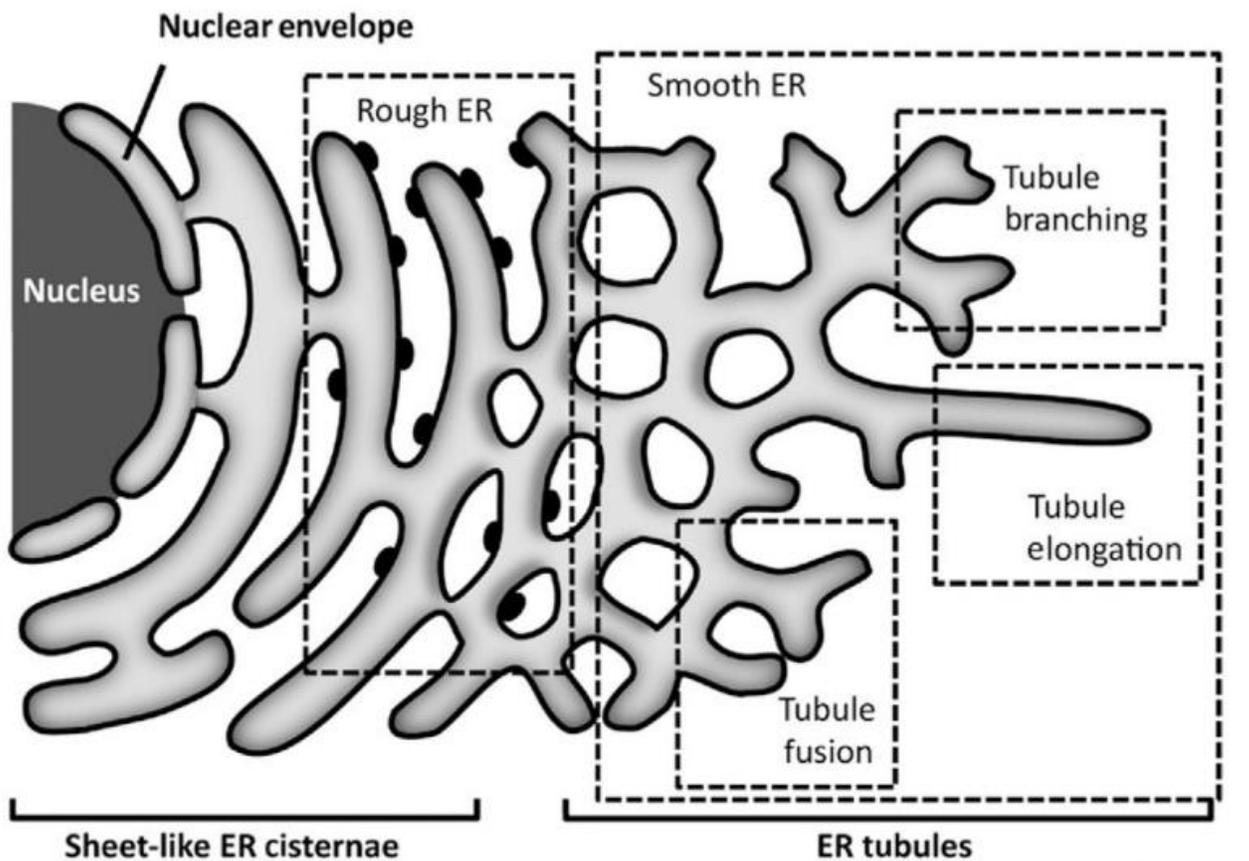


Figura 7. Partes del retículo endoplásmico. El RE es una red de membranas que abarcan gran parte del citoplasma. El RER es una serie de pilas de cisternas aplanadas con ribosomas que le dan la apariencia rugosa. El REL por otra parte, son membranas muy curvas y tubulares, que tiene un papel muy importante en la dinámica del organelo: los túbulos son capaces de fusionarse, elongarse y ramificarse, para ello requieren de la actividad de una familia de proteínas denominadas atlastinas. Imagen tomada y modificada de Bravo R. y colaboradores (2013) (64).

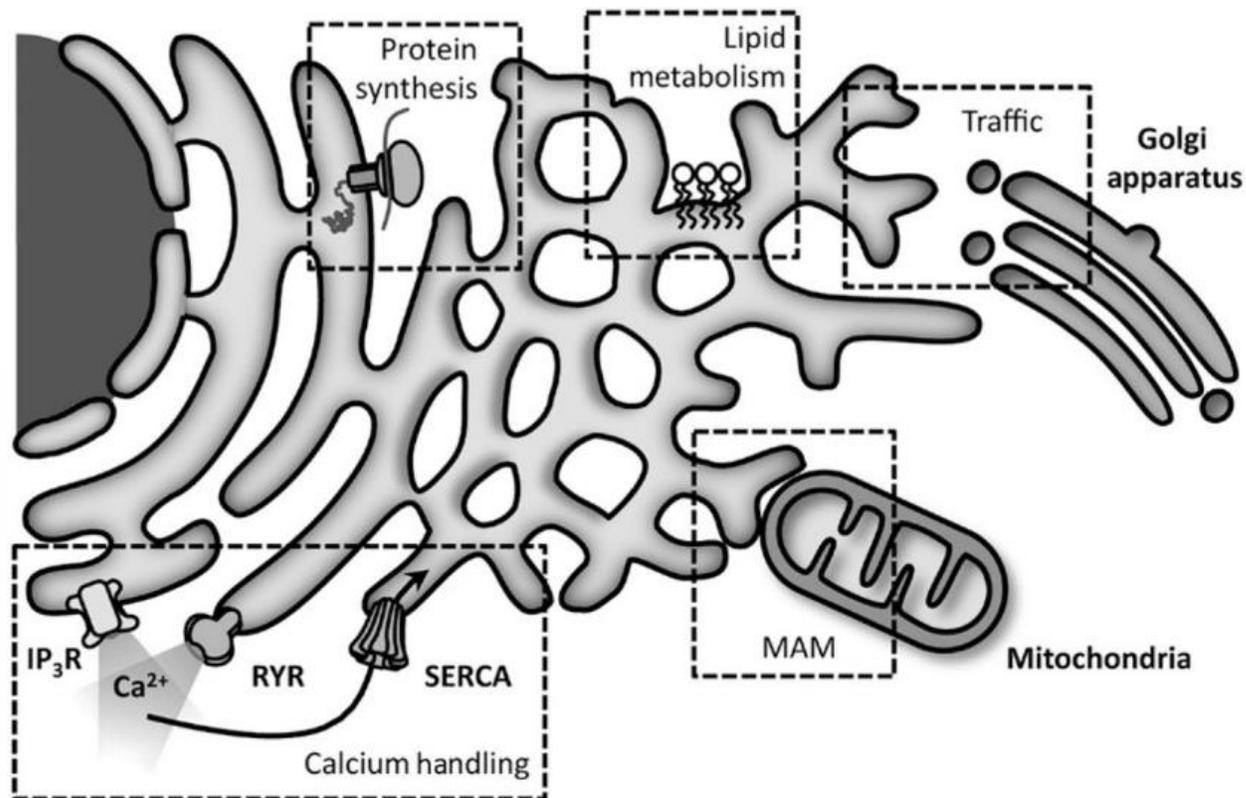


Figura 8. Funciones del retículo endoplásmico. Las funciones más importantes del RE en el funcionamiento de la célula son: en el almacenamiento de calcio, tráfico de vesículas, síntesis de proteínas y lípidos, e interactuando con otros organelos en zonas de la membrana del RE asociada a las mitocondrias. Imagen modificada de Bravo R y colaboradores (2013) (64).

Los proteomas de las células son muy complejos, en eucariontes llegan a expresarse hasta más de 10.000 tipos de proteínas en determinado momento y varía su expresión entre los tipos de células y tejidos (65). Generalmente la forma nativa de las proteínas es energéticamente estable, sin embargo éstas deben de navegar por un ambiente donde la interacción con otras biomoléculas y la composición del medio las pone en riesgo de adoptar estructuras energéticamente inestables, e incluso agregados y formas más estables, y sin función en consecuencia (66). En condiciones fisiológicas normales, el organismo se sirve de una compleja red de mecanismos moleculares que comprende chaperonas, enzimas y sus reguladores, para asegurar el mantenimiento de la homeostasis en el proteoma celular, denominado proteostasis. Dichos factores coordinan la síntesis de

proteínas con el plegamiento de polipéptidos, la conservación de la conformación de proteínas y la degradación de proteínas (66,67).

Muchas son proteínas de estrés o de choque térmico (Hsps por sus siglas en inglés: *heat shock protein*), los miembros de los diversos grupos de chaperonas se nombraron inicialmente de acuerdo con su peso molecular como Hsp40s, Hsp60s, Hsp70s, Hsp90s, Hsp100s y las Hsps pequeñas. Que además de su papel fundamental en el plegamiento de proteínas de *novo*, asisten el ensamblaje del complejo macromolecular en la proteostasis, el transporte y la degradación de proteínas, y la disociación y relegamiento agregados de proteínas desnaturalizadas por estrés (68).

Sin embargo, cuando fallan los controles de calidad y la capacidad de plegamiento y eliminación de proteínas es superior a las proteínas sintetizadas se activan mecanismos de estrés capaz de volver al equilibrio dentro de la célula. La respuesta a proteínas mal conformadas o *unfolded protein response* en inglés (UPR) es un mecanismo de supervivencia que se activa cuando el estrés es persistente. A *grosso modo* su objetivo es reducir la traducción de proteínas e incrementar la expresión de chaperonas y proteínas que ayuden al plegamiento y eliminación de los polipéptidos (66). Esta compleja respuesta celular es mediada a través de tres receptores transmembranales del RE. En reposo, se mantienen en un estado inactivo a través de su asociación con la proteína chaperona GRP78 (*glucose-regulated protein 78*): Cuando se acumulan las proteínas desplegadas, GRP78 se disocia de los tres receptores, lo que conduce a su activación y desencadena la UPR que es una respuesta de supervivencia para reducir la acumulación de proteínas desplegadas y restablecer la homeostasis.

Cuando las proteínas presentes en el RE se encuentran desplegadas o mal plegadas, se activan los mecanismos para restablecer la homeostasis de proteínas en respuesta a los factores de estrés, uno de ellos es la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico o ERAD (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*), que implica un reconocimiento por medio de manosidasas, principalmente la α -manosidasa activadora de la degradación (EDEM por sus siglas en inglés), retrotranslocación a través de la membrana del RE hacia el citoplasma, ubiquitinación y degradación en proteasoma (69).

La UPR está controlada principalmente por dos secuencias consenso en la región promotora de los genes que son específicas para aliviar el ERE. Son activada por factores de transcripción con un dominio tipo cremallera de leucina básico (bZIP). Una de ellas es el elemento de respuesta a ERE que actúa en cis o ERSE (*ER stress-response element*) y la otra es el elemento de respuesta a mal plegamiento de proteínas o UPRE (*unfolded protein response elements*) (70,71).

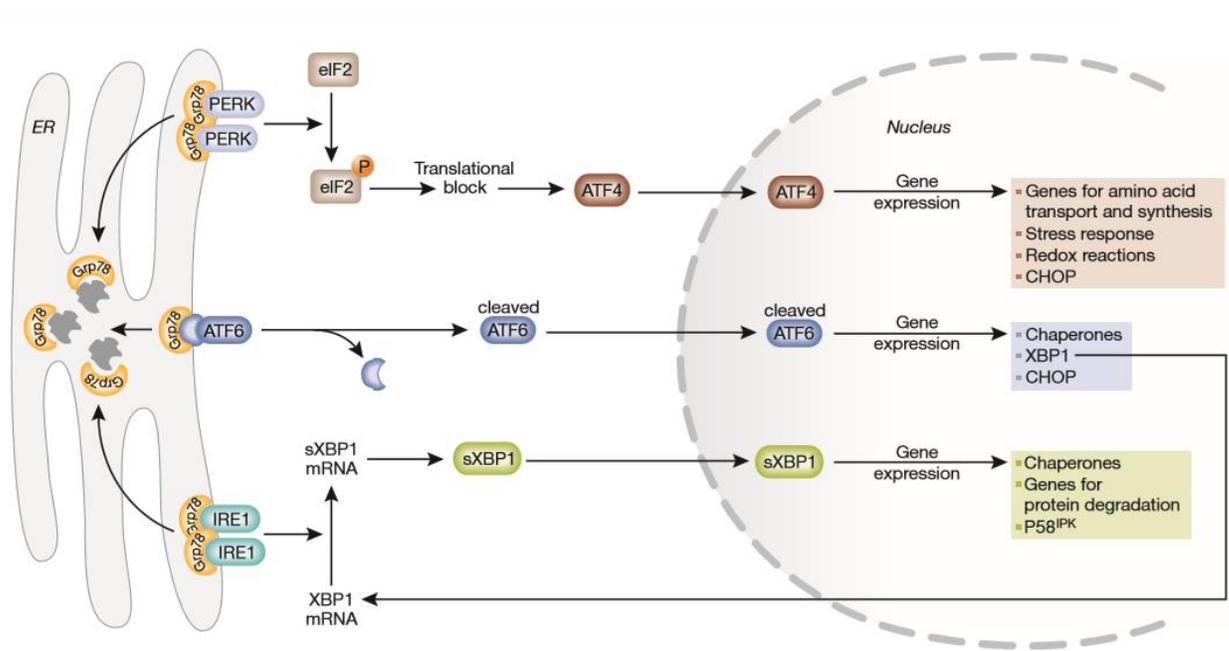


Figura 9. Diagrama de los tres brazos de la UPR. Las tres proteínas transmembranales del RE se activan tras la disociación de la chaperona GRP78, generando factores de transcripción que se translocan al núcleo estimulando genes de respuesta al estrés. PERK fosforila al factor eIF2 y bloquea la traducción general de proteínas por medio de los ribosomas; ATF6 madura tras la disociación de una subunidad; IRE1 α hace un corte en el ARNm de XBP1 para generar un factor de transcripción maduro (62).

La proteína quinasa del RE activada por ARN de doble cadena o PERK por sus siglas en inglés es una serin/treonin kinasa transmembranal del RE tipo I, que tras la disociación de GRP78 de PERK, se activa con una dimerización y autofosforilación. PERK fosforila la subunidad alfa del factor de iniciación eucariota 2 (eIF2 α), lo que conduce a una caída en la traducción general de proteínas y permite la traducción de ATF4 (*activation of transcription factor 4*), que se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes necesarios para restaurar la homeostasis uniéndose al elemento potenciador llamado elemento de respuesta de

aminoácidos, y aumenta la transcripción de genes implicados en la traducción, así como la respuesta antioxidante (72). También se activa la proteína homóloga del factor de transcripción potenciadora de C/EBP (CCAAT) conocida como CHOP, GADD153 o DDIT3 por sus siglas en inglés (62). La reducción en la traducción general de proteínas alivia la sobrecarga de las vías de la proteostasis en condiciones de estrés conformacional (67).

El Factor de transcripción activador 6 (ATF6): Es una glicoproteína transmembranal del RE tipo II, que se activa por proteólisis limitada después de su translocación del RE al aparato de Golgi; Cuando se separa la chaperona GRP78 de ATF6, quedan expuestas dos secuencias que reconoce el aparato de Golgi denominadas GLS1 y GLS2 (en los residuos 468-475 y 476-500) en el lumen del RE (73), lo que provoca su transporte vesicular al aparato de Golgi en el coatómero COP-II (72) y escisión por la Proteasa del sitio 1 (SP1) y 2 (SP2) (74).

El corte proteolítico libera el fragmento citosólico de ATF6 de 50 kDa, que contiene el dominio bZIP que funciona como factor de transcripción: En el núcleo induce genes ERSE, su secuencia consenso es CCAAT(N9)CCACG, el factor de transcripción NF-Y (común en la transcripción de varios genes) reconoce la primer parte y ATF6 la segunda. Estimula la transcripción de proteínas involucradas en la degradación de proteínas mal conformadas, regula la expresión de las chaperonas ER como GRP78, GRP79, GRP94, proteínas disulfuroisomerasa (PDI), calreticulina y factores de transcripción como CHOP (70,72) y la proteína 1 de unión a la caja X (XBP1), que también cuenta con un dZIP. Funciona como factor de transcripción en genes del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (uniéndose a un potenciador del promotor) y del complejo principal de histocompatibilidad humano (MHC) clase II (75–77).

Es importante mencionar que en mamíferos se expresan dos proteínas homólogas de ATF6; la tipo alfa (670 aminoácidos) quien es la mejor descrita y estudiada desempeña su participación activa en la UPR, mientras que la beta (703 aminoácidos) se caracteriza por su baja activación transcripcional (74).

La enzima dependiente de inositol 1 α (IRE1 α por sus siglas en inglés): Es una proteína transmembranal tipo I, la única con actividad RNasa acoplada a una serin/treonin quinasa (78), está altamente conservada, y fue la primera de las tres vías en ser descubiertas.

Básicamente es un sensor de estrés integral de membrana, que responde oligomerizando otras unidades y se autofosforilan entre sí para activar el dominio RNasa, que escinde el ARNm generando XBP1s (*spliced*) (72,79). La actividad endonucleasa de IRE1 α elimina un intrón de 26 nucleótidos del ARNm XBP1 de la cadena original en una región tallo-bucle altamente conservada (80), y el marco de lectura codifica el factor de transcripción maduro (81).

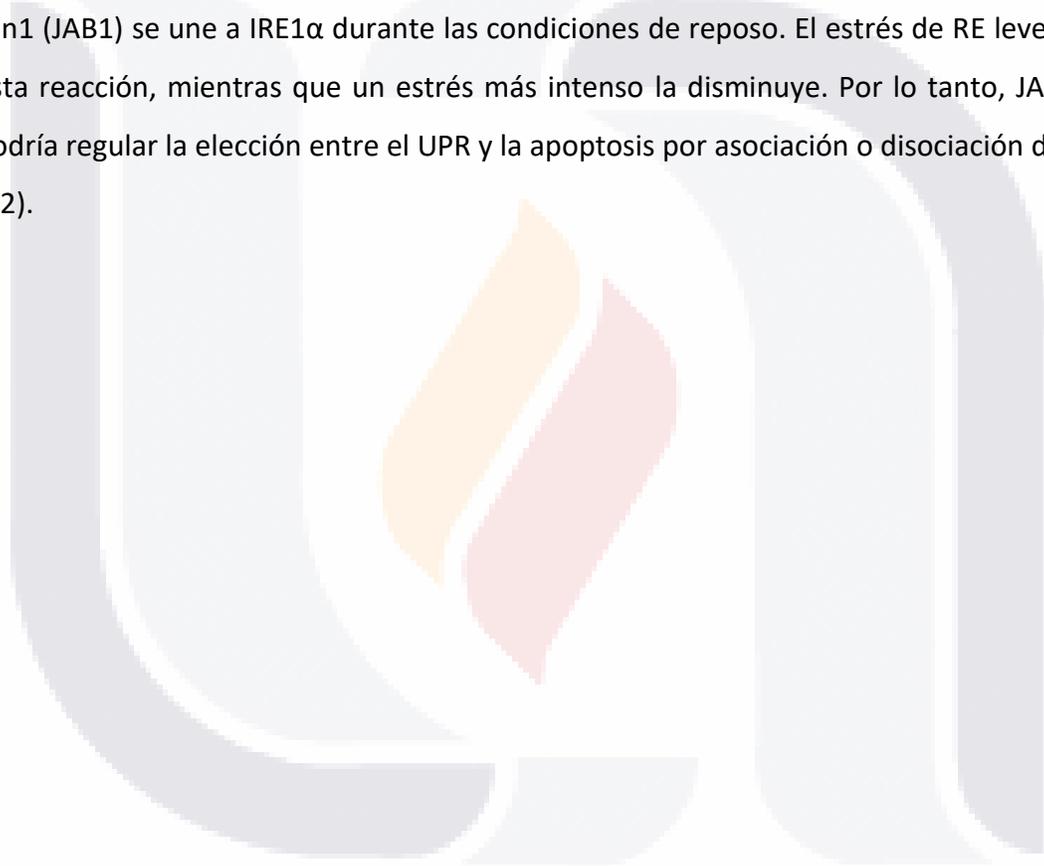
El transcripto del gen es un ARNm denominado XBP1u (*unspliced*) que contiene un dominio potenciador de la degradación, un dominio de asociación de membrana y un dominio asociado con el túnel ribosómico, y carece del dominio de activación de la transcripción (72). El tramo hidrofóbico tiene dos dominios, HR1 y HR2, y el C-terminal de aproximadamente 26 residuos actúa como péptido de detención ribosómica cuando reside en el túnel de salida del ribosoma (82). El dominio HR2 se expone fuera del túnel de salida del ribosoma y puede reclutar la partícula de reconocimiento de señal (SRP), como resultado, el complejo de ARNm de cadena naciente de ribosoma XBP1u (XBP1u-RNC) tiene un direccionamiento co-traduccion al translocón Sec61 (canal de proteínas) en la membrana del RE, donde ahora es posible el empalme de ARNm por IRE1 α (81,82).

Hay evidencia que sugiere que la proteína sin empalmar funciona como un regulador de retroalimentación negativa de su isoforma empalmada formando un complejo que se degrada por el motivo de degradación implícito en su estructura (83), se expresa de manera constitutiva, además la sobreexpresión del factor de transcripción rompería la homeostasis celular (84), Es decir que no necesariamente halla una isoforma funcional, sino que ambas son igualmente importantes en la activación e inhibición y alivio de la UPR.

XBP1s forma un heterodímero con p50ATF6 y se une al elemento potenciador UPRE, que favorece la transcripción de genes ERAD como la proteína ubiquitin ligasa E3 asociada a ERAD (HDR1), EDEM y Derlins (72), enzimas de plegamiento y chaperonas residentes en el RE, miembros de la familia HSP40, P58IPK y las proteínas que funcionan en la vía secretora, que en conjunto aumentan el tamaño y la actividad del RE como un esfuerzo para mantener la homeostasis (82,85). XBP1s es una proteína altamente inestable que se degrada vía

proteasoma potenciada por su forma sin empalmar, y protegida por unión directa con UBC9 (72).

Las funciones pro y antiapoptóticas de IRE1 α se diferencian por las proteínas que interactúan con ella: Proteína inhibidora de la N-terminal c-Jun (JIK): Se ha demostrado su capacidad para unir tanto IRE1 α como el factor asociado al factor 2 de necrosis tumoral (TRAF2), lo que indica un papel potencial en la regulación del reclutamiento y la consecuente activación de la ruta MAPK. Y la proteína de unión al dominio de activación de Jun1 (JAB1) se une a IRE1 α durante las condiciones de reposo. El estrés de RE leve mejora esta reacción, mientras que un estrés más intenso la disminuye. Por lo tanto, JAB1 y JIK podría regular la elección entre el UPR y la apoptosis por asociación o disociación de IRE1 α (62).



Capítulo II

2. Planteamiento del Problema

El uso de alfa y beta bloqueadores actualmente es muy común para el manejo clínico de pacientes con STUI y aquellos con problemas con su tensión arterial. En ese sentido, es bien sabido que los problemas cardiovasculares son la principal causa de muerte en México y el mundo. Por otro lado, los STUI afectan a una gran parte de la población adulta, disminuyendo su calidad de vida. BBNE como el carvedilol están aprobados para tratar la hipertensión portal en pacientes con complicaciones en la cirrosis que pueden llegar a desarrollar ascitis, sin embargo, hay algo de controversia respecto a sus efectos.

Por otro lado, hay un creciente número de estudios preclínicos que proponen a los antagonistas de los ARs como estrategia terapéutica farmacológica para revertir la fibrosis hepática. A pesar de los avances en la medicina traslacional, aún no se han propuesto medicamentos seguros y eficaces para tratar la cirrosis, que también representa una de las primeras causas de muertes en México. Sin embargo, no hay suficiente información acerca de la toxicidad que pueden estar provocando sobre las células, particularmente del tejido hepático.

¿La tamsulosina y/o el carvedilol causan estrés en retículo endoplásmico, y como consecuencia, inducen la respuesta a proteínas mal conformadas en células HepG2? Y si es así, ¿Bajo qué tiempos y concentraciones?

3. Justificación

La importancia de la investigación reside en los huecos del conocimiento que hay entorno en los efectos adversos del carvedilol y la tamsulosina. Son fármacos recetados de manera rutinaria en el sistema de salud, y que recientemente se han propuesto contra la fibrosis.

Sin embargo, los estudios indican que hace falta evaluar el comportamiento de las células hepáticas bajo el tratamiento farmacológico. La información que se pretende obtener ayuda a describir el comportamiento del hígado a través de un modelo *in vitro*, específicamente con indicadores moleculares de estrés reticular y citotoxicidad. Dicha información será un punto de apoyo para determinar la seguridad de los fármacos a nivel celular y podrían llegar a sustentar argumentos sólidos a favor o en contra del uso del Carvedilol y tamsulosina contra la fibrosis hepática (como lo sugieren ciertos grupos de investigación). Además, abre la posibilidad de futuros estudios que describan los efectos *in vivo*: llevarlo a las siguientes fases de investigación traslacional, para ayudar al área clínica en su toma diaria de decisiones.

4. Objetivos

Determinar el posible estrés en retículo endoplásmico por la respuesta a proteínas mal conformadas causado por acción del Carvedilol y Tamsulosina sobre una línea celular derivada de hepatocitos.

4.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotóxico de Carvedilol y Tamsulosina sobre células HepG2 en función de diferentes tiempos y concentraciones.
- Cuantificar los niveles de expresión de ARNm de marcadores de respuesta a estrés en retículo endoplásmico y apoptosis.
- Determinar la presencia de proteínas marcadores de estrés en retículo endoplásmico y apoptosis.

5. Hipótesis

La interacción de Tamsulosina y Carvedilol, por separado, en células HepG2 provocarán estrés en el retículo endoplásmico y la subyacente respuesta a proteínas mal conformadas de manera dosis dependiente.



Capítulo III

6. Diseño Experimental



Figura 10. Diseño metodológico. Experimental puro con manipulación de variables. Se realizarán cultivos celulares con HepG2, que se expondrán a diferentes tiempos y concentraciones de carvedilol y tamsulosina para evaluar con diferentes técnicas los marcadores de estrés: Se harán ensayos de viabilidad celular con Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), se hará la extracción de ARN y proteínas totales para posteriormente hacer una RT qPCR y *western blot*.

7. Variables

Variable y tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión e instrumentos de medición	Recolección de datos
Fármaco Cualitativa Nominal De explicación	Es una sustancia cuya composición se conoce con precisión, que tiene la capacidad de producir efectos o alteraciones sobre una determinada	NA	NA	NA

	propiedad fisiológica de quien la consume			
Concentración Cualitativa Ordinal De explicación	“La concentración de una disolución es la proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolución o, a veces, de disolvente”	NA	Instrumentos de medición de volúmenes y balanza analítica. Escala en Molaridad	NA
Tiempo Cualitativa Ordinal De explicación	“Magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos, estableciendo un pasado, un presente y un futuro, y cuya unidad en el sistema internacional es el segundo”	NA	Reloj y cronómetro. Escala de medición en días y horas.	NA
Viabilidad Celular Cuantitativa De Respuesta	La capacidad que tienen las células para proliferar por medio de mecanismos moleculares que están altamente regulados	Ensayo colorimétrico MTT	Densidades ópticas con lector de microplaca. Escala de medición en Porcentajes	Vaciado de datos en <i>Excel</i> y procesamiento con <i>GrapPad Prism 9</i> .
Síntesis proteica Cuantitativa De Respuesta	Es el proceso a través del cual las células fabrican proteínas utilizando la información genética codificada en el ARNm	<i>Western Blot</i>	Densitometría medida con scanner y analizada con un <i>software</i> especializado.	Procesamiento de imágenes con <i>Photoshop</i> , <i>Fiji</i> de <i>Image J</i> . <i>GrapPad Prism 9</i> y <i>SPSS</i>

			Escala de medición en expresiones relativas	
Biomarcadores de estrés reticular	<p>ARN 18s ribosomal. Es parte del ARN ribosómico y el ARN estructural del pequeño componente de los ribosomas citoplasmáticos eucariotas.</p> <p>ATF4. Es un factor de transcripción activada en el estrés del RE, e induce la transcripción de genes necesarios para restaurar la homeostasis.</p> <p>CHOP. Es una proteína de unión al potenciador de C/EBP que funciona como factor de transcripción que promueve la apoptosis.</p> <p>*GRP78. Es una proteína que funciona como una chaperona; está involucrada en el</p>	* <i>Western blot</i>	<p>Densitometría medida con scanner y analizada con un <i>software</i> especializado.</p> <p>Escala de medición en expresiones relativas</p>	<p>Procesamiento de imágenes con Photoshop, <i>Fiji de Image J.</i></p> <p><i>GrpPad Prism 9</i> y SPSS</p>
Cuantitativa				
De respuesta		RT qPCR	<p>Diferencia en intensidad de fluorescencia medida por</p>	<p>Vaciado y procesamiento de datos en <i>Excel, GrpPad Prism 9</i> y SPSS.</p>

	<p>plegamiento y ensamblaje de proteínas y es un regulador maestro de la homeostasis del RE.</p> <p>ATF6. Factor activador de la transcripción 6, es una proteína implicada en respuesta a la presencia de proteínas mal plegadas.</p> <p>ATG5. La “5 relacionada con la autofagia” es una proteína clave involucrada en la extensión de la membrana fagosómica en vesículas autofágicas.</p> <p>BAX. Proteína X asociada a Bcl-2 interactúa y aumenta la apertura del canal aniónico dependiente de voltaje mitocondrial (VDAC), lo que conduce a la pérdida del potencial de membrana y la liberación del CYP C.</p> <p>BCL2. Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B ayuda a</p>		<p>termociclador en tiempo real.</p> <p>Escala de medición en expresiones relativas.</p>	
--	--	--	--	--

	<p>controlar la supervivencia o destrucción de una célula al impedir un tipo de muerte celular que se llama apoptosis.</p> <p>BECLIN1. Es una proteína implicada en la muerte celular programada por autofagia.</p> <p>CALRETICULINA. Es una proteína multifuncional soluble que une iones Ca^{2+} que se une a proteínas mal plegadas.</p> <p>CASPASA 3. Es una Cisteín aspartico proteasa efectora que provoca una proteólisis masiva que resulta en apoptosis.</p> <p>IRE. La enzima 1α que requiere serina / treonina-proteína quinasa / endoribonucleasa inositol es una proteína integral del retículo endoplásmico.</p>			
--	---	--	--	--

	<p>*LC3A. Proteínas asociadas a los microtúbulos La cadena ligera 3A/1B 3A, implicada en la autofagia.</p> <p>PERK. Factor de iniciación de la traducción eucariota 2-alfa quinasa 3 es una proteína del Retículo endoplásmico.</p> <p>XBP1s. Proteína de unión a la caja X 1 cortada, es un factor de transcripción que activa los genes de enzimas de plegamiento y chaperonas residentes en el RE, componentes de la degradación de proteínas y proteínas de la vía secretora. Solo puede ser cortada después de la oligomerización de IRE1α.</p>			
--	---	--	--	--

Tabla 3. Operacionalización de las variables. Se clasifican las variables involucradas en el proyecto de investigación “Evaluación del efecto de los fármacos antifibróticos Carvedilol y Tamsulosina sobre el estrés en retículo endoplásmico en un modelo in vitro”.

* Biomarcadores que se utilizarán en la técnica de inmunotransferencia. NA: No Aplica

8. Metodología

8.1. Cultivo Celular

Las pruebas experimentales contempladas en el diseño metodológico se realizaron con células tipo HepG2 donadas por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Se cultivaron en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; *Corning*, 10-090-CV), suplementado con 2% de L-Glutamina (*Corning*; 25-005-CI), 1% de solución antimicrobiana de penicilina, estreptomycin y anfotericina B (*Sigma*, A5955) y Suero Fetal Bovino (SFB) al 2% en incubadora (ESCO, CCI-170B-9) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Para el crecimiento adecuado de las células, se utilizaron recipientes especializados para cultivo celular, estériles y previamente tratados para la adherencia celular en cada protocolo (Tabla 4).

Todos los procedimientos (Anexo A - D) se realizaron en condiciones de esterilidad bajo el flujo laminar de la campana (*ESCO, Airstream Class II BSC*). Los experimentos se desarrollaron durante la fase de crecimiento logarítmico de las células (alrededor de 80% de confluencia) siguiendo los lineamientos de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Recipiente	Marca y Catálogo	Área de crecimiento	Volumen de trabajo recomendado
Microplaca de 96 pozos	<i>Corning</i> , 3599	0.32 cm ²	200 µL
Placa de 6 pozos	<i>Corning</i> , 3506	9.5 cm ²	5 ml
<i>Flask</i> T25	<i>Corning</i> , 431463	25 cm ²	2 ml

Tabla 4. Recipientes utilizados en el cultivo celular. Se enlistan las principales características de los recipientes utilizados para el cultivo celular en los experimentos propuestos.

8.2. Estímulos Farmacológicos

A partir de un stock 50 mM de carvedilol (*Sigma*, PHR1265) y tamsulosina (*Sigma*, T1330) grado reactivo se prepararon las diluciones propuestas con medio de cultivo suplementado. Las concentraciones se eligieron en función de las concentraciones máximas registradas en seres humanos, donde presentan su efecto terapéutico (Anexo E).

El inicio del estímulo farmacológico (al tiempo 0) consistió en sustituir el medio de cultivo donde las células previamente crecieron hasta una confluencia del 80%, por medio de cultivo con la dilución correspondiente del fármaco: Se succiona el medio de cultivo con una micropipeta cuidado de no tocar la monocapa. De ser necesario, se hacen lavados con PBS 1x, y finalmente, se coloca el medio de cultivo con el estímulo farmacológico.

En los ensayos de citotoxicidad las interacciones farmacológicas se hicieron a las 0, 24, 48 y 72 hrs, a las concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 1 y 10 μM de los fármacos empleados. Donde se utilizó peróxido de hidrógeno a una concentración de 250 μM como control positivo de daño (datos no presentados) y medio de cultivo suplementado como control negativo.

Para estudiar la cinética de expresión genética se seleccionaron las concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1 μM de carvedilol y tamsulosina a los tiempos 4, 8, 12 y 24 hrs para evaluar los marcadores de respuesta a proteínas mal conformadas. Los resultados se compararon con un control negativo de células HepG2 cultivadas con medio de cultivo suplementado sin tratamiento farmacológico, y un control positivo de células cultivadas en 5 μg de Tunicamicina (TM) (*Sigma*, T7765)/ml de medio de cultivo suplementado, de acuerdo al modelo de estrés reticular propuesto por Abdullahi y colaboradores (2017) en células HepG2 (86): La TM es un inhibidor de la N-glucosilación de las proteínas, lo que lleva a la acumulación de proteínas mal conformadas en lumen del RE y la UPR.

En la caracterización de proteínas y el análisis de traducción global de proteínas se evaluó el estímulo farmacológico del carvedilol y tamsulosina 0.01 μM tras 12 hrs de interacción.

En la caracterización de GRP78 y LC3A/B los resultados se compararon con un control positivo de células cultivadas con 5 µg de TM/ml de medio de cultivo suplementado (igual que el estudio de la cinética de expresión génica). En el estudio de la síntesis proteica global los resultados se compararon con un control de células cultivadas con homoharringtonina (HHT) (*Sigma*, SML1091) 50 µM, incubado por un periodo de 9 hrs (87): El HHT inhibe la formación de difenilalanina y acetilfenilalanil-puromicina en los ribosomas hepáticos, además bloquea la fase de elongación de la traducción al unirse a la subunidad del ribosoma 60S. Posterior al tratamiento farmacológico, se añadió puromicina 1 µM (*Tocris Bioscience*, 4089) para incubar 15 minutos adicionales, como sugiere Ravi V. y colaboradores (2020) (88) (Anexo N).

8.3. Ensayo de Viabilidad MTT

Se cultivaron células HepG2 en microplacas de 96 pozos con 10,000 células/pozo, aforados a 200 µL con DMEM suplementado. Tras 24 hrs de crecimiento, recibieron su estímulo farmacológico. Cada observación cuenta con 12 repeticiones (n=12).

Se procedió al ensayo colorimétrico con Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), basado en el protocolo de Mosmann (1983) (89).

De manera general, se preparó medio de cultivo suplementado con 0.5 mg/mL de MTT (*Sigma*, M5655) a partir de un stock. Terminada la interacción con los fármacos, se sustituye el medio de cultivo por el de MTT llenando 200 µL/pozo, y se incubó por 4 horas a 37°C con 5% CO₂. Terminado el tiempo de incubación se vuelve a intercambiar el medio por 150 µL de isopropanol ácido para disolver los cristales de formazán generados por la actividad enzimática de oxidorreductasas mitocondriales de las células a partir del MTT (Anexo F).

Se deja en agitador orbital a 200 rpm por 10 - 20 minutos protegido de la luz. Finalmente se midió la absorbancia con el lector de microplaca (*Bio-Rad iMark Microplate Reader*) a una longitud de onda de 595 nm con un filtro de referencia de 655 nm.

Los resultados se normalizan con las absorbancias del control negativo de daño, cuyas células crecieron en ausencia de estímulo farmacológico (medio de cultivo suplementado). Se corrieron experimentos con peróxido de hidrógeno como control positivo de daño.

8.4. Expresión Genética

8.4.1. Extracción y Evaluación de ARN

Se cultivaron células HepG2 en placas de 6 pozos con 50,000 – 250,000 células/pozo, aforados a 2 mL de DMEM suplementado. Una vez llegada la confluencia al 80%, se hicieron las interacciones con los medicamentos por duplicado (n=2) y procedió a la extracción del material genético con el kit *Direct-zol RNA Miniprep* (Zymo Research, R2050-R2053) siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Anexo G).

Las cuantificaciones del ARN eluido se hicieron con *BioDrop μ Lite*. Se utilizó agua libre de nucleasas como el blanco, limpiando el sensor entre cada cuantificación.

Se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para ver la integridad del material genético extraído: se cargaron 5 μ l de muestra y 1 μ l de buffer de corrida 6X (*Thermo Scientific*, R1161) en el gel, se corrieron 45 - 60 min a 100 V. Se dejó reposar en una solución de bromuro de etidio y se reveló con un transiluminador (*DNR Bio-Imaging Systems, MiniBIS Pro*) y luz UV (Anexo I).

8.4.2. Retrotranscripción

Se utilizó el kit *RevertAid H Minus* (*Thermo Scientific*, K1631) para la síntesis de cADN a partir de 1 μ g de ARN siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Se utilizó un termociclador *ESCO Aeris* para programar las temperaturas (Anexo H). Se prepararon alícuotas a una dilución 1:20 con agua libre de nucleasas para alcanzar una concentración de 50 ng de cADN/ μ l que se utilizó para las amplificaciones. El material genético se almacenó a -80 °C.

Para validar la síntesis de cADN se realizó una amplificación del gen constitutivo 18S ribosomal con una PCR punto final, el cual se evaluó con un gel de agarosa al 1.5% similar a la evaluación del ARN (Anexo I y J).

8.4.3. Diseño y Validación de los Oligonucleótidos

Se hizo una búsqueda en la base de datos de genes del NCBI (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*) de los ARNs mensajeros de los genes contemplados en el proyecto (tabla 5) (90).

Los oligonucleótidos se diseñaron empleando las herramientas en línea de *Primer3Plus* (91) y *NCBI Primer-BLAST* (92), tratando en medida de lo posible que las secuencias se extiendan sobre la unión de dos exones, para descartar las amplificaciones con ADN genómico y que los amplicones tengan tamaños menores a 250 pares de bases (pb). Posteriormente se mandaron sintetizar a un proveedor de ácidos nucleicos personalizados (*Integrated DNA Technologies Inc.*) y se diluyeron (5 ng/μl) para trabajar con ellos los protocolos de amplificación (Anexo I y K).

Gen	NCBI ID	Forward 5' -> 3'	Reverse 5' -> 3'	Longitud Amplicon (pb)
<i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 5 (HSPA5)</i>	NM_005347.5	TTT CAC AGT GCC CAA GAG TG	TGA TCA CTC ACT CCC CAT CA	162
<i>Activating transcription factor 4 (ATF4), transcript variant 1</i>	NM_001675.4	TCA AAC CTC ATG GGT TCT CC	GAA GGT CAT CTG GCA TGG TT	207

<i>DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3)</i>	NM_001195057.1	GCG CAT GAA GGA GAA AGA AC	TCT GGG AAA GGT GGG TAG TG	210
<i>18S ribosomal N1 (RNA18SN1), ribosomal RNA</i>	NR_145820.1	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG	CCT CCA ATG GAT CCT CGT TA	155
<i>BCL2 apoptosis regulator (BCL2), transcript variant alpha</i>	NM_000633.3	GAC TTC GCC GAG ATG TCC AG	GAA CTC AAA GAA GGC CAC AAT C	129
<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator (BAX), transcript variant 1</i>	NM_001291428.2	CGA ACT GGA CAG TAA CAT GGA G	CAG TTT GCT GGC AAA GTA GAA A	157
<i>Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 (ERN1)</i>	NM_001433.5	TAG TCA GTT CTG CGT CCG CT	TTC CAA AAA TCC CGA GGC CG	173
<i>Activating transcription factor 6 (ATF6)</i>	NM_007348.4	TTC AGG GTG CTC TGG AAC AG	ACT CCC TGA GTT CCT GCT GAT	92
<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 (EIF2AK3), transcript variant 1</i>	NM_004836.7	GCA CAG GGA CCT CAA GCC AT	GGC ATT GGG GTC AGA ACC GT	126
<i>X-box binding protein 1 (XBP1), transcript variant 2</i>	NM_001079539.2	CTG AGT CCG CAG CAG GTG	GTC CAG AAT GCC CAA CAG GA	116

<i>Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha (MAP1LC3A)</i>	NM_032514.4	GCG AGT TAC CTC CCG CAG	GTA CCT CCT TAC AGC GGT CG	210
<i>Autophagy related 5 (ATG5), transcript variant 1</i>	NM_004849.4	GCA ACT CTG GAT GGG ATT GC	AGG TCT TTC AGT CGT TGT CTG AT	139
<i>Caspase 3 (CASP3), transcript variant 1</i>	NM_004346.4	TGG AAC CAA AGA TCA TAC ATG G	GTT TGC TGC ATC GAC ATC TG	173
<i>Beclin 1 (BECN1), transcript variant 1</i>	NM_003766.5	AGG TTG AGA AAG GCG AGA CA	AAT TGT GAG GAC ACC CAA GC	196
<i>Calreticulin (CALR)</i>	NM_004343.4	TGG AAG ACG ATT GGG ACT TC	TCA GGG TCA GGG ATA TGC TC	151

Tabla 5. Genes diana para el análisis RT qPCR. En la primera columna viene el nombre del gen en inglés para *homo sapiens*, en la segunda el código de acceso a la base de datos de NCBI y en las siguientes la secuencia de los oligonucleótidos (*forward* y *reverse* respectivamente) así como la longitud del transcrito final.

Para la validación de los cebadores y estandarizar las condiciones para cada gen, se hizo una PCR punto final de un control negativo de todos los genes (Anexo I), que posteriormente se cargaron en un gel de agarosa y se revelaron con solución de bromuro de etidio y transiluminador (Anexo J).

8.4.4. RT q PCR

La medición de los niveles de expresión relativa de los genes de la tabla 5 se llevó a cabo por medio de PCRs en tiempo real con el método de cuantificación relativo; El cADN recién sintetizado y diluido (1:20) se utilizó para un análisis de dos pasos RT qPCR, usando 1 µl de

muestra, *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (Thermo Scientific, K0221) y los primers de la tabla 5 (Anexo K).

Se organizaron las 48 muestras en una placa *MicroAmp* (Applied Biosystems, 4375816) bajo el flujo laminar de una campana, evitando que los rayos de luz solar incidan en la mezcla de reacción. Se programó y corrió el experimento en el sistema de PCR en tiempo real *StepOne* (Applied Biosystems). Los valores de los ciclos umbrales o *cycle threshold* (Ct) calculados por el *software* se sustituyeron en la fórmula para expresión relativa, tomando como referencia la expresión del ARN ribosomal 18S (*housekeeping*). El control negativo fue la expresión de las células que crecieron en ausencia de los estímulos farmacológicos, y el positivo las que interactuaron con TM.

8.5. Expresión Proteica

8.5.1. Caracterización de Proteínas

Se cultivaron células HepG2 en placas de 6 pozos con 50,000 – 250,000 células/pozo, aforados a 2 mL de DMEM suplementado. Una vez llegada la confluencia al 80%, se hicieron las interacciones con los medicamentos por cuadruplicado (n=4) y procedió a la extracción de las proteínas totales con el buffer de lisis RIPA (*Thermo Scientific*, 89901) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF; Roche, 10837091001) como inhibidor de proteasas. Se siguieron las instrucciones de los fabricantes para la extracción de proteínas en cultivos celulares de monocapa, juntando el volumen de tres pozos como una sola réplica (Anexo L).

Se determinó la concentración de proteínas totales de las muestras diluidas en buffer RIPA por el ensayo colorimétrico de Bradford (Anexo M): Se calcularon las concentraciones con un modelo de regresión lineal generado a partir de una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA).

Finalmente se hizo la detección de proteínas por *western blot* usando 30 µg de proteína, con los anticuerpos correspondientes de la tabla 6 (Anexo P) y subsecuente análisis densitométrico con el *software Fiji de Image J* (93).

8.5.2. Análisis de la Síntesis Proteica

Basado en el protocolo de medición de la síntesis de proteínas en células cultivadas mediante *western blot* de Ravi V. y colaboradores (2020) (88). Se cultivaron células HepG2 en placas de 6 pozos con 50,000 – 250,000 células/pozo, aforados a 2 mL de DMEM suplementado. Una vez llegada la confluencia al 80%, se hicieron las interacciones con los medicamentos por triplicado (n=3). Una vez terminadas las 12 horas de estímulo, se procedió a intercambiar el medio de cultivo suplementado por otro con una concentración 1 μ M de Puromicina. Tras 15 minutos de interacción se retira el exceso de puromicina haciendo un lavado con una solución de PBS 1x con 0.00036% de Digitonina (*Sigma*, D141) y uno con PBS 1x (Anexo N).

Posteriormente se procedió a la extracción de las proteínas totales con el buffer de lisis RIPA (*Thermo Scientific*, 89901) con una mezcla de inhibidores de proteasas al 1% (*Sigma*, P3840, P5726, P0044): proteasa, fosfatasa 2 y fosfatasa 3. Se siguieron las instrucciones de los fabricantes sugeridos para la extracción de cultivos celulares de monocapa (Anexo L).

La concentración de proteínas se determinó con el kit *Pierce* (*Sigma*, 23227), basado en el método de detección por ácido bicinconínico (BCA) (Anexo O).

Finalmente se hizo la detección de proteínas por *western blot* usando 10 μ g de proteína, los anticuerpos correspondientes de la tabla 6 y subsecuente análisis densitométrico, como en la caracterización de proteínas (Anexo P).

Anticuerpo	Fuente, isotipo y *reactividad	Marca	Catálogo	Peso molecular (kDa)	Dilución para WB
BIP (primario)	IgG Conejo anti-humano (M)	<i>Cell Signaling Technology</i>	3177	78	1:1000

LC3A/B (primario)	IgG2a Conejo anti-humano (M R)	<i>Cell Signaling Technology</i>	12741	14, 16	1:1000
Puromicina (primario)	IgG Ratón anti-humano	<i>Sigma</i>	MABE343	250 - 10	1:1000
GADPH (primario)	Conejo anti- humano (M R Mk B Pg)	<i>Cell Signaling Technology</i>	2118	37	1:1000
<i>Peroxidase AffiniPure Goat Anti- Mouse</i> (Secundario)	IgG Cabra anti Ratón (H+L)	<i>Jackson Immuno Research</i>	115-035- 003	-	1:5000
<i>Anti-Rabbit IgG</i> (Secundario)	Anti IgG Conejo	<i>Sigma Aldrich</i>	A0545	-	1:5000

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios. Se enlistan las características de los anticuerpos utilizados en la caracterización de proteínas y en análisis de la síntesis proteica.

*En la reactividad de incluye entre paréntesis las especies contra las que también funciona el anticuerpo (además de humano). *R: Rat, M: Mouse, Mk: Monkey, B: Bovine, Pg: Pig.*

8.6. Análisis Estadístico

La información fue capturada y procesada en las herramientas de *Microsoft Office, GraphPad Prism 9* para Windows y el paquete *IBM Microsoft Statistics* en su versión 26.

Los datos se expresan en términos de la media o mediana según corresponda, y la desviación estándar de la media como barras de error. Se hicieron pruebas de normalidad tipo Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas Bartlett tomando un nivel de significancia de 0.05.

Para la comparación múltiple de grupos se hicieron pruebas de hipótesis tipo ANOVA (Análisis de Varianza) con *post hoc* de *Dunnett* o su equivalente no paramétrico *Kruskal Wallis* con *post hoc* de *Dunn* según corresponda. Los valores *p* menores a 0.05 fueron tomados como significativos y se indicaron con asteriscos de la siguiente manera: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001. *****p*<0.0001.



Capítulo IV

9. Resultados

9.1. Crecimiento Celular

De acuerdo con los registros del crecimiento de las células HepG2 con medio de cultivo DMEM suplementado con 2% de L-Glutamina, 2% de SFB y 1% de solución antibiótica en los frascos T25 (*flask*). Crecieron en un periodo aproximado de 3 días (72 hrs) cuando se siembran 250,000 células y 5 días (120 hrs) cuando se siembran 80,000. Para determinar el tiempo de duplicación se utilizó la siguiente fórmula:

$$DT = T * \ln 2 / \ln (X_e / X_b)$$

Donde:

T = Tiempo de incubación en unidades.

Xb = Número de células al comienzo del tiempo de incubación.

Xe = Número de células al final del tiempo de incubación.

Se encontró que el tiempo de duplicación experimental es de 19:15 – 20:45 hrs. Además, la densidad de células en Confluencia de 80-90%: 110,000 – 130,000 células HepG2/cm².

9.2. Citotoxicidad de los Adrenobloqueadores.

En el caso del carvedilol se observó un efecto citotóxico en las células HepG2 a mayores tiempos de interacción y a menores concentraciones: a las 24 hrs no se observaron cambios significativos sobre la actividad metabólica de las células tratadas a las diferentes concentraciones de este fármaco, tras 48 hrs disminuyó notablemente la actividad en todas las dosis, pero solo el grupo tratado con 0.01 µM tuvo una diferencia estadísticamente significativa, con un valor de 73,69 ± 5,63% y de p=0.0003. Similar al caso anterior, a las 72

hrs los efectos más negativos se registraron en las concentraciones más bajas. Todos los grupos presentaron diferencias significativas con los valores de $66.84 \pm 4.31\%$ ($p < 0.0001$), $75.22 \pm 4.72\%$ ($p = 0.0002$), $76.13 \pm 4.55\%$ ($p = 0.0004$), $81.41 \pm 4.52\%$ ($p = 0.0068$) y $79.27 \pm 3.94\%$ ($p = 0.0022$) para los grupos $0.01\ \mu\text{M}$, $0.05\ \mu\text{M}$, $0.1\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$ y $10\ \mu\text{M}$ respectivamente. Se observó que a medida que incrementa el tiempo de exposición de las células con el fármaco, disminuyó la viabilidad celular respecto a su control, independientemente de la concentración (Gráfico 1).

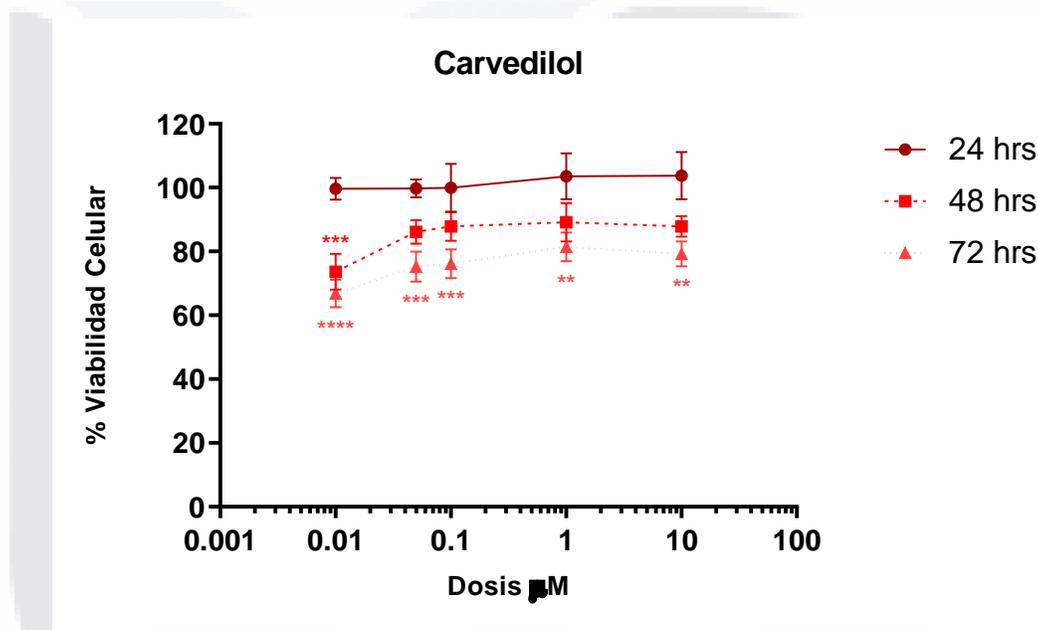


Gráfico 1. Efectos del carvedilol en la viabilidad de las células HepG2 en diferentes tiempos y concentraciones. La viabilidad celular representado en porcentajes está en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas representa las dosis (micro molar) en escala logarítmica. Cada punto cuenta con 12 observaciones ($n=12$), las barras de error corresponden al error estándar de la media. En todos los casos hubo una distribución normal en los grupos de datos ($n=12$), sin embargo, la homocedasticidad solo se cumplió a las 72 hrs: se hicieron análisis estadísticos multivariados ANOVA con *post hoc* de *Dunn* y *Kruskal Wallis* con *post hoc* de *Dunn*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Se combinaron las observaciones registradas para cada tiempo (24, 48 y 72 hrs) para determinar el efecto citotóxico dosis-dependiente (Gráfico 2). Contrario a lo esperado, se registró un efecto negativo del carvedilol sobre el metabolismo de las células HepG2 a las concentraciones más bajas, recuperándose gradualmente hasta no tener diferencias estadísticamente significativas con el control.

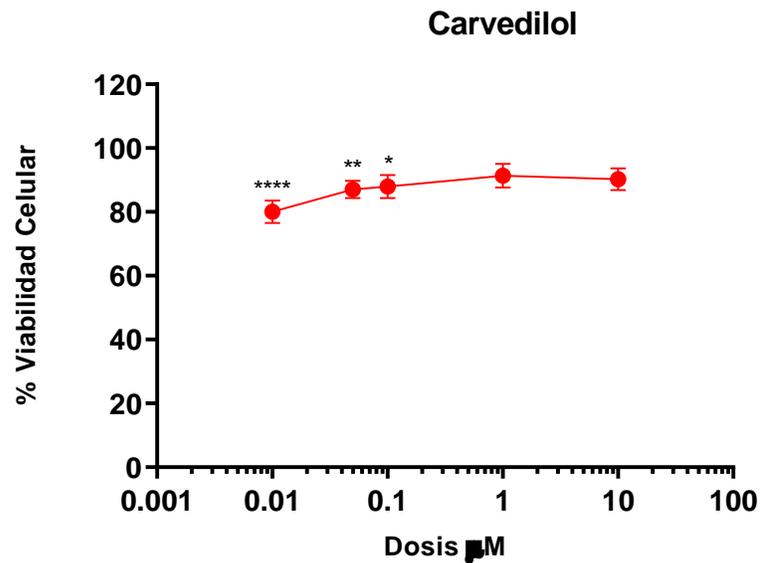


Gráfico 2. Efecto global del carvedilol en la viabilidad de las células HepG2 a diferentes concentraciones. Combinado las observaciones del gráfico 1 se elaboró una representación de los efectos generales del carvedilol que ejerce sobre la línea celular HepG2. La viabilidad celular representado en porcentajes está en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas representa las dosis (micro molar) en escala logarítmica. Cada punto cuenta con 36 observaciones (n=36), las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Todos los grupos cumplen el supuesto de normalidad y homocedasticidad: se hicieron análisis estadísticos multivariados ANOVA con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Cuando las células fueron tratadas con tamsulosina, se observó un comportamiento muy similar que con carvedilol: a las 24 horas no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de viabilidad celular a las concentraciones del estudio. Tras 48 horas, se vio un decremento en la viabilidad a las concentraciones más bajas: los grupos tratados con 0.01 μM, 0.05 μM y 0.1 μM tuvieron valores de 70.00±4.69 % (p<0.0001), 76.92±4.66 % (p=0.0003) y 83.26±4.02 % (p=0.0124) respectivamente. Y a las 72 horas todas las concentraciones tuvieron un efecto significativo sobre la viabilidad celular, excepto la mayor (10 μM) que no presentó diferencias respecto al control. Se registraron valores de 72.19±3.42 % (p<0.0001), 81.67±2.86 % (p<0.0001), 81.79±3.79 % (p<0.0001) y 87.49±2.46 % (p=0.0012) para los grupos de 0.01 μM, 0.05 μM, 0.1 μM y 1 μM respectivamente (Gráfico 3).

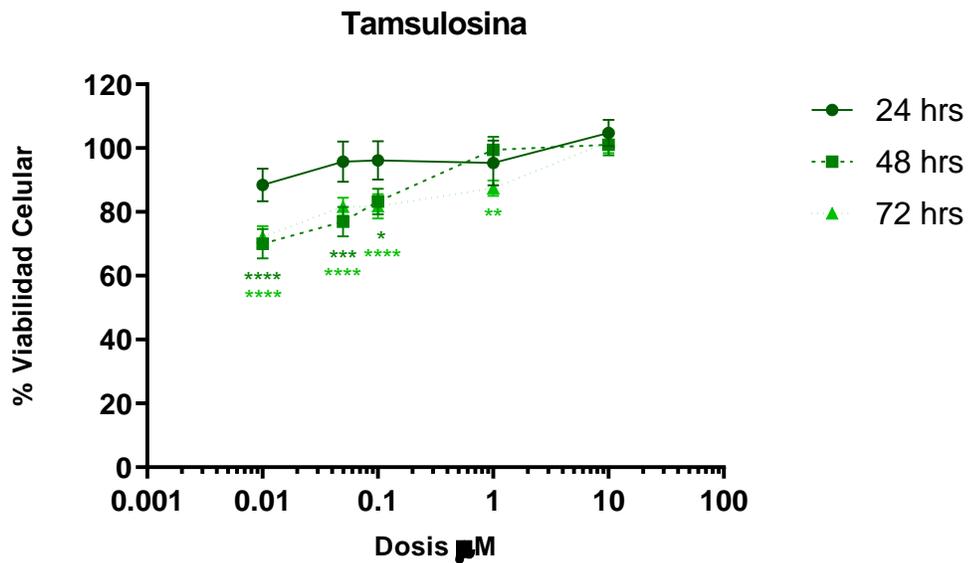


Gráfico 3. Efectos de la tamsulosina sobre la viabilidad de las células HepG2 en diferentes tiempos y concentraciones. La viabilidad celular representado en porcentajes está en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas representa las dosis (micro molar) en escala logarítmica. Cada punto cuenta con 12 observaciones (n=12), las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. En todos los grupos se cumplió el principio de homocedasticidad y normalidad, a excepción de las 72 hrs: se hicieron análisis estadísticos multivariados ANOVA con *post hoc* de *Dunn* y *Kruskal Wallis* con *post hoc* de *Dunn*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Para el caso de la tamsulosina, en general se observó un efecto citotóxico sobre las células HepG2 a las concentraciones más bajas, de manera similar con el carvedilol. La forma del gráfico sugiere que estimula el crecimiento celular de manera dosis dependiente. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa con el control a las concentraciones contempladas del estudio (Gráfico 4).

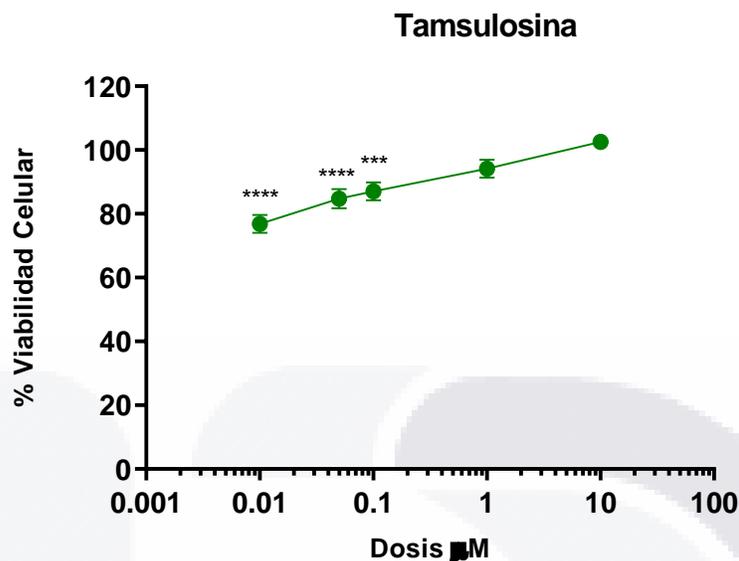


Gráfico 4. Efecto global de la tamsulosina en la viabilidad de las células HepG2 a diferentes concentraciones. Combinado las observaciones del gráfico 3 se elaboró una representación de los efectos generales del carvedilol que ejerce sobre la línea celular HepG2. La viabilidad celular representado en porcentajes está en el eje de las ordenadas, el eje de las abscisas representa las dosis (micro molar) en escala logarítmica. Cada punto cuenta con 36 observaciones (n=36), las barras de error corresponden a la desviación estándar de la media. Todos los grupos cumplen el supuesto de normalidad y homocedasticidad: se hicieron análisis estadísticos multivariados ANOVA con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

9.3. Expresión Genética de Biomarcadores.

9.3.1. Calidad del Material Genético y Validación de los Oligonucleótidos

Una vez realizada la extracción de ARN desde las células HepG2 tratadas con los bloqueadores adrenérgicos, incluyendo sus respectivos controles positivos (TM) y negativos (células intactas) preestablecidos en la metodología. Se evaluó la integridad del material genético por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 11) y se cuantificó con *BioDrop*, obteniendo proporciones de A_{260}/A_{280} entre 1.7 – 2.0, A_{260}/A_{230} entre 1.8 – 2.1 y absorbancias menores a 0.06 a 320 nm.

Estos resultados demostraron que el ARN total estaba ligeramente degradado, pero no contenía ADN genómico, proteínas u otras impurezas en cantidad suficiente para interferir en las siguientes etapas.

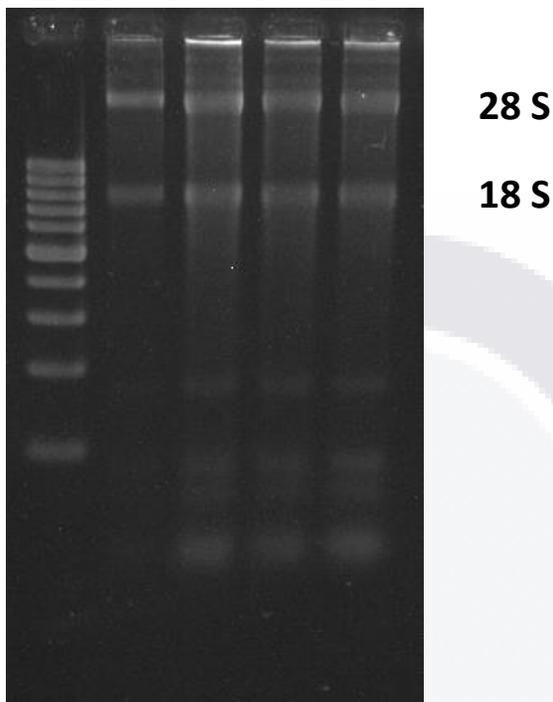


Figura 11. Integridad del ARN total. Se muestra la fotografía del gel de agarosa en el que se cargaron y corrieron 4 muestras elegidas al azar del material genético. Las bandas más intensas que se señalan en la imagen corresponden al ARN ribosómico 28S y 18S, con longitudes entre 5 y 1.9 kb respectivamente.

Posteriormente se validó la especificidad de los oligonucleótidos diseñados y la retrotranscripción mediante una PCR punto final con el cADN, como se describe en la metodología. En la Figura 12 se puede constatar que las bandas corresponden a las longitudes estimadas de las PCR *in silico* (tabla 5). Todas las muestras se corrieron bajo el mismo protocolo del termociclador (Anexo I), por lo que puede observarse algunas inespecificidades en el gel (barrido sobre o bajo la banda *target*).

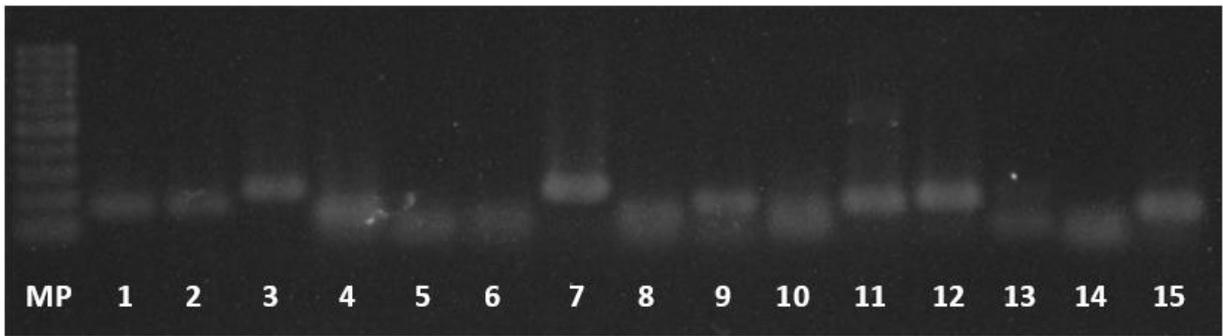


Figura 12. Evaluación del cADN y oligonucleótidos. Se observan los productos de PCR de muestras elegidas al azar corridas en un gel de agarosa al 1.5%. 1; ARN Ribosomal 18S. 2; GRP78. 3; CHOP. 4; PERK. 5; IRE. 6; ATF6. 7; ATF4. 8; XBP1. 9; Calreticulina. 10; BCL-2. 11; BAX. 12; Caspasa 3. 13; Beclin-1. 14; LC3A. 15; ATG5.

Lo anterior se modificó incrementando la temperatura de fusión en los genes correspondientes, siguiendo las temperaturas de alineamiento (T_m) recomendadas por los programas informáticos para incrementar la especificidad. Los resultados de dichas modificaciones se pueden observar en las curvas de fusión (o disociación) de las RT-qPCR. En el ejemplo presentado se observa la curva del ARN Ribosomal 18S, que se utilizó como el gen constitutivo (Figura 13): La Temperatura indicada en el gráfico corresponde a la temperatura de fusión que representa la temperatura en la que la mitad de la doble hélice del ADN está desnaturalizada, en el gráfico representado como derivada negativa de esa fluorescencia, el pico representa el punto de inflexión. La señal se detecta de manera similar a la curva de amplificación en tiempo real, el fluoróforo intercalador de ADN permite la detección de la señal. La pequeña señal de fluorescencia graficada al principio puede corresponder a la formación de dímeros por parte de los oligonucleótidos, sin embargo es una señal relativamente baja.

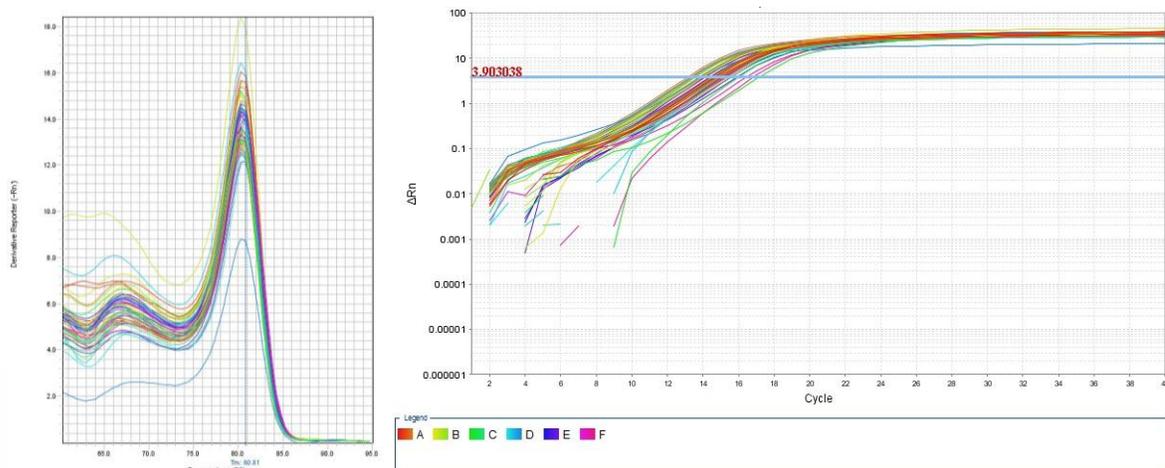


Figura 13. Curva de fusión y amplificación del ARNm ribosomal 18S. Izquierda: la derivada negativa de la curva de disociación, que grafica cambios en la fluorescencia por unidad de temperatura. A la derecha, la curva de amplificación donde viene graficado el umbral en unidades relativas de fluorescencia a partir del cual se obtuvieron los Cts. Debajo aparece el código de color que utilizó para las filas de las placas.

9.3.2. Chaperonas Moleculares Residentes del RE

La respuesta UPR comienza con el desacople de la proteína de choque térmico GRP78 de los sensores transmembranales del RE para servir como chaperona. Lo anterior ocurre si las circunstancias conducen a una acumulación de proteínas mal plegadas, y un sistema insuficiente para exportarlas al citosol o plegarlas adecuadamente.

Por ello GRP78 se le denomina el sensor o interruptor maestro de la UPR, e indica en primera instancia si hay un estrés reticular que conduzca a la acumulación de proteínas mal plegadas (94).

En el estudio de la cinética de expresión de este biomarcador muestra que el tratamiento con carvedilol (Figura 14A) en las primeras 4 hrs hubo una sobreexpresión a las tres concentraciones estudiadas, siendo más significativa a la menor de 0.01 μM , que es equiparable con el control positivo de TM (5.94 ± 0.03 y 6.05 ± 0.97 respectivamente). También se observó que a medida que pasa el tiempo se reguló la expresión, sin embargo, a las 12 hrs aún fue significativa la diferencia con la concentración de 0.01 μM (2.70 ± 0.08), a este tiempo el gráfico tuvo una forma dosis-dependiente inversa.

Por otro lado, el grupo de tamsulosina (Figura 14B) presentó una sobreexpresión importante dentro de las primeras horas del tratamiento con las dosis mayores; a las 4 hrs con 0.05 μM se expresó hasta 6.69 ± 0.99 y con 0.1 μM 6.38 ± 0.93 veces respecto al control negativo, comportamiento que duró hasta las 8 hrs con 7.46 ± 1.95 y 5.82 ± 1.16 veces respectivamente.

A la concentración más baja (0.01 μM) de tamsulosina no hubo efectos estadísticos significativos, cabe mencionar que la expresión se mantuvo con valores entre 1.61-3.08.

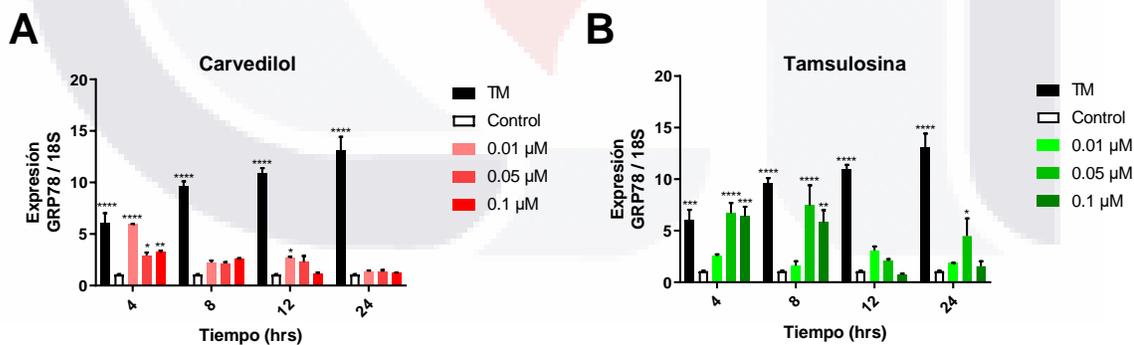
La calnexina y calreticulina son proteínas importantes que participan en el denominado “control de calidad” del RE, particularmente en el proceso de plegamiento. Tienen una participación clave en las primeras etapas de la UPR con el objetivo principal de aliviar la carga de proteínas mal plegadas (95), por lo que se incluye en el set de gráficos de la Gráfica 5. En ambos grupos se observó que se los estímulos dispararon la expresión del ARNm de dicha proteína en las células HepG2.

En el grupo del Carvedilol (Figura 14C), se observó que todos los tiempos evaluados, excepto las 8 hrs, se vio una tendencia dosis-dependiente inversa, con niveles de expresión desde las 18 hasta las 117 veces más que el control negativo: A las primeras 4 hrs. Los niveles de expresión relativa a las tres dosis empleadas alcanzaron la misma significancia del control positivo de TM con niveles de expresión muy similares: TM: 87.42 ± 13.08 , 0.01 μM : 83.19 ± 15.49 , 0.05 μM : 69.59 ± 4.22 , 0.1 μM : 64.77 ± 7.77 . A las 8 hrs, disminuyó ligeramente los niveles de expresión relativa en todos los grupos, sin embargo, aún fueron significativos: 0.01 μM : 52.38 ± 0.43 , 0.05 μM : 66.42 ± 2.23 y 0.1 μM : 58.00 ± 13.49 . Tras 12 hrs de interacción, los grupos de 0.05 y 0.1 disminuyó ligeramente la expresión de ARNm (61.33 ± 9.91 y 48.73 ± 8.02 respectivamente), sin embargo, el grupo con 0.01 μM tiene un pico de 117.66 ± 7.62 respecto al control negativo. A las 24 hrs disminuyeron los niveles de expresión del ARNm de calreticulina de las células tratadas con carvedilol, sin embargo, sigue siendo significativo a la menor concentración (0.01 μM).

En el grupo de tamsulosina (Figura 14D) se observó que a la dosis de 0.01 μM el ARNm que codifica para calreticulina se sobreexpresó hasta las 12 hrs, mientras que 0.05 μM y 0.1 μM disminuyo paulatinamente; A las 4 hrs todos los grupos presentaron una sobreexpresión de la calreticulina, siendo más significativos los grupos de 0.05 μM y 0.1 μM , con los mismos niveles de significancia que el control positivo: TM: 87.43 ± 13.08 , 0.01 μM : 41.29 ± 4.08 , 0.05 μM : 93.17 ± 14.99 , 0.1 μM : 79.75 ± 14.47 .

A las 8 hrs el grupo de 0.01 μM subió la expresión hasta 53.53 ± 19.47 . A las 12 hrs de tratamiento los niveles de expresión con 0.01 μM suben hasta 135.64 ± 11.87 , siendo el punto más alto de la cinética, mientras que el grupo de 0.05 μM y 0.1 μM siguió regulando sus niveles a la baja. Tras 24 hrs de tratamiento los niveles se regularon hasta llegar a 47.28 ± 2.48 , 43.27 ± 7.09 y 25.70 ± 2.49 para 0.01, 0.05 y 0.1 μM respectivamente.

Tras 24 hrs de tratamiento el grupo de 0.01 μM reguló sus niveles de expresión hasta ser estadísticamente igual al control (25.70 ± 2.49), los grupos de 0.05 y 0.1 también disminuyeron hasta 47.28 ± 2.48 , 43.27 ± 7.09 respectivamente, aunque siguen siendo diferentes al control. Cabe destacar que en este punto el control positivo de TM sigue subiendo (366.90 ± 3.82 en este punto).



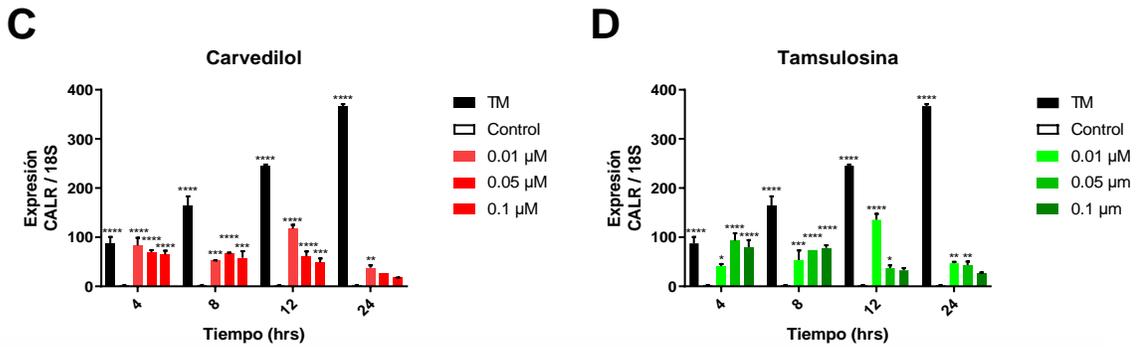


Figura 14. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de chaperonas reticulares. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Arriba se encuentran las gráficas que corresponden a la expresión de la proteína de choque térmico GRP78 o Bip (A y B), y abajo las de Calreticulina (C y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones (n=3) y se representa como el promedio \pm desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos multivariados ANOVA con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. TM: Tunicamicina.

9.3.3. Rama PERK - ATF4

La proteína PERK es uno de los sensores transmembranales del RE que inicia la UPR. Cuando se activa, tiene como primera función fosforilar al factor eIF2 α con su dominio kinasa para provocar una atenuación traduccional, y como segunda, la traducción preferencial de genes como ATF4 (96).

En la Figura 15A observamos que el carvedilol no presentó diferencias estadísticas significativas en los niveles de ARNm de PERK a los tiempos y concentraciones contempladas en el estudio. Sin embargo, el análisis estadístico se demostró que a las 12hrs con 0.01 μ M casi se duplica la producción de ARNm de ATF4 (1.90 ± 0.14), similar al control positivo de TM (2.30 ± 0.03) (Figura 15C).

Por otro lado, las células tratadas con tamsulosina solo tuvieron una respuesta a las 12 hrs a la concentración más baja (0.01 μ M) con 2.70 ± 0.82 más ARNm de PERK que el control negativo (Figura 15B). En concordancia con lo anterior, el factor de transcripción activador

4 también tuvo un incremento significativo de 1.46 ± 0.01 con las mismas condiciones (Figura 15D).

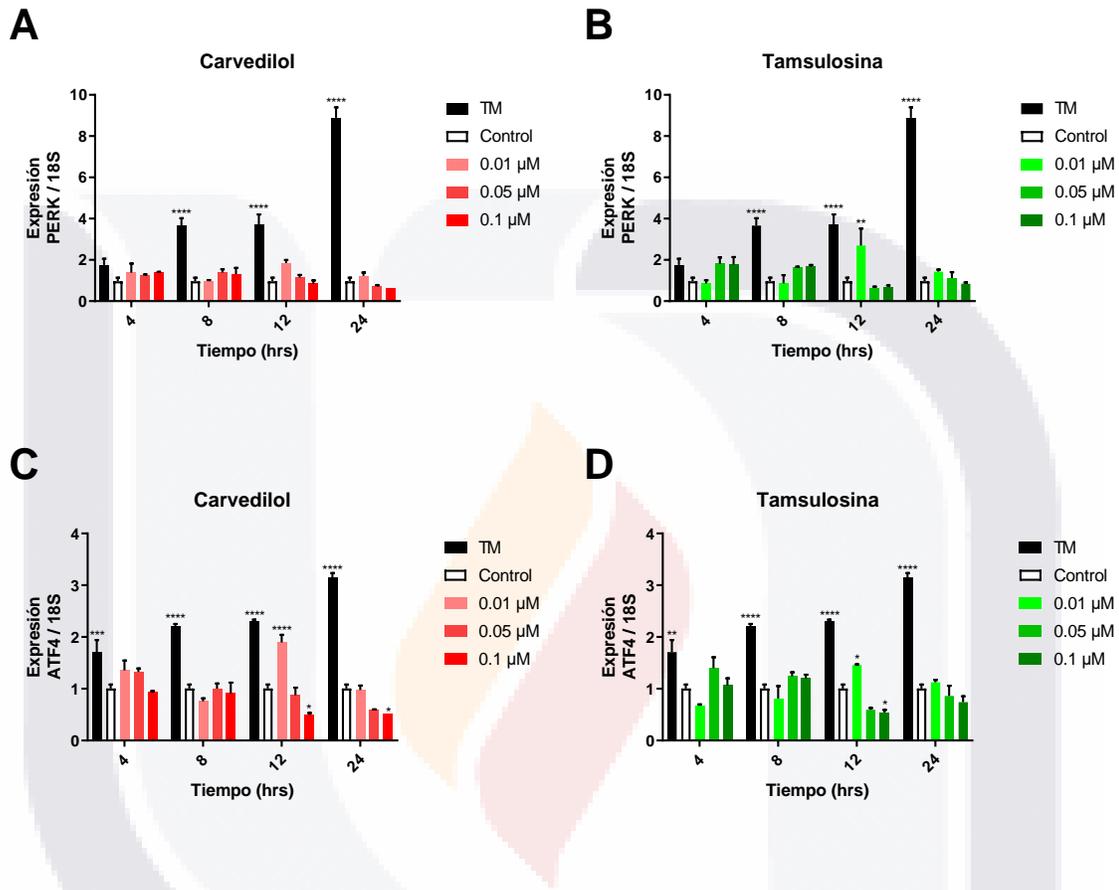


Figura 15. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de la rama PERK - ATF4. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Arriba se encuentran las gráficas que corresponden a la expresión de PERK (A y B), y abajo las de ATF4 (C y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones (n=3) y se representa como el promedio \pm desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos ANOVA de dos vías con *post hoc* de *Dunnnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. TM: Tunicamicina.

9.3.4. Rama IRE - XBP1

Otra de las ramas de la URP se desencadena por la activación de la proteína integral IRE1 α . Es una proteína transmembranal con actividad serin/treonin quinasa y endoribonucleasa. Con el dominio capaz de escindir fragmento de ácidos nucleicos elimina un intrón del ARNm que codifica para XBP1, quien funge un papel sumamente importante translocándose al núcleo y estimulando la expresión de proteínas de respuesta al estrés (97).

En el grupo del carvedilol (Figura 16A) pudo observarse un aumento significativo de la expresión de IRE1 α dentro de las primeras 4 hrs con 0.1 μ M similar al grupo positivo (1.56 \pm 0.29). También se observó una sobreexpresión tras 12 hrs de tratamiento con la concentración 0.01 μ M, expresando 2.51 \pm 0.10 veces más que el control negativo.

Los grupos tratados con tamsulosina (Figura 16B) tuvieron un comportamiento muy similar al carvedilol: las diferencias estadísticas se presentaron a las 4 hrs el grupo de 0.05 μ M (1.53 \pm 0.05), tras 8 hrs con 0.1 μ M (2.54 \pm 0.45) y a las 12 hrs con 0.01 μ M (2.54 \pm 0.45).

La expresión del ARNm que codifica para XBP1 de los grupos tratados con carvedilol (Figura 16C) tienen significancia estadística dentro de las primeras 4 hrs con 0.05 y 0.01 μ M con niveles de 2.36 \pm 0.29 y 2.39 \pm 0.10 respectivamente. Y a las 12 hrs se vuelve a observar una sobreexpresión con 0.01 μ M de 2.89 \pm 0.24.

El grupo tratado con tamsulosina (Figura 16D) presentó niveles altos a las primeras 4 hrs a la concentración de 0.05 μ M (2.58 \pm 0.34) y con 0.01 μ M tras 12 hrs de interacción (2.49 \pm 0.39).

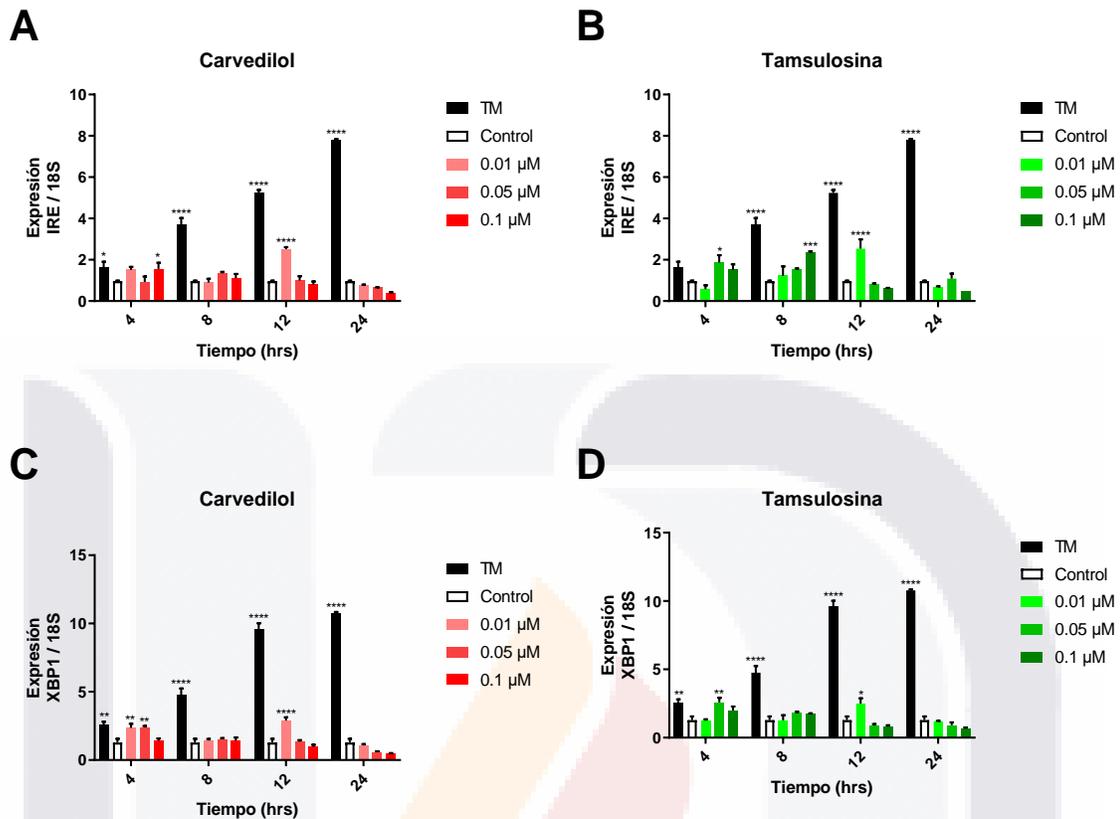


Figura 16. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de la rama IRE1 α - XBP1. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Arriba se encuentran las gráficas que corresponden a la expresión de IRE (A y B), y abajo las de XBP1 (C y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones (n=3) y se representa como el promedio \pm desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos ANOVA de dos vías con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. TM: Tunicamicina.

9.3.5. Rama ATF6.

La tercer y última rama desencadenada por el ERE y la subsecuente UPR, inicia con la translocación de la proteína transmembranal ATF6 al complejo de Golgi, donde enzimas residentes hacen un corte proteolítico que la divide en dos subunidades. Una de ellas funge el papel como factor de transcripción y estimula genes de respuesta al estrés (74).

En el set de gráficas de la Figura 17 se puede observar que los bloqueadores adrenérgicos (tanto el carvedilol como la tamsulosina) regularon a la baja la expresión de ATF6, desde las primeras 4 hrs el decremento fue estadísticamente significativo, con niveles hasta 10 veces menores para el carvedilol y hasta 100 con tamsulosina.

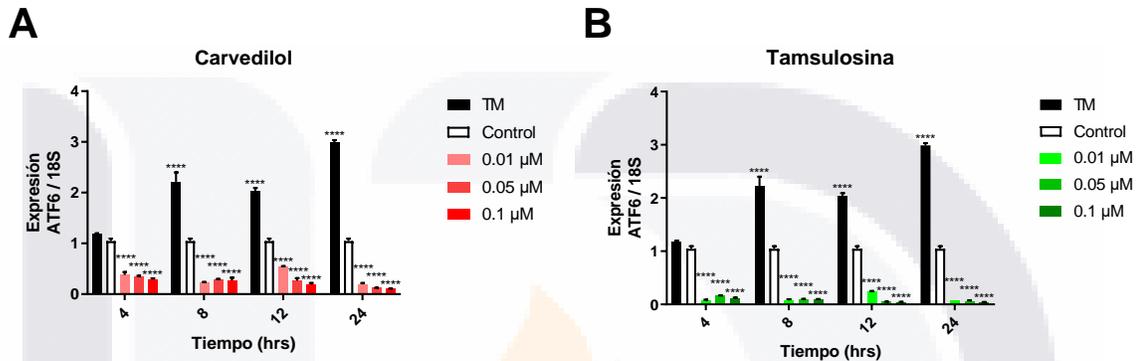


Figura 17. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de la rama ATF6. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones (n=3) y se representa como el promedio \pm desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos ANOVA de dos vías con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. TM: Tunicamicina.

9.3.6. Activación de Bax y Bcl2.

Las proteínas de la familia Bcl2 ayudan a controlar la supervivencia o muerte de una célula por medio de apoptosis. Particularmente en este estudio se presentaron los niveles de ARNm de la proteína antiapoptótica Bcl2 y su contraparte proapoptótica Bax.

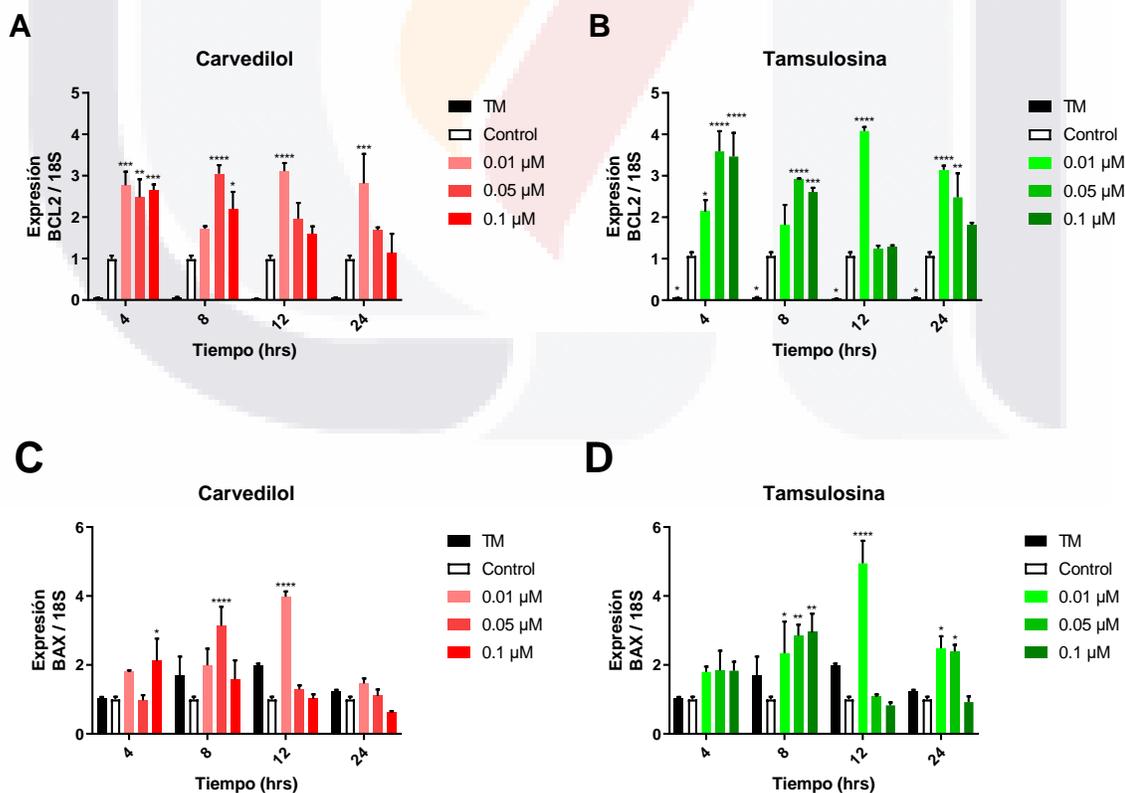
De manera general podemos observar en la razón de Bcl2/Bax (Figura 18E-F) de las células HepG2 frente al estrés provocado por los bloqueadores adrenérgicos generan supervivencia, ya que hay mayor proporción de la proteína anti que la pro apoptosis, particularmente a las 4 hrs con 0.05 μM (2.53 ± 0.05 y 2.19 ± 0.40 para el carvedilol y tamsulosina) y a las 24 hrs con 0.1 μM solo en el caso de la tamsulosina (2.12 ± 0.43): En las

gráficas de la Figura 18A-B se observaron niveles de Bcl2 mayores respecto al control desde las primeras 4 hrs que llegan hasta las 4 veces respecto al control.

Por otro lado, en los gráficos C-D (Figura 18) se observaron los niveles de la proteína proapoptosis Bax sobreexpresarse en los grupos tratados con 0.05 μM de carvedilol a las 8 hrs con 3.14 ± 0.55 y 0.01 μM tras 12 hrs con 3.98 ± 0.16 .

Los grupos tratados con tamsulosina presentaron una sobreexpresión a las 8 hrs en todos los casos, con valores entre 2.34 y 2.95. A las 12 hrs hubo un pico con 0.01 μM con 4.95 ± 0.65 . Tras 24 hrs siguió siendo significativa la diferencia con 0.01 μM y 0.05 μM vuelve a subir con 2.39 ± 0.19 .

Estos resultados nos indican un posible estímulo estresor derivado de los tratamientos farmacológicos para las células HepG2, especialmente notorio a las 12 hrs con los grupos de 0.01 μM . Sin embargo, la señal pro-supervivencia es mayor en todos los casos (Figura 18E-F).



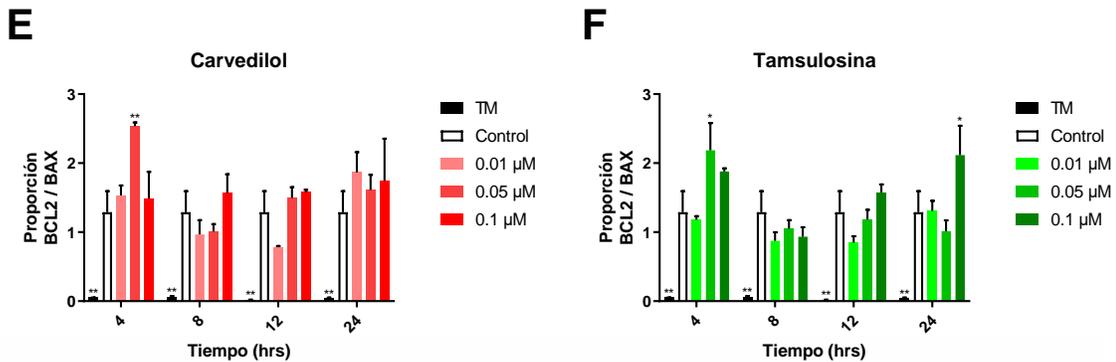


Figura 18. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Activación de Bcl2. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones ($n=3$) y se representa como el promedio \pm desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos ANOVA de dos vías con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$. TM: Tunicamicina.

9.3.7. Apoptosis

Una de las proteínas efectoras de la UPR es CHOP, quien participa una vez que el ERE se perpetua y es irreversible. La sobreexpresión de esta proteína puede llevar a la muerte celular, al igual que la caspasa 3, que participa en una cadena de señalización que culmina en la apoptosis (62).

En las gráficas de la Figura 19A-B puede observarse que ni la tamsulosina ni el carvedilol tuvieron efectos significativos en el control génico de la proteína pro apoptótica CHOP.

Por otro lado, la expresión de la caspasa 3 se reguló a la baja a todos los tiempos y concentraciones estudiadas en la cinética, a excepción de 0.01 μM a las 12 hrs de ambos casos (Figura 19C-D).

Con las observaciones hasta este momento podemos concluir que, a pesar de que lo tratamientos con bloqueadores adrenérgico que estimulan la UPR, no se trata de un factor estresante que provoque una respuesta crónica que pueda desencadenar en la muerte celular.

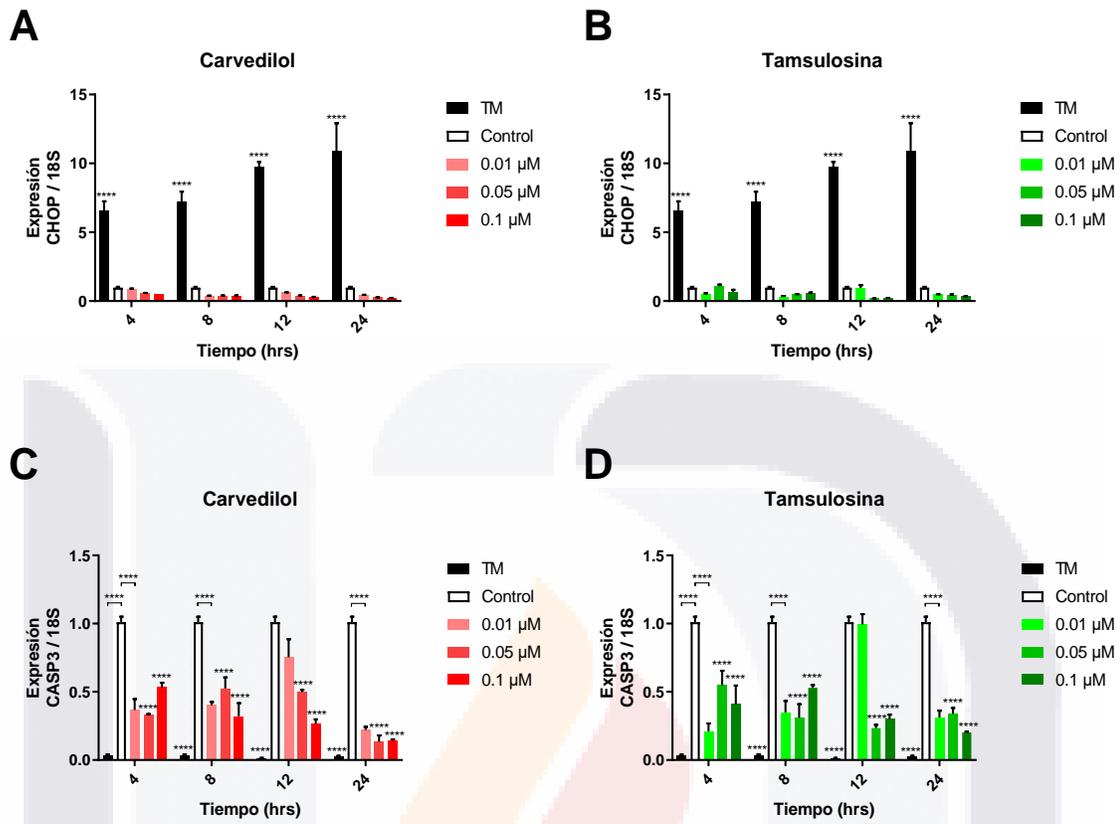


Figura 19. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Muerte celular. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones (n=3) y se representa como el promedio ± desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos ANOVA de dos vías con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. TM: Tunicamicina.

9.3.8. Macroautofagia

El último set de genes que se estudiaron está relacionado con la formación del autofagosoma: Una de las vías o rutas interrelacionadas con la UPR es la autofagia, que busca como última alternativa solucionar y aliviar la carga de biomoléculas no funcionales degradándolas por medio de enzimas lisosomales (98). Esta respuesta podemos asociarla a

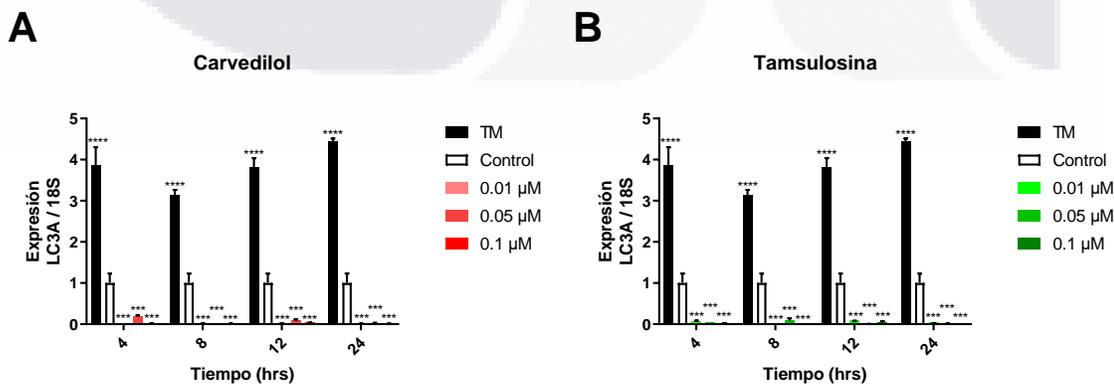
una señal de supervivencia ya que tiene la función principal de deshacerse del material disfuncional que puede alterar la homeostasis celular.

En las gráficas de la Figura 20E-F puede observarse que la expresión de Beclin-1 no presentan diferencias estadísticas significativas a las dosis y tiempos contemplados en el proyecto, a pesar de que todas las dosis presentaron una tendencia a la baja. El control positivo de TM incrementa los niveles hasta 7.83 ± 2.37 a las 24 hrs.

En el caso de la proteína asociada a los microtúbulos 1A/1B La cadena ligera 3B (LC3) los bloqueadores adrenérgicos regularon a la baja la expresión de su ARNm; todas las dosis y tiempos tuvieron el mismo nivel de significancia, siendo que el control positivo de TM sube hasta 4.44 ± 0.07 a las 24 hrs (Figura 20 A-B).

Finalmente, el factor relacionado con autofagia ATG5 es uno de los genes estimulados en la UPR para favorecer la formación de autofagosomas (99): presenta niveles estables de expresión, sin embargo incrementa en las primeras 4 hrs en las células tratadas con 0.05 y 0.1 μM de tamsulosina, tras 8 hrs solo con 0.05 μM , y atrás 12 hrs de exposición solo a las 0.01 μM .

En los grupos tratados con carvedilol el comportamiento fue muy similar, sin embargo, las diferencias estadísticas se registraron hasta las 8 hrs de interacción, y a las 12 hrs también hubo un incremento considerable con 0.05 μM (Figura 20C-D).



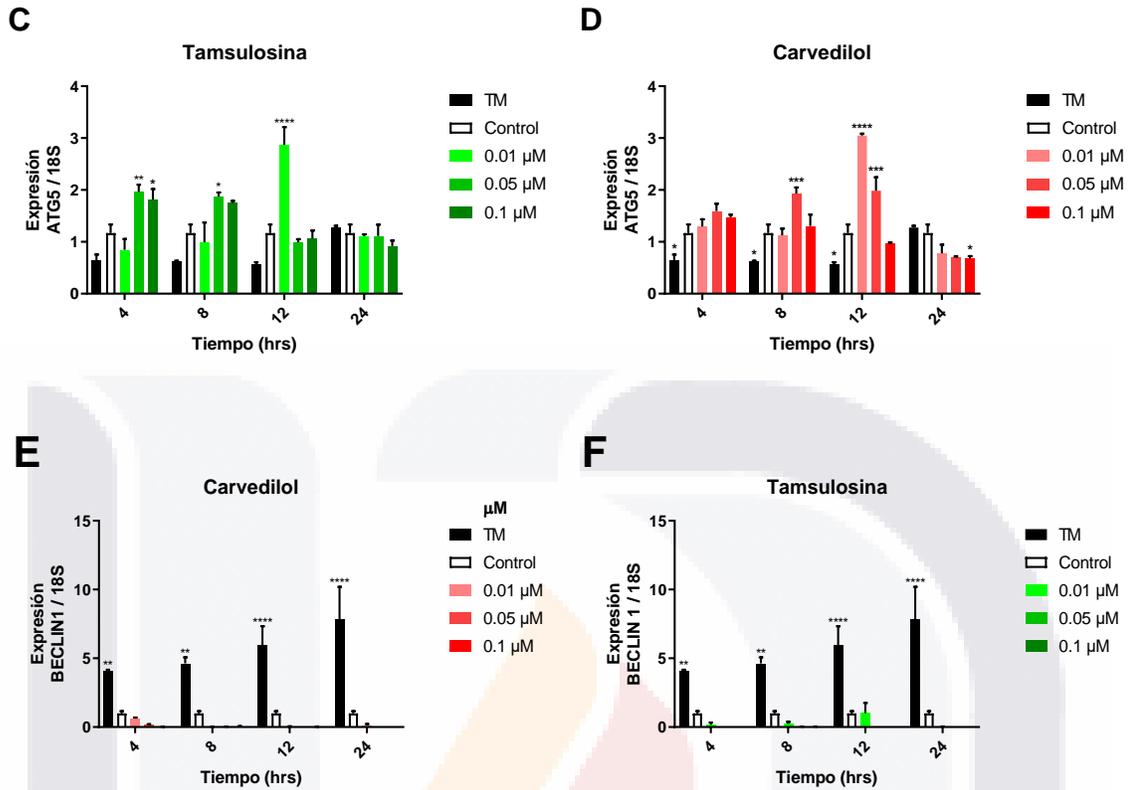


Figura 20. Cinética de la expresión génica en células HepG2: Autofagia. Las células HepG2 se interactuaron con las preparaciones farmacológicas como se indica en la sección de materiales y métodos por un periodo de 4, 8, 12 y 24 hrs. En color rojo (izquierda) podemos encontrar las gráficas que corresponden a los tratamientos de carvedilol (A y C), y en verde (derecha) de tamsulosina (B y D). Cada grupo cuenta con tres observaciones (n=3) y se representa como el promedio \pm desviación estándar de la media. Se hicieron análisis estadísticos ANOVA de dos vías con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. TM: Tunicamicina.

9.4. Expresión Proteica.

9.4.1. Tinción de las Membranas.

Después del análisis de los resultados de la expresión génica se decidió evaluar el efecto de los tratamientos farmacológicos a 12 horas a una concentración de 0.01 μM de tamsulosina y carvedilol, ya que fueron las condiciones a las que la sobreexpresión de genes relacionados con la UPR fue más marcada. Por medio de los anticuerpos de la tabla 6, se evaluó la expresión de la síntesis general de proteínas, y particularmente de GRP78 y LC3A/B.

Se cultivaron células HepG2 en placas de 6 pozos (250,000 células/pozo) en 2 mL de medio de cultivo suplementado hasta una confluencia al 80% (tras 24 hrs aproximadamente), y se hicieron las interacciones con los medicamentos. La extracción de proteínas totales se hizo lisando las células con un *scraper* y buffer RIPA e inhibidores de proteasas (PMSF o coctel). Después de centrifugar para separar los componentes celulares más grandes, se cuantificó la cantidad de proteína con métodos colorimétricos (BCA o Bradford). Lo anterior se hizo con la finalidad de calcular la cantidad de proteína extraída por unidad volumétrica, y así estandarizar la técnica cuantitativa. Se cargaron 10 µg de proteína/pozo en un gel SDS-PAGE para la electroforesis.

Se tiñeron las membranas PDVF con el rojo de Ponceau (Figura 14). La afinidad del colorante azido (N_3^-) derivado con las proteínas permite visualizarlas y hacer una evaluación cualitativa del proceso. Estos resultados muestran que la electrotransferencia se hizo exitosamente y que la carga de proteínas por carril no tuvo variaciones perceptibles a simple vista.

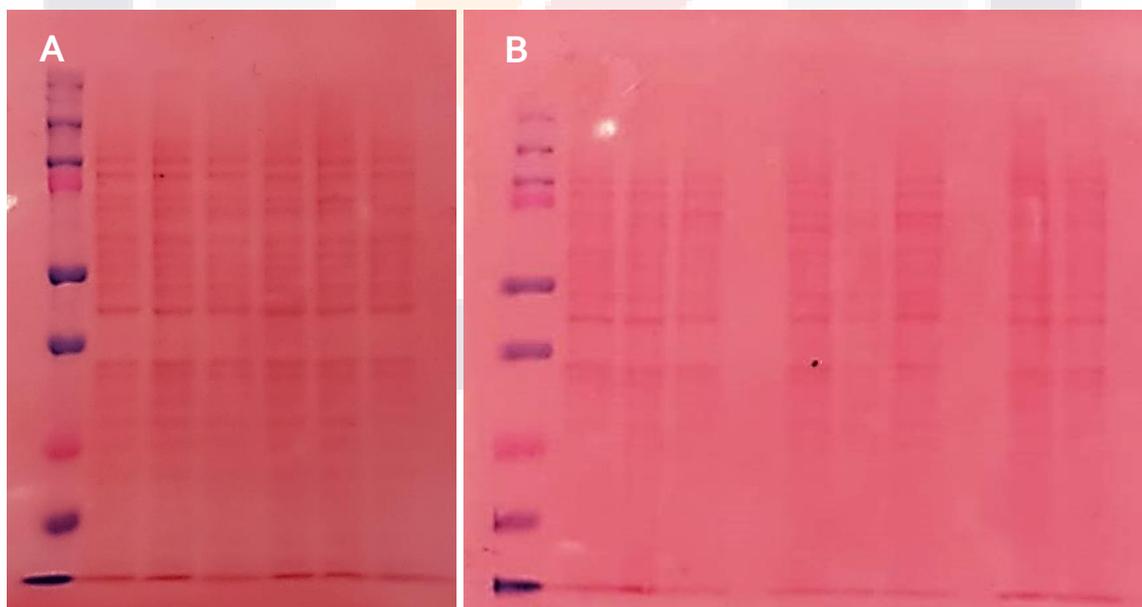


Figura 21. Tinción con rojo de Ponceau. En la imagen se muestran dos fotografías de membranas de PVDF teñidas. A) Es la primera de tres repeticiones en los análisis de síntesis global de proteínas. B) Es la primera de dos membranas que corresponden a la caracterización de proteínas.

9.4.2. Caracterización de GRP78.

La expresión de la proteína GRP78 no es diferente de los grupos tratados con los adrenobloqueadores: el control tiene una media de 0.053 ± 0.009 unidades relativas a GADPH, el grupo tratado con tamsulosina 0.073 ± 0.025 y el carvedilol 0.034 ± 0.008 . Por otro lado, la interacción con TM disparó la expresión de este marcador hasta 0.869 ± 0.104 unidades (Figura 22B).

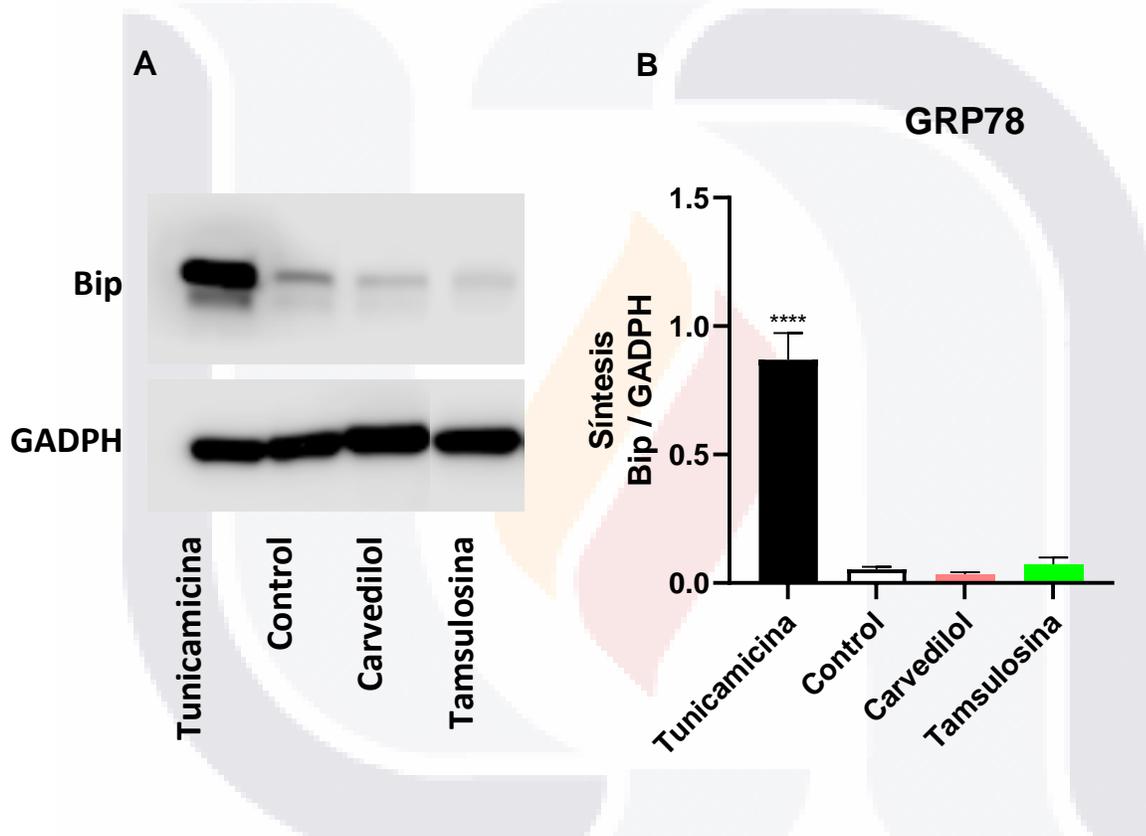


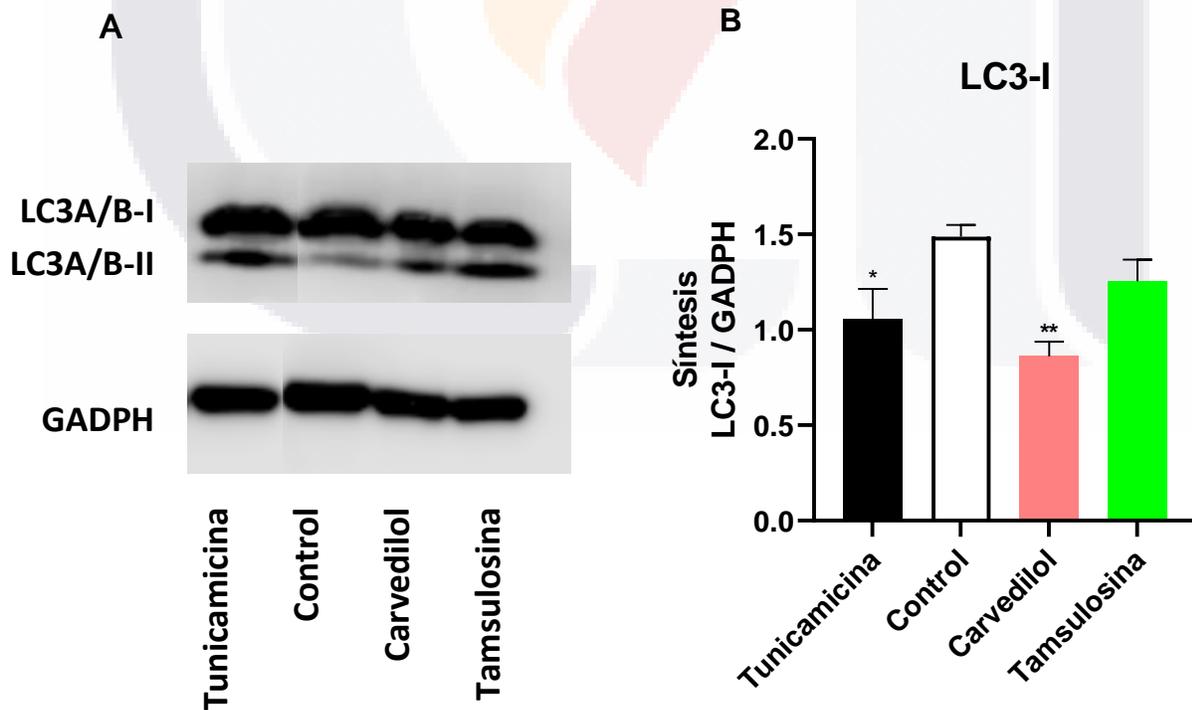
Figura 22. Efectos de los tratamientos farmacológicos en la expresión de GRP78. A) Se observa una fotografía de una membrana de PVDF revelada con un tratamiento por quimioluminiscencia. B) Se presenta el gráfico derivado del tratamiento matemático de los datos. Los resultados se analizaron por densitometría con el *software Image J* y normalizados con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Cada grupo cuenta con 4 repeticiones (n=4), el gráfico representa los promedios con barras de error y la desviación estándar de la media. En todos los casos hubo una distribución normal y se cumplió el supuesto de homocedasticidad. Se hizo ANOVA de un factor con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia: * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

9.4.3. Caracterización de LC3A/B.

Se midió la expresión de las proteínas asociadas a los microtúbulos 1A/1B La cadena ligera 3B, que se asocian con etapas iniciales en la formación de un autofagosoma y la razón de LC3A/B-I y LC3A/B-II. En el gráfico de la Figura 23B se pudo observar que la expresión de LC3A/B-I presenta diferencias estadísticas significativa en el grupo tratado con carvedilol y con TM, con 0.862 ± 0.076 y 1.054 ± 0.16 respectivamente.

LC3A/B-II mostró una tendencia a la baja con carvedilol y tamsulosina con 0.332 ± 0.134 y 0.478 ± 0.185 , como se observó en el gráfico de la Figura 23C. Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Para sintetizar la información anterior, se analizó con una razón en los niveles relativos de expresión de LC3 (Figura 23D) donde el grupo tratado con TM presenta un mayor índice respecto a los demás grupos con 0.811 ± 0.416 . Sin embargo, el análisis estadístico tampoco fue significativo.



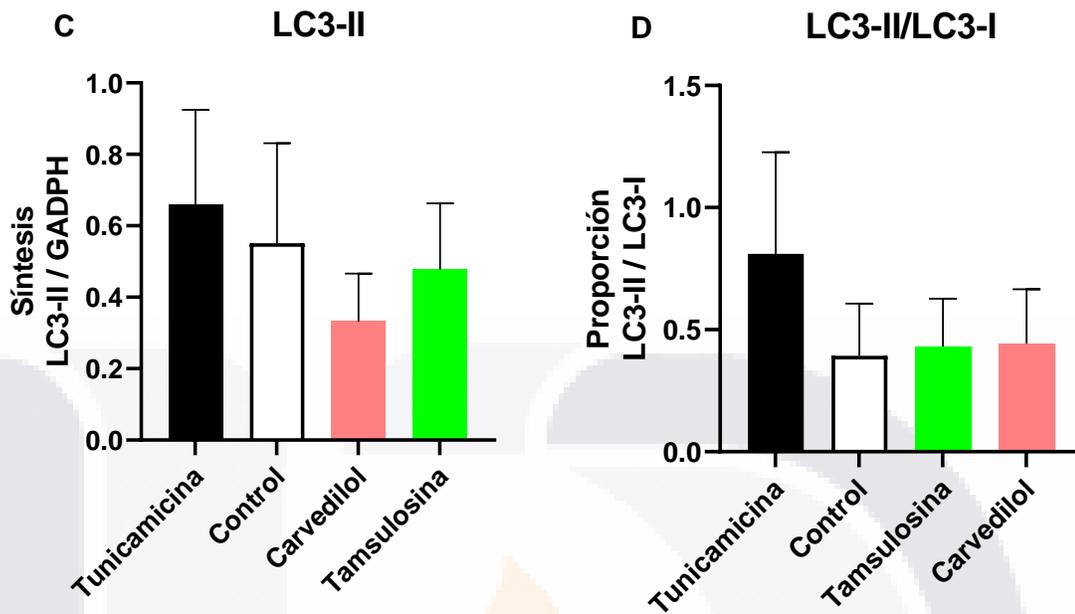


Figura 23. Efectos de los tratamientos farmacológicos en la expresión de LC3A/B. A) Se observa una fotografía de una membrana de PVDF revelada con un tratamiento por quimioluminiscencia, donde la banda superior corresponde a LC3-I y la más delgada abajo es LC3-II. B) Se presenta el gráfico derivado del tratamiento matemático de los datos para LC3-I. C) gráfico de LC3-II. D) Se presenta la razón de LC3-II por LC3-I en cada muestra. Los resultados se analizaron por densitometría con el *software Image J* y normalizados con gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Cada grupo cuenta con 4 repeticiones (n=4), el gráfico representa los promedios con barras de error y la desviación estándar de la media. En todos los casos hubo una distribución normal y se cumplió el supuesto de homocedasticidad. Se hizo ANOVA de un factor con *post hoc* de *Dunnett*. Los asteriscos indican el nivel de significancia: * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

9.4.4. Síntesis Global de Proteínas.

Las células HepG2 tratadas para este experimento tuvieron una etapa previa de incubación de 15 min con puromicina 1 μ M disuelta en medio de cultivo suplementado antes de la extracción de proteínas. La puromicina es un metabolito producido por *Streptomyces alboniger* con propiedades antibióticas. Tiene la estructura de un aminonucleósido, compuesto de una adenosina modificada unida covalentemente a una tirosina. Se parece estructuralmente al extremo 3' aminoacilado del ARNt, sin embargo, tiene una diferencia fundamental de la que deriva su funcionalidad para detener la traducción: Entre la

adenosina modificada y el aminoácido hay un enlace peptídico, mientras que el aa-ARNt tiene un enlace tipo éster (Figura 24) (100).

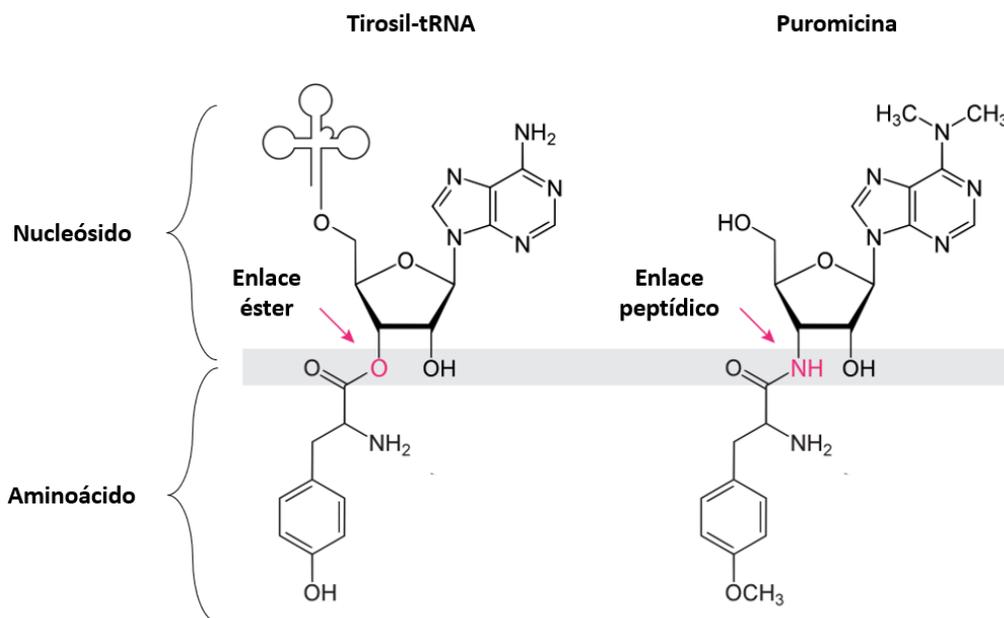


Figura 24. Comparación estructural de la puromicina y aa-ARNt. A la izquierda se muestra una representación de la estructura del ARN de transferencia acarreado una tirosina (no es a escala). A la derecha se observa la estructura de la puromicina. Se resalta la diferencia en el tipo de enlace en color rosa. Imagen modificada de Aviner R. (2020).

La similitud estructural habilita a la puromicina a entrar al sitio A del ribosoma, donde el centro peptidil transferasa cataliza la unión de la cadena polipeptídica naciente y el grupo amino libre de la tirosina. Sin embargo, el enlace peptídico entre el nucleósido y el aminoácido de la puromicina no puede ser cortado por la peptidil transferasa, esto conduce al desmontaje de las subunidades del ribosoma y a la liberación de cadenas de polipéptidos con puromicina en el extremo C-terminal (100). Esta reacción, denominada puromicilación no requiere de energía, ni es amino específica.

Estos productos aberrantes son identificados por el sistema de control de calidad de la célula y degradados para evitar un estrés proteotóxico que comprometa la integridad celular. Por ello el procedimiento requiere de un pequeño pulso de puromicina en las células a baja concentración (100), en éste caso se usó una solución de puromicina 1 μM y se interactuó con las células solo por 15 min (la mitad del tiempo recomendada), para evitar exacerbar el posible estrés provocado por los tratamientos previos de tamsulosina y carvedilol. El lavado con digitonina se hizo para retirar el exceso de puromicina.

El anticuerpo monoclonal utilizado para la inmunodetección (Tabla 6) está diseñado para identificar los productos peptidil-puromicina liberados por la maquinaria celular de traducción, es decir que no es selectivo para un tipo de proteína en particular. Para probar la especificidad del anticuerpo, del equipo de detección de quimioluminiscencia y validar la técnica se analizó una muestra si en tratamiento previo con puromicina y otro con un inhibidor de la traducción.

La muestra con el inhibidor de traducción fue tratada con HHT 50 μM , que es un alcaloide pentacíclico aislado de *Cephalotaxus harrintonia*. Se une a la subunidad 60S del ribosoma en el centro peptidil transferasa (101). Para evitar que sus efectos inhibidores repercutan en la viabilidad celular se incubaron por 9 hrs (87). Las membranas de la inmunotransferencia se revelaron por quimioluminiscencia y se analizaron por densitometría (ver metodología). Para la normalización de datos y calcular la expresión proteica relativa se empleó como control de carga la enzima GADPH, para lo que hubo un previo proceso de “lavado” de los anticuerpos primarios y secundarios unidos a las proteínas con *harsh stripping buffer*.

Los resultados del análisis densitométrico (figura 25B) indican en primera instancia, que el anticuerpo primario tiene una alta especificidad contra los productos de la puromicilación: el grupo control con el pretratamiento de puromicina tiene un valor de 7.92 ± 1.15 unidades relativas, mientras que el grupo con proteínas normales, sin el pretratamiento tiene un valor de 1.98 ± 0.23 . La diferencia fue significativa, a pesar de que la tasa de síntesis proteica no fue alterada por algún agente externo.

El grupo tratado con el inhibidor de la traducción HHT, efectivamente presentó una tasa de síntesis proteica muy baja respecto al control, con 1.83 ± 0.17 unidades relativas (muy similar al grupo sin el pretratamiento de puromicina).

Los bloqueadores adrenérgicos no presentaron diferencias estadísticas significativas contra el grupo control puromicilado. Sin embargo, los niveles de significancia son diferentes al compararlo contra el grupo de HHT: el grupo tratado con tamsulosina presentó niveles de 8.31 ± 1.21 con $p=0.0005$. Los valores son ligeramente mayores al control, con tasas normales en la síntesis de proteínas.

El grupo tratado con carvedilol, por otro lado, tiene niveles de 6.50 ± 0.35 con $p=0.0056$. Claramente hay un decremento en los niveles de proteínas globales, que puede notarse a simple vista en la Figura 25A.

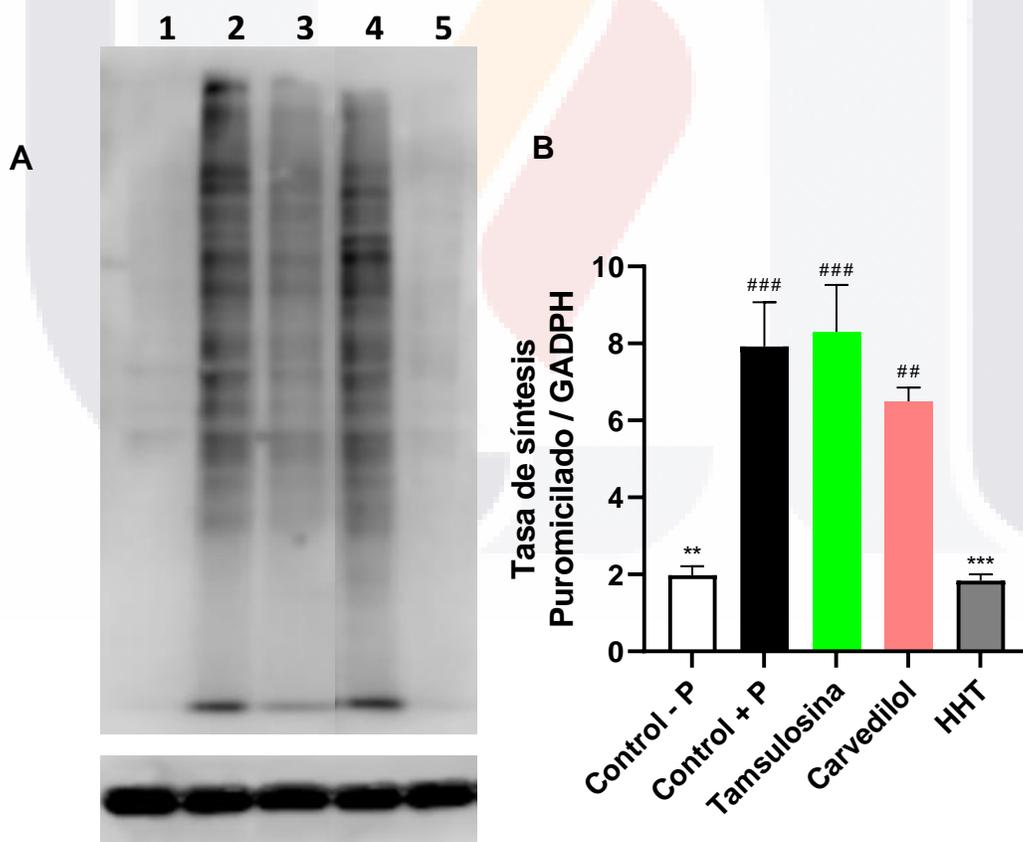


Figura 25. Efectos de los tratamientos farmacológicos en la síntesis global de proteínas. A) Fotografía de la membrana del *western blot* del experimento de la síntesis de proteínas revelada por quimioluminiscencia. 1: Control sin puromicina, 2: Control con puromicina, 3: Carvedilol, 4:

Tamsulosina, 5: HHT. B) Gráfico derivado del análisis densitométrico de las membranas de PVDF. Los resultados se analizaron con el *software Image J* y fueron normalizados con el *housekeeping* gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Cada grupo cuenta con 3 repeticiones (n=3), el gráfico representa los promedios con la desviación estándar de la media. En todos los casos hubo una distribución normal y se cumplió el supuesto de homocedasticidad. Se hizo ANOVA de un factor con *post hoc* de *Dunnnett*: Los asteriscos indican las diferencias respecto al Control con puromicina (*), los numerales son respecto al control tratado con HHT (#); * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. P: Puromicina.



Capítulo V

10. Discusión de Resultados

Partiendo de los experimentos y las observaciones redactadas en el marco teórico y los antecedentes. Se desarrolló el presente proyecto, donde los principales hallazgos fueron en la citotoxicidad posible inducida por los adrenobloqueadores, la expresión genética de biomarcadores de estrés reticular, autofagia y apoptosis, así como alteraciones en la síntesis de proteínas, lo que concuerda con los objetivos y alcances propuestos en el proyecto.

Los efectos de la tamsulosina y el carvedilol sobre la viabilidad de las células HepG2 presentaron un comportamiento similar a los resultados presentados de Medina-Pizaño (2020) (102), donde los tratamientos a menores concentraciones tuvieron un decremento en la viabilidad celular y las mayores incluso incrementaron la viabilidad, sugiriendo un efecto proliferativo. También reportan la caída de la viabilidad a medida que pasa el tiempo (tiempo dependiente) en ambos casos, es decir que a las 48 y 72 hrs, la viabilidad es menor respecto al control. Las concentraciones elegidas en el presente proyecto de investigación se eligieron en función de las concentraciones séricas reportadas en las fichas técnicas de los medicamentos (Anexo E), por lo que varias de las observaciones no pudieron compararse, fueron menores y/o diferentes. Medina-Pizaño (2020) también reporta que la tamsulosina y el carvedilol incrementan los niveles de ARNm de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) a la concentración de 0.1 μ M tras 24 hrs de tratamiento, lo que nos habla de una función desregulada a las concentraciones más bajas.

Las observaciones registradas en los ensayos de citotoxicidad con tamsulosina concuerdan con las observaciones reportadas por diversos autores, pero en líneas celulares diferentes. De acuerdo con los estudios de Forbes y colaboradores (2016) (103), algunos alfa bloqueadores tiene propiedades anticancerígenas independientes de sus efectos terapéuticos en pacientes. Sus estudios de citotoxicidad con resarzurina demostraron que

la tamsulosina es el medicamento con menor efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer prostático PC-3 (resistente a castración) y LNCap (sensible a andrógenos): La doxazosina y prazosina presentaron mayores efectos citotóxicos, en todos los casos (a las 24, 48 y 72 hrs en ambas líneas celulares). Sus efectos se le atribuyen al anillo quinolina en su estructura que puede activar la muerte celular, cuyo mecanismo puede incluir dianas celulares como la activación de caspasas 8/3, VEGF, EGFR, HER2/Neu o la topoisomerasa (46). Mientras que la tamsulosina y silodosina no tuvieron ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular incluso después de 72 horas de tratamiento continuo a la máxima concentración de 100 μM .

Otros estudios muestran que las líneas celulares de cáncer renal ACHN y Caki-2 tratadas con 50 μM de tamsulosina no mostraron cambios significativos en comparación con el naftopidil, que inhibió la proliferación mediante el arresto (supresión) del ciclo celular G1 (104). En otro estudio de Forbes y colaboradores, se reporta la citotoxicidad de distintos alfa bloqueadores sobre la línea celular humana de miofibroblastos WPMY-1. Sus hallazgos muestran que la citotoxicidad es tiempo dependiente, y que los efectos de la tamsulosina, alfuzosina y terazosina no es significativa hasta la concentración de 100 μM (reducción superior al 50% de viabilidad). En una revisión realizada por Batty y colaboradores (2016) (46), concluyen que la tamsulosina no tiene los efectos citotóxicos que ejercen otros alfa bloqueadores en líneas celulares de cáncer de próstata (PC-3, LNCaP y DU-145) . De nuevo, los efectos citotóxicos de la doxazosina, terazosina y prazosina se atribuyen al anillo quinazolina, y en naftopidil su anillo piperazina, siendo la tamsulosina un alfa bloqueador con identidad química de sulfonamida.

Es importante resaltar que los hepatocitos expresan de manera constitutiva ARs, que modulan varias de sus funciones como el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (105), cuya expresión y densidad en la membrana de los hepatocitos incrementan con la edad (106,107).

Los receptores adrenérgicos tipo 1 están relacionados con la proliferación de hepatocitos, regeneración del hígado y en glucogenólisis (108). Mientras que los tipos beta (1 y 2 predominantemente) regulan la disposición de glucosa en el hígado y el catabolismo de lípidos (107). De manera similar al glucagón, la activación de los receptores adrenérgicos tipo beta incrementa la expresión de fosfoenol piruvato, glucosa 6 fosfatasa y piruvato quinasa. También se estimula la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL); la primera incrementa la hidrólisis de triglicéridos y ésteres de colesterol, la segunda activa a sirtuína 1 y la expresión de varios genes que metabolizan a los lípidos (107).

Por lo tanto, el bloqueo de los receptores adrenérgicos en los hepatocitos tiene un efecto directo en la señalización de las células. Un estudio realizado por Cruise y colaboradores (1987), encontraron que el bloqueo de los receptores $\alpha 1$ anula la síntesis de ADN durante las primeras 24 horas después de la hepatectomía parcial en ratas, particularmente por la incorporación de timidina (108). Por otro lado, el bloqueo de receptores tipo β bloquearía la liberación de glucosa por glucogenólisis y gluconeogénesis, sin embargo, estos procesos no son estimulados en el estudio, además el medio de cultivo contiene glucosa, no habría motivo por el que se necesitaría liberar más. La citotoxicidad observada a mayores tiempos de interacción podríamos atribuirla entonces a los metabolitos secundarios que se producen, pero no hay evidencia (propia o de otros autores) concluyente que sustente esta aseveración.

La generación de metabolitos reactivos derivados de su biotransformación en el hígado vía CYP P450, es una de las hipótesis más plausibles de la etiopatogenia de la hepatotoxicidad inducida por fármacos (60). El proceso de detoxificación de xenobióticos consiste en una serie de reacciones que se clasifican de fase I y fase II. La primera consiste en reacciones redox e hidrólisis catalizadas principalmente por monoxigenasas, las segundas son para conjugarlas con ácido glucurónico, sulfatos, acetatos, glutatión o aminoácidos donde participan una serie de transferasas. El objetivo final es modificar o crear grupos funcionales para aumentar su hidrosolubilidad y facilitar su excreción biliar y urinaria (58). Un resultado

de éste proceso puede ser la generación de radicales libres, compuestos que se unan covalentemente a lípidos, ácidos nucleicos o proteínas (60). Diversos estudios de caso (presentados en el marco teórico) apoyan esta hipótesis en el carvedilol (54,55,57), sin embargo la información es más limitada en el caso de tamsulosina.

Siguiendo este razonamiento, se comprobó si el estrés intracelular secundario podría afectar vía reticular. La unión específica de los metabolitos reactivos con macromoléculas como las proteínas se le denomina haptización, que por sí misma no podría desencadenar una enfermedad o respuesta inmunitaria, ya que requiere de cierto grado de “peligro” (leer más de la respuesta inmune asociada en la hipótesis del peligro por Matzinger [1994]) (59). Este tipo de reacción es idiosincrática debido a que sus efectos no están relacionados con su efecto terapéutico ni la dosis, además, induce la insuficiencia hepática a nivel celular principalmente (109). Recordamos del marco teórico que los mecanismos de hepatotoxicidad propuestos hasta este momento no son mutuamente excluyentes, hay evidencia que interrelaciona varios mecanismos que lleva a cabo el organismo de manera simultánea para recuperar el equilibrio. Sin embargo, excluimos la respuesta inmune por la naturaleza del estudio (*in vitro*).

Así pues, los metabolitos secundarios producidos por el sistema CYP P450 que se expresa en la membrana del RE de los hepatocitos pueden unirse a proteínas, desencadenando cambios en su conformación, que eventualmente serán reconocidas por su sistema de calidad y la posible respuesta a proteínas mal conformadas.

Su importancia reside en la relación que tiene con enfermedades como hepatitis, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad del hígado graso (61). La apoptosis de hepatocitos es un evento patógeno común de varias enfermedades hepáticas, lo que se le relaciona con el estrés del ER no resuelto (110). Lamentablemente no se sabe con claridad hasta qué punto los metabolitos reactivos activan la UPR, hay poca evidencia de que ocurra de esta manera (109). Los estudios moleculares se hicieron para dilucidar un poco más acerca de los mecanismos involucrados en la alteración de la homeostasis celular

relacionados con el estrés reticular y sus vías efectoras bajo el efecto de los fármacos antiadrenérgicos.

Para mantener la proteostasis, las células han desarrollado una amplia variedad de chaperonas moleculares y factores de control de la calidad que están funcionalmente vinculados con la síntesis de proteínas (~279 componentes), el proceso de plegamiento y mantenimiento de la conformación (332 componentes) y los mecanismos de degradación de las proteínas vía proteasoma (~855 componentes) o lisosomal (~533 componentes) (67), de los cuales las chaperonas podrían considerarse más importantes en éstos procesos, ya que acompañan a las proteínas en su proceso de plegado por mecanismos dependientes o independientes de adenosín trifosfato (ATP), e impiden su agregación mecánica (66).

Para alterar la proteostasis y comparar los resultados con los tratamientos farmacológicos se utilizó un control positivo de daño con TM como modelo de estrés reticular en células HepG2, basado en las observaciones de Abdullahi y colaboradores (2017), donde afirman que la TM una dosis de 5 µg/ml inducen una fuerte inducción de estrés ER con efectos adversos limitados sobre la viabilidad celular en relación con el control y otras dosis probadas. Incluso mencionan que la TM tiene un efecto más robusto en el cultivo celular respecto a la taspigargina, que es otro fármaco capaz de inducir la UPR inhibiendo la bomba ATPasa de entrada de Ca⁺² el RE (SERCA). Esto concuerda con las observaciones de Zhang *et al.* (2014), sugieren tratamientos con concentraciones de 2.5 - 5 µg/ml para inducir la respuesta a proteínas mal conformadas sin afectar la viabilidad celular. También reportan que la TM induce apoptosis en las células HepG2 de manera tiempo dependiente (evaluado por MTT).

Nuestros datos muestran que la TM 5 µg/ml inducen la UPR de manera robusta, sobrepasando los niveles de ARN mensajero de los biomarcadores. La cinética de expresión génica de manera general concuerda con el modelo establecido por Cenzano (2006), quien reporta en sus estudios de convergencia del estrés oxidativo y el estrés reticular en células de neuroblastoma humano (SK-N-MC) con 2.5 µg/ml de TM.

En primera instancia se analizó la expresión y síntesis de GRP78 de las células tratadas. Hay una correlación establecida entre la expresión de GRP78 y la progresión de distintos tipos de cáncer incluyendo el hepatocelular (64). En nuestros hallazgos se observó una sobreexpresión a nivel de ARN mensajero, sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la síntesis. Hay que resaltar que, además de ser una proteína chaperona del RE que apoya en el proceso de plegamiento de proteínas mal conformadas, es un sensor de estrés reticular (96). Lo que nos lleva a creer que tanto la tamsulosina como el carvedilol no inducen un estrés grave en el RE, o al menos en un grado muy bajo y capaz de ser manejado por la célula dentro de las primeras 24 hrs de interacción: Los marcadores de apoptosis se vieron regulados a la baja y hubo una tendencia generalizada a la supervivencia celular. A continuación, se discutirán los hallazgos más relevantes del estudio y por qué se cree que hay activación de algunas de las vías de señalización de la UPR.

Fuera de los pronósticos se reportó un alza en la expresión del ARN mensajero de la chaperona molecular calreticulina tanto en el modelo de estrés reticular como en los tratamientos de tamsulosina y carvedilol. Recordamos que es un elemento clave del sistema de calidad en la síntesis de proteínas del RE (junto con la calnexina): las glicoproteínas son reconocidas por estas proteínas en el lumen del RE para su correcto proceso de plegado. Las chaperonas moleculares tienen la misma región de consenso CCAATN₃CCACG activada por los factores de transcripción ATF6 y XBP1 que favorecen los ERSE, que incluyen GRP78, Grp94 y calreticulina, que son las chaperonas dependientes de calcio más abundantes del RE (64,71). Sin embargo, la expresión genética de calreticulina es diferente a otros reportes, donde se observan incrementos del ARNm de calreticulina de 5 – 7 veces respecto al control (111). Una posible explicación es que la evaluación se hizo con otro tipo de células (fibroblastos de ratón) y con otros inductores de estrés reticular (A23187/tapsigargina). En los hepatocitos el RE es particularmente abundante, además ocupa regiones en las que se segrega el liso y el rugoso, donde el 76.3 % del total es liso (110,112), por lo que la proteína podría expresarse en niveles muy altos respecto a otros tipos celulares (113).

La calreticulina participa en diversas funciones celulares que no se limitan al plegamiento de las proteínas, sino que incluyen apoptosis, angiogénesis, adhesión celular, exportación nuclear, transcripción y respuestas inmunes (114), por lo que podrían haber mecanismos subyacentes que no se incluyeron en el presente trabajo que dispararon la respuesta celular. Se han identificado diferentes factores de transcripción que se unen a la región promotora de la calreticulina como Nkx2.5, COUP-TF1, GATA6, MEF2C, EVI-1 y PPAR, relacionados con otras vías de señalización. Probablemente el factor más importante es el PPAR, que controla la expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos, ya que se ha demostrado en estudios *in vivo* su relación con la expresión de calreticulina. Se ha propuesto que este factor puede inducir la expresión de calreticulina en situaciones de estrés, sin embargo hace falta más investigación al respecto (113). Para confirmar la veracidad de los hallazgos, y su relación con el estrés reticular, se podrían hacer más estudios moleculares de la calreticulina y otros componentes del control de calidad del RE y de la ERAD.

Nuestros hallazgos a nivel de ARNm muestran que la rama de la UPR coordinada por PERK se activa parcialmente en los tratamientos de carvedilol y tamsulosina. Recordamos que su activación lleva a una caída en la síntesis global de proteínas (cap o eIF2 dependientes) derivado de la fosforilación del eIF2. Sin embargo la atenuación no es absoluta en todos los genes, sino que promueve la traducción de ARNm con una señal regulatoria en la región 5' no codificantes (UTR) como el sitio de entrada ribosomal interno (IRES) (62): Algunos ARNm contienen ORF aguas arriba (uORF), que pueden perjudicar la traducción de la proteína principal, porque los ribosomas que se ensamblan a un codón de inicio previo que, generalmente se disocian del ARNm después de traducir el uORF. En algunos casos, las características dentro de la UTR 5' (IRES) permiten que la subunidad 40S ingrese aguas abajo del casquete 5', cerca del codón de inicio. Por lo que en condiciones en las que la actividad de eIF2B disminuye y, en consecuencia, la cantidad de eIF2 que lleva Met-ARNt es baja, algunos de los codones de inicio subsiguientes aguas arriba, que son inhibidores en condiciones normales, se reconocen poco y se permite que el ribosoma alcance el codón de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

inicio del ORF principal. Así que paradójicamente este mecanismo sirve para mejorar la traducción de ciertas proteínas como ATF4 (115).

Los resultados concuerdan con esta información, ya que ATF4 se sobre expresa en las mismas condiciones que PERK. Es un factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a cAMP (C/EBP) que promueve la transcripción de elementos de respuesta al metabolismo de aminoácidos, reacciones redox, respuesta al estrés y secreción de proteínas (62).

Los estudios de inmunotransferencia de péptidos puromicilados muestran una caída en la síntesis global de proteínas de *novo* en el tratamiento con carvedilol, pero no en el caso de la tamsulosina. Ésta puede explicarse en la activación del sensor transmembranal PERK, sin embargo la caída en la tasa de síntesis proteica puede ser por otras causas (100), ya que la actividad debería reflejarse en las células tratadas con tamsulosina. Los mecanismos más comunes en el control de la traducción es la fosforilación reversible del eIF4e Y eIF2 (116), el primero se asocia con infecciones del tipo virales, que claramente no están asociadas con los mecanismos del carvedilol. En el segundo caso puede ocurrir de varias formas: PERK es una de las cuatro quinasas que pueden fosforilar el mismo residuo de serina en la subunidad alfa del eIF2. PKR que también se asocia al estrés reticular y respuesta antiviral, HRI con estrés oxidativo y cuando la síntesis de globina es mayor a la de hemo, y GCN2 a la privación de aminoácidos (70). La tasa de iniciación en la traducción general en la célula depende de la abundancia del ARNm, número de ribosomas, la disponibilidad del iniciador Met-ARNT y la actividad de los factores de iniciación eucariotas (116). De acuerdo con esta información podríamos mencionar que el tratamiento con carvedilol pudo disminuir el flujo de proteínas de *novo* alterando de manera directa o indirecta uno de estos factores.

Uno de los factores que estimulados por ATF4 es la proteína de detención del crecimiento e inducible por daño del ADN (GADD34), ATF3 y CHOP. GADD34 en conjunto con PPIC desfosforila gradualmente a eIF2 para regresar al flujo normal de síntesis proteica cuando se supera el estrés reticular (117). Es un mecanismo usado por otros factores como CREP

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(expresado de manera constitutiva) y p58IPK, que se estimula por factores de transcripción de la UPR (62,72). La relación que tiene esta vía con la apoptosis es que el factor de transcripción ATF4 induce la transcripción de ATF3 y CHOP, que median la producción de receptores de muerte (DR) tipo 4 y 5. Evidencia en diferentes tipos celulares señalan que la región N-terminal de CHOP puede unirse a JUN fosforilado para estimular al DR y desencadenar la cascada de señales de la apoptosis exógena (118). Sin embargo, la expresión de CHOP estuvo regulada a la baja en todos los casos de tratamiento con los bloqueadores adrenérgicos (discutido más adelante).

Otra de las funciones de PERK es activar el factor de transcripción Nrf-2 por un mecanismo no canónico que implica su fosforilación y no la oxidación como comúnmente ocurre, de esta manera puede desacoplarse de Keap1 en citoplasma e importarse al núcleo (64). Este factor de transcripción se une a la región promotora ARE y promueve la supervivencia celular incrementando la autofagia, activando mecanismos antioxidantes, destoxicantes (119) e incluso componentes de la ERAD (120). Por lo que la respuesta celular mediada por PERK en esta vía está asociada fuertemente a la supervivencia celular. Para dar sustento a esta información podría evaluarse la relación de PERK y eIF2 en su forma nativa y fosforilada.

La cinética de la expresión génica mostró que tanto la tamsulosina como el carvedilol redujeron la expresión del ARNm del ATF6 desde las primeras horas de interacción. Esta proteína de 90 kDa se expresa de manera constitutiva en el RE, sin embargo su forma escindida de 50 kDa es la que funciona como factor de transcripción en el núcleo (71). Gao *et al.* (2017) estudió los efectos del carvedilol en hepatocitos de ratones con cirrosis biliar, quien reportó que los grupos tratados también regularon a la baja los niveles de síntesis de ATF6 (36). La sobreexpresión de ATF6 estudiada en una línea celular de hepatocarcinoma (HLF), puede conducir a la proliferación celular mediante la regulación directa e indirecta de una amplia gama de genes asociados con la transformación (74). En los estudios de Walter *et al.* (2018), se observaron aumentos transitorios en los niveles de IRE1 α a nivel de ARN y de proteína en respuesta al estrés del RE en células de neuroblastoma SH-SY5Y, lo

interesante es que se incrementó aún más en las células que carecen de expresión de ATF6 y viceversa, la sobreexpresión del dominio N-terminal transcripcionalmente activo de ATF6 disminuye los niveles de IRE1 α (121). Lo que sugiere una regulación cruzada entre la rama de IRE1 α y de ATF6 de la UPR.

La rama de la UPR mediada por IRE1 α se vio activada parcialmente a nivel de ARNm en el caso de ambos adrenobloqueadores. Esto podría explicarse por la baja regulación de la rama ATF6, que incrementa la activación y actividad endoribonucleasa de IRE1 α en los experimentos de Walter *et al.* (2018), donde se silenció el ARN mensajero de ATF6 (121). Sin embargo, hay estudios que contradicen ésta suposición en el caso del carvedilol: Haas *et al.* (2016) indujo estrés reticular con altas concentraciones de dextrosa (122) en células endoteliales de la arteria coronaria humana HCAEC, y posteriormente las trató con beta bloqueadores (carvedilol, propranolol y atenolol). Concluye que éstos pueden suprimir la UPR celular, ya que hubo una baja en la expresión de GRP78, fosforilación de eIF2, JNK y empalme de XBP1. Cabe mencionar que estos efectos se observaron hasta concentraciones de 10 μ M (123), siendo que en nuestros estudios trabajamos con concentraciones inferiores. Los estudios de Gao *et al.* (2017) también sugieren que el carvedilol tiene un efecto regulador de la expresión de esta rama de la UPR. Para confirmar nuestros resultados podría analizar la expresión de IRE1 α normal y fosforilado, así como la presencia del ARN mensajero de XBP1 escindido.

Hasta este momento solo se ha apoyado la hipótesis de la UPR desencadenada por los adrenobloqueadores por picos en la expresión génica de biomarcadores involucradas en la transducción de señales. Sin embargo, se estudió también los efectos de la tamsulosina y del carvedilol sobre las vías efectoras que tienen relación con la UPR.

Los elementos con los que cuenta la célula generalmente son suficientes para abastecer las necesidades del flujo de proteínas recién sintetizadas. Cuando su conformación no es adecuada y es identificada por su sistema de control de calidad, pueden degradarse por la vía ERAD o replegarse. Ante factores de estrés, se activan vías que procesan los polipéptidos

mal conformados que pueden llegar a formar agregados (agregasomas). Un subconjunto de especies mal plegadas puede formar fibras amiloides que pueden interferir aún más con los procesos celulares (67,68). En estos casos se activan otras vías de señalización como la autofagia. Hay evidencia que sugiere la autofagia tiene una función de supervivencia subsecuente al estrés en el RE, pero también puede desencadenar la apoptosis, ya que comparten algunas señales aguas arriba (124).

Recapitulando un poco, se sabe que la autofagia es un proceso celular que involucra la degradación de proteínas mal plegadas, agregasomas u organelos con enzimas lisosomales. Generalmente se clasifica en función del material que se va a degradar, sin embargo, la que se va a referir en este caso es la macroautofagia. Ésta se logra aislando el material en cuestión con una doble membrana denominada autofagosoma, cuya formación consta de varias etapas en las que participa una serie de factores y proteínas asociadas. Desde los resultados anteriores podemos esperar que no hay activación de autofagia ni apoptosis derivada del estrés reticular, ya que se activan tras una señal de estrés crónica o irresoluble. Para asegurar que los tratamientos con carvedilol y tamsulosina se incluyeron algunos biomarcadores de macroautofagia y apoptosis en este estudio.

Una vía de activación depende de IRE1 α , cuando activa la vía de la quinasa JNK, recluta a la TRAF2, que a su vez recluta a la quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis (ASK1) que es un miembro de las MAP quinasas (MAPKKK) que da como resultado la fosforilación de Bcl-2, proteínas de dominio BH3, la desrepresión de Beclin-1 y la activación de PI3K (125,126), que también puede inducir apoptosis como se verá más adelante. Sin embargo, nuestros hallazgos no muestran una expresión importante de Beclin-1, además la tasa de expresión de Bcl-2/Bax no disminuyó en los tratamientos con los adrenobloqueadores por lo que podemos sugerir que ésta vía no se activa.

Por otro lado XBP1, ATF6 y ATF4 regulan al alza la transcripción de proteínas relacionadas con la autofagia (ATG), particularmente de ATG3, ATG12, ATG5 y MAP1LC3 (125). Recordamos que la autofagia está controlada por un conjunto de proteínas conservadas

evolutivamente denominadas ATGs. Por otro lado, LC3 es un componente muy importante que tiene una participación en la macroautofagia: LC3-I se expresa de manera constitutiva, tras la asociación con fosfatidiletanolamina se genera LC3-II a través de dos reacciones consecutivas de tipo ubiquitinación catalizadas por ATG 3 y 7. LC3-II es reclutado por la membrana del autofagosoma. Por lo que el análisis a nivel transcripcional y la razón de LC3-II/LC3-I a nivel de proteína son buenos indicadores de macroautofagia (99,127).

Nuestras observaciones muestran que ATG5 si se reguló al alta en las mismas condiciones de los tratamientos con carvedilol y tamsulosina, sin embargo, solo podría incluirse la participación de ATF4 y de XBP1. Además, LC3 a nivel transcripcional se vio regulada a la baja. La tasa de síntesis de las proteínas LC3-II/LC3-I muestran que no hay formación de autofagosomas.

Como se mencionó en el marco teórico, el carvedilol puede inducir autofagia y apoptosis en células LX-2. En los estudios de Meng y colaboradores (2018), el tratamiento con carvedilol incrementa de manera dosis y tiempo dependiente la cantidad de LC3B-II, también reporta niveles más altos de ATG5 y Beclin-1 a nivel de proteína. Por otro lado disminuye los niveles de Bcl-2/Bax y se reportan incrementos en los niveles de caspasa 3 y 8 activas (40). Cabe resaltar que estos efectos se observaron con tratamientos de 10 μ M de carvedilol por lo que no se puede extrapolar a nuestro estudio. Recordamos que la familia Bcl2 se divide en anti apoptóticas (Bcl2, Bcl-XL, MCL-1 y Bcl-W) y proapoptóticas que a su vez se dividen en proteínas de multidominio (Bax, Bak, Bok) y de dominio BH3 (Bid, Bim, Bad, Bik, Noxa y Puma) (118). En células PC-3 y LNCap tratadas con 30 μ M de tamsulosina por 24 hrs, no mostraron cambios significativos en la formación de vesículas autofágicas (103).

Generalmente la autofagia bloquea la apoptosis mediante la inactivación de las caspasas, y la activación de las caspasas a su vez pueden interrumpir la autofagia escindiendo proteínas importantes del proceso (124) Son dos vías estrechamente relacionadas cuyos mecanismos y regulación siguen en estudio. En nuestro caso se analizaron también la expresión de ciertos marcadores de muerte celular programada o apoptosis, se clasifica en función de su

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mecanismo de activación en endógena y exógena. Es muy importante para mantener la homeostasis tisular, sin embargo, la desregulación de estas señales puede ser muy perjudiciales para las células.

La respuesta a proteínas mal conformadas derivada de un estrés es un mecanismo de supervivencia que cuenta con la activación secuencial de PERK, ATF6 e IRE respectivamente (72). Cuando el estrés es irresoluble o crónico se activan vías de señalización de muerte celular orquestadas principalmente por IRE1 α y CHOP. A pesar de que CHOP es up-regulado por las proteínas efectoras de las tres ramas de la UPR, no hay reportes que han relacionado la apoptosis por la activación de ATF6 (62), por lo que podemos considerar que no es hasta la activación de IRE1 α que la supervivencia celular puede verse comprometida.

La apoptosis mediada por el RE puede ser inducida por principalmente vía IRE1 α /ASK1/JNK, caspasa 12 y por CHOP/GADD153 que están interrelacionadas y se activan cuando el estrés en el RE es irresoluble (118). El eje IRE1 α /ASK1/JNK tiene algunos punto en común con la autofagia, su ruta de señalización incluye JNK, MAPKs y p38, sin embargo no está muy claro en qué momento se da esta interacción (62,128). p38 MAPK fosforila la serina 78 y 81 de CHOP, además puede promover la fosforilación y activación de BAX, incrementando la señal apoptótica. La vía CHOP-CaMKII (explicada a detalle a continuación) también activa JNK y sus vías efectoras.

En la fase crónica de estrés reticular, IRE1 α también puede desplegar la desintegración de ARNm dependiente de IRE1 α regulada (RIDD) donde el dominio endoribonucleasa corta el material genético sin que puedan ligarse nuevamente. Nuestros hallazgos muestran que los adreabloqueadores pueden inducir una ligera sobreexpresión del ARNm del eje IRE1 α /XBP1, sin embargo, no llega a ser equiparable al modelo de estrés inducido por la TM.

Probablemente el mecanismo más complejo e importante es el inducido por CHOP quien cuenta con un dominio dZIP que le confiere su actividad en la regulación génica de proteínas de la familia BCL2, GADD34, TRB-3 y DOCs. Además su sobreexpresión puede liderar un

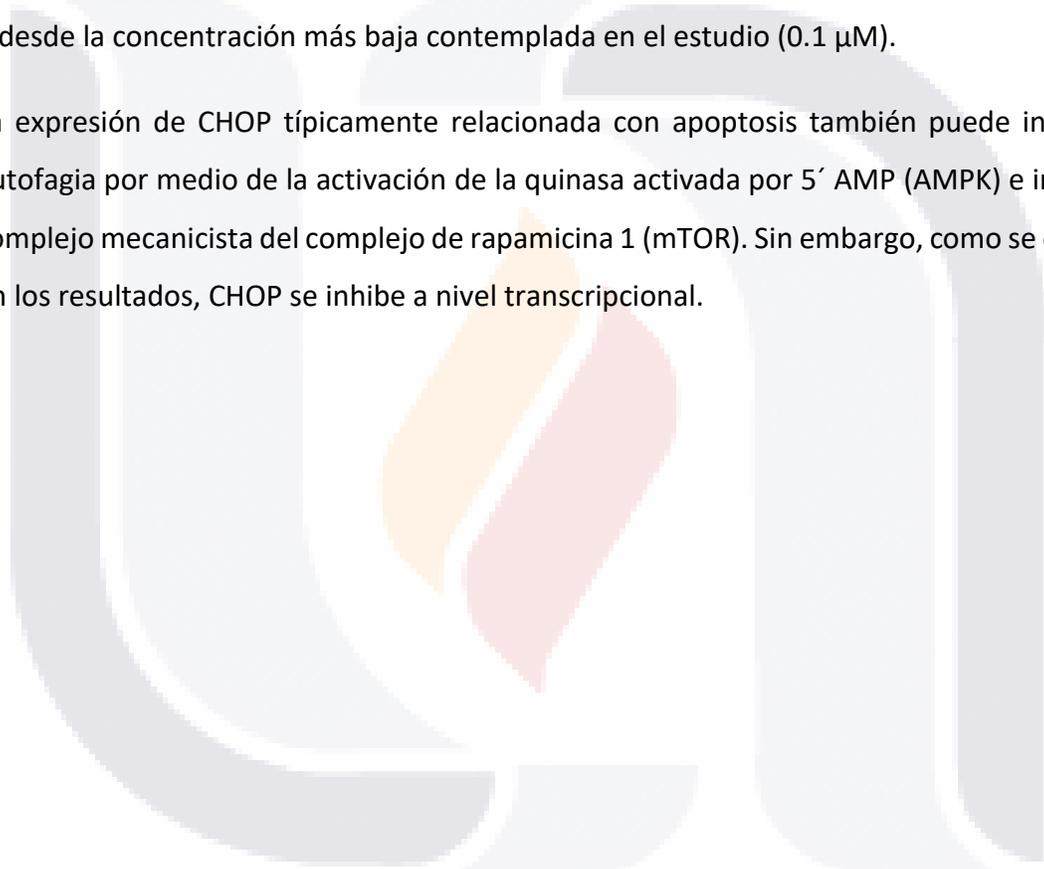
arresto (supresión) del ciclo celular (118). CHOP forma heterodímeros con otros factores de transcripción de la familia C/EBP para inhibir la expresión de sus genes de respuesta e incrementa la expresión de otros genes con una región específica de 12-14 pb. Regula a la baja la expresión de p21, Bcl2, Bcl-XL y MCL-1, y regula a la alta BIM que en consecuencia incrementa BAK y BAX. Tras la oligomerización de éstos últimos, se modifica la permeabilidad de la membrana mitocondrial y reticular. En la mitocondria estimula la liberación de CYP C, factor inducible de apoptosis (AIF), en el RE se libera calcio al citosol y otras señales de muerte celular.

El eje IRE1 α /ASK1/JNK también participa en esta rama fosforilando Bcl2 y proteínas de dominio BH3 (como Bim que se encuentra unida al complejo de dineína) que incrementa considerablemente la señal pro apoptótica. A pesar de la activación parcial de la rama IRE1 α /XBP1 y PERK/ATF4, los niveles de ARN mensajero permaneció inalterado en las células HepG2 en los tratamientos de carvedilol y tamsulosina. CHOP también se superpone en la región promotora del factor TRB3 quien puede inhibir la fosforilación de la Ser473 y Thr308 de AKT. AKT modula directamente la expresión de BAD, BAX y de las caspasas 3 y 9 (118). De acuerdo con nuestros resultados, no hubo una sobreexpresión de Bax (respecto a Bcl2) ni de la caspasa 3, lo que concuerda con los niveles normales de ARN de CHOP, lo que nos lleva a creer que AKT fue capaz de realizar su función moduladora con la caspasa 3 y BAX. Estudios realizados en células PC-3 y LNCap tratadas con 30 μ M de tamsulosina concuerdan con nuestros resultados, donde las proteínas que regulan la apoptosis mediada por mitocondrias (CYP C, Bcl-2 y caspasa 3) permanecieron sin cambios después de 24 hrs de tratamiento (103).

Otro de los mecanismos por el que CHOP puede inducir apoptosis y converge con estrés oxidativo es la estimulación de la reductasa del RE (ERO1 α) que cataliza la oxidación de PDI e incrementa la concentración de peróxido de hidrógeno y la subsecuente producción de ROS. Las altas concentraciones de ROS en el lumen del RE activan el canal de calcio IP3R1, que en consecuencia activa la kinasa sensible al calcio CaMKII en el citosol y NOX2 (subunidad de NADPH oxidasa) generando más ROS. Medina-Pizaño (2020) reporta que tras

24 hrs de tratamiento las células HepG2 con tamsulosina incrementan los niveles de ARNm de Nrf-2 de manera dosis dependiente, y los niveles de Bcl-2 se mantienen estables hasta concentraciones menores a 0.5 μM . Por otro lado, los niveles de hemoxigenasa-1 se regulan a la baja con 0.1 μM de tamsulosina e incrementan significativamente a concentraciones mayores, lo que puede indicarnos una respuesta a supervivencia al posible estrés que genera la tamsulosina a mayores concentraciones. El carvedilol presenta un comportamiento muy parecido, sin embargo, tiene niveles altos de hemoxigenasa-1 y Bcl-2 desde la concentración más baja contemplada en el estudio (0.1 μM).

La expresión de CHOP típicamente relacionada con apoptosis también puede inducir la autofagia por medio de la activación de la quinasa activada por 5' AMP (AMPK) e inhibir el complejo mecanicista del complejo de rapamicina 1 (mTOR). Sin embargo, como se observó en los resultados, CHOP se inhibe a nivel transcripcional.



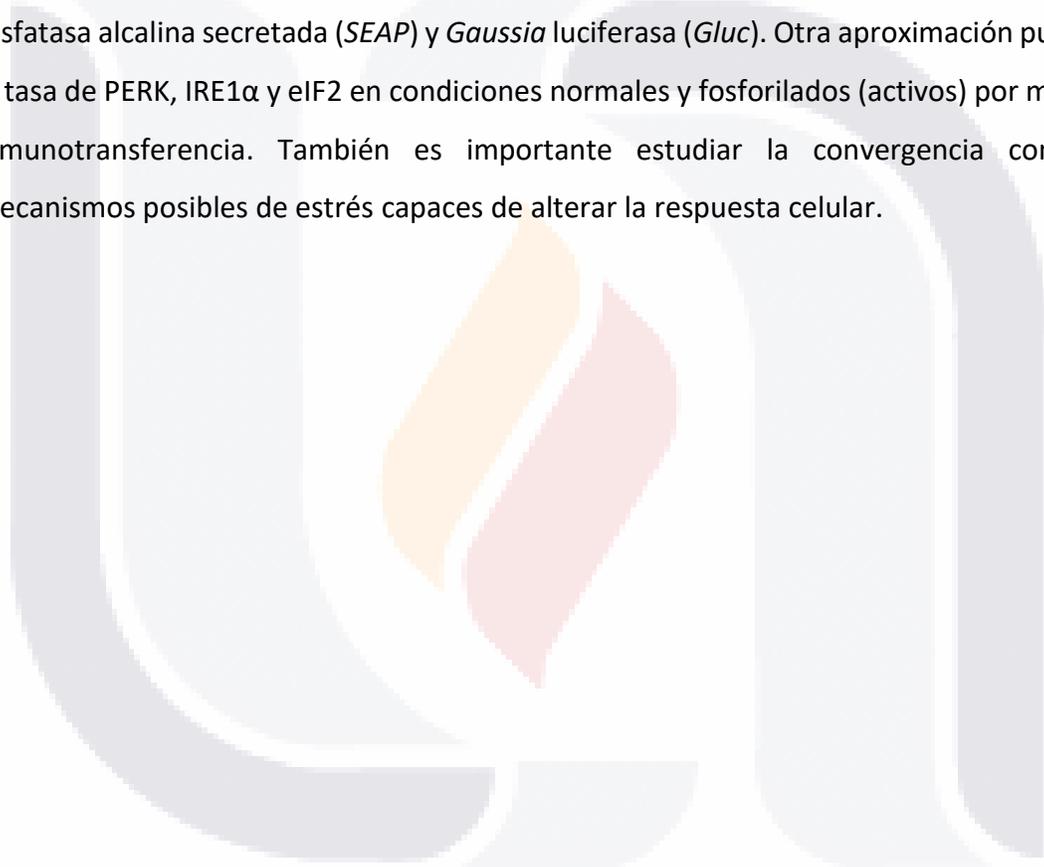
11. Conclusiones

El trabajo experimental realizado en la presente tesis nos ha permitido concluir en los siguientes puntos.

1. Tanto el carvedilol como la tamsulosina disminuyen la actividad metabólica de las células HepG2 a sus concentraciones séricas de manera tiempo dependiente, además muestran una tendencia proliferativa a mayores concentraciones.
2. Podemos reafirmar la utilidad de la TM como inductor del estrés reticular en células HepG2, quien puede activar las tres ramas de la UPR a nivel transcripcional dentro de las primeras 24 hrs de interacción.
3. A Las 12 horas se puede detectar una señal robusta en el modelo de estrés reticular, y los tratamientos farmacológicos estimulan parcialmente dos ramas de la UPR: incrementan la transcripción de la rama IRE1 α -XBP1 y PERK-ATF4, mientras que ATF6 se regula a la baja. Donde el carvedilol indujo una caída en el flujo de síntesis de proteínas totales, que puede estar asociada a la activación de la rama PERK de la UPR.
4. Los tratamientos con carvedilol y tamsulosina a concentraciones séricas no estimularon las vías de señalización relacionadas con autofagia, por el contrario, reprimieron la expresión génica de Beclin-1 y LC3.
5. Los tratamientos con carvedilol y tamsulosina a concentraciones séricas tampoco estimularon la apoptosis dentro de las primeras 24 hrs de tratamiento. La expresión génica de CHOP se mantuvo inalterada, la caspasa 3 se reprimió y predominó Bcl2 sobre Bax.

Finalmente podemos concluir que los tratamientos de carvedilol y tamsulosina a concentraciones séricas sobre las células HepG2 estimulan la activación parcial de la UPR a nivel transcripcional, quien responde al posible estrés generado por los medicamentos. Dicha respuesta presumiblemente se activa como mecanismo de supervivencia. Los

estudios realizados con proteínas puromiciladas denotan un mecanismo subyacente de las células HepG2 estimuladas con carvedilol que debe ser estudiado a profundidad. Así pues, de acuerdo con los antecedentes del proyecto y nuestros hallazgos, se apoya la propuesta del uso de los adrenobloqueadores para revertir la fibrosis hepática, ya que demostraron no tener efectos citotóxicos relevantes a las concentraciones que se utilizan en los pacientes de manera rutinaria. Las aseveraciones y resultados del presente estudio pueden confirmarse en investigaciones futuras monitoreando el estrés reticular por medio de la fosfatasa alcalina secretada (*SEAP*) y *Gaussia* luciferasa (*Gluc*). Otra aproximación puede ser la tasa de PERK, IRE1 α y eIF2 en condiciones normales y fosforilados (activos) por medio de inmunotransferencia. También es importante estudiar la convergencia con otros mecanismos posibles de estrés capaces de alterar la respuesta celular.



Capítulo VI

12. Referencias

1. Ford APDW, Daniels D V., Chang DJ, Gever JR, Jasper JR, Lesnick JD, et al. Pharmacological pleiotropism of the human recombinant $\alpha(1A)$ -adrenoceptor: Implications for $\alpha1$ -adrenoceptor classification. Vol. 121, British Journal of Pharmacology. 1997. p. 1127–35.
2. Homma N, Hirasawa A, Shibata K, Hashimito K, Tsujimoto G. Both $\alpha(1A)$ - and $\alpha(1B)$ -adrenergic receptor subtypes couple to the transient outward current ($I(To)$) in rat ventricular myocytes. Vol. 129, British Journal of Pharmacology. 2000. p. 1113–20.
3. Williams TJ, Blue DR, Daniels D V., Davis B, Elworthy T, Gever JR, et al. In vitro $\alpha1$ -adrenoceptor pharmacology of Ro 70-0004 and RS-100329, novel $\alpha(1A)$ -adrenoceptor selective antagonists. Br J Pharmacol. 1999;127(1):252–8.
4. Dunn CJ, Matheson A, Faulds DM. Tamsulosin: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the management of lower urinary tract symptoms. Drugs and Aging. 2002;19(2):135–61.
5. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. Nucleic Acids Res. 2006;34(Database issue):668–72.
6. Instituto Mexicano del Seguro Social. Diagnóstico y tratamiento de los síntomas del tracto urinario inferior no neurogénicos asociados a crecimiento prostático [Internet]. Guía de Evidencias y Recomendaciones: Guía de Práctica Clínica. 2018. p. 1–41. Available from: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/007_GPC_CirculacionArtPerif/IMSS_007_08_EyR.pdf

7. Jü. File:Procaine Structural Formulae.png [Internet]. Wikipedia. 2008 [cited 2020 Aug 27]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Procaine_Structural_Formulae.png
8. Preciado-Estrella DA, Kaplan SA, Iturriaga-Goyón E, Ramón-Trejo E, Mayorga-Gómez E, Auza-Benavides A. International Prostate Symptom Score and Gea Visual Analogue Scale® comparison for evaluating lower urinary tract symptoms. *Rev Mex Urol.* 2017;77(5):372–82.
9. Mctavish D, Campoli-richards D, Sorkin EM. Carvedilol Therapeutic Efficacy. *Drugs.* 1993;45(2):232–58.
10. Keating GM, Jarvis B. Carvedilol: A review of its use in chronic heart failure. *Drugs.* 2003;63(16):1697–741.
11. Harbin. File:Carvedilol.svg [Internet]. Wikipedia. 2009 [cited 2020 Aug 27]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carvedilol.svg>
12. Lysko P, Webb C, Gu J, Ohlstein E, Ruffolo RJ, Yue T. A comparison of carvedilol and metoprolol antioxidant activities in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36(2):277–81.
13. Yue T, Mckenna P, Gu J, Cheng H, Ruffolo RJ, Feuerstein G. Carvedilol, a new antihypertensive agent, prevents lipid peroxidation and oxidative injury to endothelial cells. *Hypertension.* 1993;22(6):922–8.
14. Yue T, Cheng H, Lysko P, McKenna P, Feuerstein R, Gu J, et al. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263(1):92–8.
15. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2009;459(7245):356–63.
16. Guzmán-Silva. Receptores acoplados a proteínas G y sus múltiples facetas. *Mens*

Bioquim. 2018;42:118–29.

17. Hieble JP. Adrenergic receptors. In: Squire LR, editor. Encyclopedia of Neuroscience. Wayne, PA, USA: Academic Press; 2009. p. 135–9.
18. Sorota S. The Sympathetic Nervous System as a Target for the Treatment of Hypertension and Cardiometabolic Diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63(5):466–76.
19. Taira CA, Carranza A del V, Bertera FM, Höcht C. Catecolaminas síntesis metabolismo: receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. In: Hipertensión arterial: Epidemiología, fisiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica. Buenos Aires: Inter-Médica; 2013. p. 94–8.
20. Alcántara-Hernández R, Hernández-Méndez A. Complejos moleculares de la señalización adrenérgica *Gaceta Médica de México.* *Gac Med Mex.* 2018;154:223–35.
21. Melin Coloma VA, Freer Calderón J, Contreras Pérez D. Determinación de la capacidad de las catecolaminas para amplificar la reacción de Fenton. Universidad de Concepción; 2014.
22. Abel PW, Piascik MT. Introduction to Autonomic Nervous System Drugs. In: Dowd FJ, Johnson BS, Mariotti AJ, editors. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry.* 7th ed. St. Louis, MO: Mosby; 2017. p. 71–81.
23. Delgado-Coello B, Sosa-Garrocho M, Alcantara R. Avances en el estudio experimental de la Bioquímica Hepática. 1th ed. Bojalil B, editor. CDMX: UNAM; 2017. 189 p.
24. Oben JA, Diehl AM. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *Anat Rec - Part A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;280(1):874–83.
25. Domínguez M, Colmenero J, Bataller R. Treatment of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2009;32(9):627–32.

26. Lee Y, Friedman SL. Fibrosis in the liver: Acute protection and chronic disease. In: Kaestner KH, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 1th ed. NY, USA: Elsevier Inc.; 2010. p. 151–200.
27. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(23):7312–24.
28. Vernon H, Kasi A. *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Liver* [Internet]. StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2019 [cited 2020 Sep 8]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763190>
29. Qiu GH, Xie X, Xu F, Shi X, Wang Y, Deng L. Distinctive pharmacological differences between liver cancer cell lines HepG2 and Hep3B. *Cytotechnology*. 2014;67(1):1–12.
30. López-Terrada D, Cheung SW, Finegold MJ, Knowles BB. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1512–5.
31. Liu TT, Ding TL, Ma Y, Wei W. Selective α 1B - and α 1D -adrenoceptor antagonists suppress noradrenaline-induced activation, proliferation and ECM secretion of rat hepatic stellate cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2014;35(11):1385–92.
32. Sigala B, McKee C, Soeda J, Paziienza V, Morgan M, Lin CI, et al. Sympathetic Nervous System Catecholamines and Neuropeptide Y Neurotransmitters Are Upregulated in Human NAFLD and Modulate the Fibrogenic Function of Hepatic Stellate Cells. *PLoS One*. 2013;8(9):1–13.
33. Dubuisson L, Desmoulière A, Decourt B, Evadé L, Bedin C, Boussarie L, et al. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology*. 2002;35(2):325–31.
34. Gutiérrez Ruiz M., Bucio Ortiz L, Souza Arroyo V, U MLR, Pérez Aguilar B, Gómez quiroz LE. Mecanismo Celular y Molecular de la Fibrosis Hepática. In: Uscanga L, editor. *70 Años De Gastroenterología En El Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y*

Nutrición Salvador Zubirán. CDMX: Permanyer; 2016. p. 4–10.

35. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247–50.
36. Gao P, Yang B, Yu HY, Meng RR, Si JY. Carvedilol alleviates the biliary cirrhosis through inhibiting the endoplasmic reticulum stress. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(24):5813–20.
37. De Araújo RF, Garcia VB, De Carvalho Leitão RF, De Castro Brito GA, De Castro Miguel E, Guedes PMM, et al. Carvedilol improves inflammatory response, oxidative stress and fibrosis in the alcohol-induced liver injury in rats by regulating kuppfer cells and hepatic stellate cells. *PLoS One.* 2016;11(2):1–23.
38. Serna-Salas SA, Navarro-González YD, Martínez-Hernández SL, Barba-Gallardo LF, Sánchez-Alemán E, Aldaba-Muruato LR, et al. Doxazosin and Carvedilol Treatment Improves Hepatic Regeneration in a Hamster Model of Cirrhosis. *Biomed Res Int.* 2018;1–11.
39. Macías-Pérez JR, Vázquez-López BJ, Muñoz-Ortega MH, Aldaba-Muruato LR, Martínez-Hernández SL, Sánchez-Alemán E, et al. Curcumin and α/β -Adrenergic antagonists cotreatment reverse liver cirrhosis in hamsters: Participation of Nrf-2 and NF- κ B. *J Immunol Res.* 2019;1–12.
40. Meng D, Li Z, Wang G, Ling L, Wu Y, Zhang C. Carvedilol attenuates liver fibrosis by suppressing autophagy and promoting apoptosis in hepatic stellate cells. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:1617–27.
41. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14(7):397–411.
42. Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, Domínguez M, Moreno M, Forns X, et al. Effects of losartan on hepatic expression of nonphagocytic NADPH oxidase and

- fibrogenic genes in patients with chronic hepatitis C. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297(4):G726–34.
43. Boehringer Ingelheim. Secotex® OCAS [Internet]. Meppel, Holanda; Available from: https://www.boehringer-ingenheim.mx/sites/mx/files/ipp/mx/new/ipp-a_secotex_ocas_tab_9004-04-05_version_limpiar.pdf
 44. NIH. Tamsulosin [Internet]. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury. Bethesda, MD; 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
 45. Randle LE, Sathish JG, Kitteringham NR, Macdonald I, Williams DP, Park BK. α 1-Adrenoceptor antagonists prevent paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *Br J Pharmacol.* 2008;153(4):820–30.
 46. Batty M, Pugh R, Rathinam I, Simmonds J, Walker E, Forbes A, et al. The role of α 1-adrenoceptor antagonists in the treatment of prostate and other cancers. *Int J Mol Sci.* 2016;17(8):1–25.
 47. AEMPS. Ficha Técnica Aristogen [Internet]. 2010. Available from: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/74788/74788_ft.pdf
 48. PLM. DILATREND [Internet]. [cited 2020 Jun 11]. Available from: https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/dilatrend_tabletas/154/101/7284/210
 49. Ginés P, Quintero E, Arroyo V, Terés J, Bruguera M, Rimola A, et al. Compensated cirrhosis: Natural history and prognostic factors. *Hepatology.* 1987;7(1):122–8.
 50. Pose E, Cardenas A. Translating Our Current Understanding of Ascites Management into New Therapies for Patients with Cirrhosis and Fluid Retention. *Dig Dis.* 2017;35(4):402–10.
 51. NIH. Beta adrenergic blocking agents [Internet]. LiverTox: Clinical and Research

Information on Drug Induced Liver Injury. Bethesda, MD; 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>

52. Kockerling D, Rooshi Nathwani, Forlano R, Manousou P, Mullish BH, Dhar A, et al. Current and future pharmacological therapies for managing cirrhosis and its complications. *World J Gastroenterol*. 2019;25(8):888–908.
53. Njei B, McCarty TR, Garcia-Tsao G. Beta-blockers in patients with cirrhosis and ascites: type of beta-blocker matters. *Gut*. 2016;6(8):1968–76.
54. NIH. Carvedilol [Internet]. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug Induced Liver Injury. Bethesda, MD; 2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
55. Hagemeyer KO, Stein J. Hepatotoxicity associated with carvedilol. *Ann Pharmacother*. 2001;35(11):1364–6.
56. McKee C, Soeda J, Asilmaz E, Sigalla B, Morgan M, Sinelli N, et al. Propranolol, a β -adrenoceptor antagonist, worsens liver injury in a model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437(4):597–602.
57. Rua J, Prata AR, Marques R, Silva R, Gomes B, Fraga J, et al. Carvedilol-Induced Liver Injury, a Rare Cause of Mixed Hepatitis: A Clinical Case. *GE Port J Gastroenterol*. 2019;26(3):196–201.
58. Rodríguez González JC, Rodeiro Guerra I. El sistema citocromo p450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev Cuba Farm*. 2014;48(3):495–507.
59. Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of Drug-Induced Liver Disease. *Clin Liver Dis*. 2007;11(3):459–75.
60. Tejada F. Hepatotoxicidad por farmacos. *Rev Clínica Med Fam*. 2010;3(3):177–91.
61. Chen S, Melchior, W. B. J, Guo L. Endoplasmic Reticulum Stress in Drug- and

- Environmental Toxicant-Induced Liver Toxicity. *J Env Sci Heal C Env Carcinog Ecotoxicol.* 2014;32(1):83–104.
62. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7(9):880–5.
 63. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79–94.
 64. Bravo R, Parra V, Gatica D, Rodriguez AE, Torrealba N, Paredes F, et al. Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response: Dynamics and Metabolic Integration. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;301(c):210–90.
 65. Kulak NA, Geyer PE, Mann M. Loss-less nano-fractionator for high sensitivity, high coverage proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2017;16(4):694–705.
 66. Hipp MS, Kasturi P, Hartl FU. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(7):421–35.
 67. Klaips CL, Jayaraj GG, Hartl FU. Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *J Cell Biol.* 2018;217(1):51–63.
 68. Kim YE, Hipp MS, Bracher A, Hayer-Hartl M, Ulrich Hartl F. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. Vol. 82, *Annual Review of Biochemistry.* 2013. 323–355 p.
 69. Redondo Juárez P. Fallos en el control de calidad en la síntesis de proteínas: origen de enfermedades raras. Universidad de Salamanca; 2017.
 70. Cenzano M del CV. Convergencia de estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo como modelo celular de neurodegeneración. Universidad Autónoma de Madrid; 2006.
 71. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting

endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose- regulated proteins: Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem.* 1998;273(50):33741–9.

72. Wakabayashi S, Yoshida H. The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Comput Struct Biotechnol J.* 2013;6(7):e201303010.
73. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Dev Cell.* 2002;3:99–111.
74. Hillary RF, Fitzgerald U. A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):1–10.
75. Glimcher LH, Lee AH, Iwakoshi NN. XBP-1 and the unfolded protein response (UPR). *Nat Immunol.* 2020;21(9):963–5.
76. Hussein LHA, Khalil AM, Alghadi AY, Alhaija AAA. Exon1 and -116 C/G promoter polymorphism on the X-box DNA binding protein- 1 gene is not associated with breast cancer among Jordanian women. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2019;20(9):2739–43.
77. Masaki T, Noguchi H, Kobayashi M, Yoshida M, Takamatsu K. Isolation and characterization of the gene encoding mouse tax-responsive element-binding protein (TREB) 5. *DNA Res.* 2000;7(3):187–93.
78. Abdullah A, Ravanan P. The unknown face of IRE1 α – Beyond ER stress. *Eur J Cell Biol.* 2018;97(5):359–68.
79. Tashiro E. Screening and identification of inhibitors of endoplasmic reticulum stress-induced activation of the IRE1 α -XBP1 branch. *J Antibiot (Tokyo).* 2019;72(12):899–905.
80. Nekrutenko A, He J. Functionality of unspliced XBP1 is required to explain evolution

of overlapping reading frames. *Trends Genet.* 2006;22(12):645–8.

81. Yücel SS, Stelzer W, Lorenzoni A, Wozny M, Langosch D, Lemberg MK. The Metastable XBP1u Transmembrane Domain Defines Determinants for Intramembrane Proteolysis by Signal Peptide Peptidase. *Cell Rep.* 2019;26(11):3087-3099.e11.
82. Shanmuganathan V, Schiller N, Magoulopoulou A, Cheng J, Braunger K, Cymer F, et al. Structural and mutational analysis of the ribosome-arresting human XBP1u. *Elife.* 2019;8:1–22.
83. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol.* 2006;172(4):565–75.
84. Ponath PD, Fass D, Liou HC, Glimcher LH, Strominger JL. The regulatory gene, hXBP-1, and its target, HLA-DRA, utilize both common and distinct regulatory elements and protein complexes. *J Biol Chem.* 1993;268(23):17074–82.
85. Sun H, Wei G, Liu H, Xiao D, Huang J, Lu J, et al. Inhibition of XBP1s ubiquitination enhances its protein stability and improves glucose homeostasis. *Metabolism.* 2020;105:154046.
86. Abdullahi A, Stanojcic M, Parousis A, Patsouris D, Jeschke MG. Modeling ER Stress In Vitro and In Vivo. *Shock.* 2017;47(4):506–13.
87. Franco DP, de Biazi BI, Zanetti TA, Marques LA, de Lima LVA, Lepri SR, et al. Apoptotic and cell cycle response to homoharringtonine and harringtonine in wild and mutant p53 hepatocarcinoma cells. *Hum Exp Toxicol.* 2020;39(10):1405–16.
88. Ravi V, Jain A, Mishra S, Sundaresan NR. Measuring Protein Synthesis in Cultured Cells and Mouse Tissues Using the Non-radioactive SUnSET Assay. *Curr Protoc Mol Biol.* 2020;133(1):1–23.
89. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to

- proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63.
90. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):36–42.
 91. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365–86.
 92. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012;13(134):11.
 93. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676–82.
 94. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem*. 2019 Feb 8;294(6):2098–108.
 95. Hwang J, Qi L. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. Vol. 43, *Trends in Biochemical Sciences*. Elsevier Ltd; 2018. p. 593–605.
 96. Kopp MC, Larburu N, Durairaj V, Adams CJ, Ali MMU. UPR proteins IRE1 and PERK switch BiP from chaperone to ER stress sensor. *Nat Struct Mol Biol*. 2019 Nov 1;26(11):1053–62.
 97. Barroso Pecero L. Estudio de las vías IRE1 y PERK en la activación de la autofagia inducida por LPS. Universidad de Sevilla; 2017.
 98. Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*. 2015;40(3):141–8.

99. Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 2007;14(9):1576–82.
100. Aviner R. The science of puromycin: From studies of ribosome function to applications in biotechnology. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;18:1074–83.
101. Fan A, Sharp PP. Inhibitors of Eukaryotic Translational Machinery as Therapeutic Agents. *J Med Chem.* 2021;64(5):2436–65.
102. Medina Pizaño MY, Ventura Juárez J, Quintanar Stephano JL, Muñoz Ortega MH. Efecto protector de la curcumina en línea celular HepG2 ante la posible citotoxicidad de doxazosina, carvedilol y tamsulosina, estudio in vitro. *Universidad Autónoma de Aguascalientes;* 2020.
103. Forbes A, Anoopkumar-Dukie S, Chess-Williams R, McDermott C. Relative cytotoxic potencies and cell death mechanisms of α 1-adrenoceptor antagonists in prostate cancer cell lines. *Prostate.* 2016;76(8):757–66.
104. Iwamoto Y, Ishii K, Sasaki T, Kato M, Kanda H, Yamada Y, et al. Oral naftopidil suppresses human renal-cell carcinoma by inducing G 1 cell-cycle arrest in tumor and vascular endothelial cells. *Cancer Prev Res.* 2013;6(9):1000–6.
105. Exton JH. Mechanisms involved in α -adrenergic phenomena: Role of calcium ions in actions of catecholamines in liver and other tissues. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1980;1(1):3–12.
106. Scheglmann D, Demetter D. Alpha-1 adrenergic Receptor Number and Receptor Density in Isolated Hepatocytes From Foetal, Juvenile and Adult Rats. *Cell Signal.* 1992;4(3):287–91.
107. Kimura T, Pydi SP, Pham J, Tanaka N. Metabolic functions of g protein-coupled receptors in hepatocytes—potential applications for diabetes and nafld. *Biomolecules.* 2020;10(10):1–16.

108. Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger R, Kuhn C, Michalopoulos G. α 1-Adrenergic Effects and Liver Regeneration. *Hepatology*. 1987;7(6):1189–94.
109. Uetrecht J. Mechanisms of idiosyncratic drug-induced liver injury. In: Ramachandran A, Jaeschke H, editors. *Advances in Pharmacology*. 1th ed. KS: Academic Press; 2019. p. 133–63.
110. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol*. 2011;54(4):795–809.
111. Waser M, Mesaeli N, Spencer C, Michalak M. Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *J Cell Biol*. 1997;138(3):547–57.
112. Jezequel AM, Koch M, Orlandi F. A morphometric study of the endoplasmic reticulum in human hepatocytes. Correlation between morphological and biochemical data in subjects under treatment with certain drugs. *Gut*. 1974;15(9):737–47.
113. Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(3):531–8.
114. Vig S, Pandey AK, Verma G, Datta M. C/EBP α mediates the transcriptional suppression of human calreticulin gene expression by TNF α . *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(1):113–22.
115. Scheper GC, Van Der Knaap MS, Proud CG. Translation matters: Protein synthesis defects in inherited disease. *Nat Rev Genet*. 2007;8(9):711–23.
116. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: Coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 1999;13(14):1211–33.
117. Brush MH, Weiser DC, Shenolikar S. Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein GADD34 Targets Protein Phosphatase 1 γ to the Endoplasmic Reticulum and Promotes Dephosphorylation of the γ Subunit of Eukaryotic Translation Initiation

Factor 2. 2003;23(4):1292–303.

118. Hu H, Tian M, Ding C, Yu S. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection. *Front Immunol.* 2019;9(3083):13.
119. Xidativo O, Fainstein MK. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev Educ Bioquímica.* 2007;26(1):18–25.
120. Lindholm D, Korhonen L, Eriksson O, Köks S. Recent insights into the role of unfolded protein response in ER stress in health and disease. *Front Cell Dev Biol.* 2017 May 10;5(48):16.
121. Walter F, O’Brien A, Concannon CG, Düssmann H, Prehn JHM. ER stress signaling has an activating transcription factor 6 (ATF6)-dependent “off-switch.” *J Biol Chem.* 2018;293(47):18270–84.
122. Sheikh-ali M, Sultan S, Alamir A, Haas MJ, Mooradian AD. Hyperglycemia-induced endoplasmic reticulum stress in endothelial cells. *Nutrition.* 2010;26(11–12):1146–50.
123. Haas MJ, Kurban W, Shah H, Onstead-Haas L, Mooradian AD. Beta blockers suppress dextrose-induced endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *Am J Ther.* 2016;23(6):e1524–31.
124. Shuling S, Jin T, Yuyang M, Mengmeng L, Qiang Z. Crosstalk of autophagy and apoptosis: involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol.* 2017;232(11):2977–84.
125. Cybulsky A V. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(11):681–96.
126. Cheng X, Liu H, Jiang CC, Fang L, Chen C, Zhang XD, et al. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy through IRE1/JNK/beclin-1 in breast cancer cells. *Int J*

Mol Med. 2014;34(3):772–81.

127. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. In: Deretic V, editor. *Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press; 2008. p. 77–88.
128. Hiramatsu N, Chiang WC, Kurt TD, Sigurdson CJ, Lin JH. Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death. *Am J Pathol*. 2015;185(7):1800–8.



Anexos

ANEXO A

Descongelamiento de células HepG2.

1. Recolecta un vial con de células HepG2 almacenadas en un tanque de nitrógeno.
2. Se descongela en baño maría a 37°C intercalando con la temperatura ambiente por no más de 2 minutos*.
3. Traslada el volumen total del vial a un tubo estéril para centrifuga de 15 mL con 9 mL de medio DMEM sin suplementar.
4. Se resuspenden las células invirtiendo el tubo y creando turbulencia con la micropipeta.
5. Tapa el tubo y centrifuga a 2,000 rpm por 5 minutos.
6. Elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con 5 mL de DMEM sin suplementar.
7. Vuelve a centrifugar a 2,000 rpm por 5 minutos.
8. Decanta el contenido del tubo y resuspende el pellet con 1 mL de DMEM suplementado con 10% de SFB.
9. Considerando que cada vial tiene aproximadamente 2 millones de células, siembra el contenido del Falcon en un *flask* T25 con 4 mL de DMEM suplementado con 10% de SFB.
10. Al día siguiente evalúa la confluencia celular. De ser necesario, reemplaza el medio de cultivo por otro al 2% de SFB para que crezcan durante más tiempo.

*Evita humedecer la rosca del vial para reducir el riesgo de contaminación.

ANEXO B

Subcultivo HepG2

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Durante la fase de crecimiento exponencial se recomienda cambiar el medio dos veces por semana.
 - Para llevar a cabo el protocolo la confluencia celular debe estar alrededor del 80%.
 - Usar una relación de 1:4 a 1:6 de células para cultivar.

1. Decanta el medio de cultivo del *flask* T25.
2. Realiza de dos a tres lavados con solución salina amortiguada por fosfatos 1X (PBS, pH 7.4) previamente esterilizada (Pueden ser 4 mL, administrándola en toda la superficie interna del *flask*).
3. Tras decantar el PBS, se añade 1 mL de Tripsina y EDTA (Tripsina al 0,25% (p/v) - Solución de EDTA 0,53 mM) (*Sigma*, T4049) y deja actuar por 5 - 7 minutos aproximadamente en la incubadora (ver en microscopio invertido que se hallan despegado por completo las células) *.
4. Agrega 1-4 mL de DMEM suplementado para inactivar la tripsina.
5. Centrifuga a 2,000 rpm por 5 minutos.
6. Descarta el sobrenadante y resuspende en 1 ml para proceder al conteo.

* No agitar para evitar la formación de grumos.

ANEXO C

Conteo Celular con Hemocitómetro.

1. En un trozo pequeño de Parafilm o en un microtubo se colocan 90 μ L de azul de tripano y 10 μ L de la suspensión de células (FD = 10).
2. Homogeniza la gota con la micropipeta y coloca 10 μ L sobre la cámara de Neubauer.
3. Tapa la gota con el cubreobjetos y observa en el microscopio con el objetivo 10X.
4. Se realiza el conteo celular en los cuatro cuadrantes de las esquinas*.
5. Obtén el promedio de las células contadas, multiplica por 10 (factor de dilución) y por 10^4 células/ml:

Siendo n la suma total de células vivas de los cuatro cuadrantes de los extremos, FD el factor de dilución de la muestra y el azul de tripano, y 10, 000 el factor de la cámara, la concentración de células de la muestra se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de Células} = \left(\frac{n}{4}\right) (FD)(10,000) \frac{\text{Células}}{\text{mL}}$$

*Las células vivas son blanco azulado brillante, mientras que las muertas son azul opaco (teñidas).

ANEXO D

Proceso para congelar las HepG2.

- Cultivar células en *flask* para propagarlas: Deben tener una viabilidad sobre el 90% para congelarlas.
 - Preparar previamente el medio de cultivo para congelar y mantenerlo a 4°C hasta su uso. Este contiene 20% de SFB, 10% de DMSO, 2% L-Glutamina y 1% solución antibiótica.
 - Preparar el Mr. Frosty con isopropanol hasta la marca indicada y conservar a -20 °C hasta su uso.
1. Seguir el protocolo de tripsinización (subcultivo) en un *flask* confluyente.
 2. Realizar un conteo celular: hay que contar por lo menos 2 millones de células/ml de medio para congelar.
 3. Resuspende las células previamente despegadas con medio de cultivo para congelar, e inmediatamente después dosifica 1 ml en el o los viales a congelar*.
 4. Cierra los viales, colócalos en los compartimentos del Mr. Frosty, y traslada a -81°C en el ultracongelador.
 5. Tras 24 hrs se almacenan los viales en tanque con nitrógeno líquido**.

*Este paso debe hacerse rápidamente, ya que el DMSO es citotóxico.

**Pueden almacenarse hasta 1 mes en el ultracongelador. A partir de entonces puede disminuir la viabilidad celular.

ANEXO E

Concentraciones séricas de los medicamentos.

- Para preparar 1 ml de la solución madre 10 mM de cada medicamento se utilizaron las siguientes proporciones.

$$1 \text{ ml DMSO} \left(\frac{10 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{406.47 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \right) = 4.0647 \text{ mg Carvedilol}$$

$$1 \text{ ml DMSO} \left(\frac{10 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} \right) \left(\frac{444.97 \text{ mg}}{1 \text{ mmol}} \right) = 4.4497 \text{ mg Tamsulosina}$$

- A continuación, se ejemplifican los cálculos realizados para las concentraciones máximas de los medicamentos que se reportan en la literatura (tabla 7).

$$\text{Carvedilol} = 21 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \left(\frac{1 \text{ g}}{1 * 10^6 \mu\text{g}} \right) \left(\frac{\text{mol}}{406.47 \text{ g}} \right) \left(\frac{1 * 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 0.052 \mu\text{M}$$

$$\text{Tamsulosina} = 2.5 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \left(\frac{1 \text{ g}}{1 * 10^6 \mu\text{g}} \right) \left(\frac{\text{mol}}{444.97 \text{ g}} \right) \left(\frac{1 * 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \right) = 0.025 \mu\text{M}$$

Fármaco	Dosis en mg	Rangos de la C _{max}	
		μg/L	μM (μmol/L)
Carvedilol	25	21 - 67	0.0516 – 0.1648
	50	66 - 122	0.1623 – 0.3001
Tamsulosina	0.8	2.5 - 3.6	0.0056 – 0.0081
	0.4	3.1 - 5.3	0.0080 – 0.0119

Tabla 7. Concentraciones séricas de los adrenobloqueadores. Conversión de los rangos de las C_{max} de los fármacos (microgramos por litro a molaridad). Los datos fueron tomados de la tabla 1 y 2 del marco teórico.

ANEXO F

Consideraciones MTT

- MTT es estable en PBS a -20°C alrededor de 6 meses en obscuridad (Envolver en papel aluminio). No se recomienda almacenar a 4°C más de 1 mes.
- El stock se prepara disolviendo 5 mg de MTT por 1 mL de PBS 1X.
- Cristales de formazán son inestables con la luz del sol, por lo que debe protegerse la microplaca con papel aluminio.
- Para preparar el alcohol ácido se utilizó una solución de isopropanol 0.01 N de HCl (normalmente se usan rangos de 0.004 a 0.1 N) a partir de 1 N de HCl. Se hace inmediatamente antes de su uso.

$$30 \text{ mL Solución} = 0.3 \text{ mL HCl } 1 \text{ N} + 29.7 \text{ mL Isopropanol}$$

- Si los cristales tardan mucho en disolverse puede reducir el tiempo de incubación con MTT.
- Puede disolver cristales con protocolo de Tada y colaboradores (1986): Usa solución de SDS 10% w/v y HCl 0.01 N o DMSO.

ANEXO G

Extracción de ARN

1. Después del tratamiento, se retira el medio de cultivo con micropipeta.
2. Realiza dos lavados con PBS 1x frío.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
3. Coloca la placa sobre un gel frío y agregan 100 μL de trizol frío por cada pozo y frota con *scraper* en toda la superficie procurando juntar todo en una orilla.
 4. Recupera con micropipeta en microtubos (medir los volúmenes para siguiente paso).
 5. Añade un volumen igual de etanol absoluto en cada microtubo (300) y poner en vórtex a máxima velocidad por 30 segundos.
 6. Deposita el volumen total en columna con tubo colector.
 7. Centrifuga a 14,500 rpm por 30 segundos.
 8. Tira el fluido recuperado y vuelve a colocar el tubo colector.
 9. Agrega 400 μL de buffer *pre-wash* y centrifuga (misma velocidad) por 30 segundos.
 10. Descarta el sobrenadante y agrega 700 μL de buffer *wash*.
 11. Centrifuga por 2 minutos y descarta el sobrenadante.
 12. Vuelve a centrifugar por 2 minutos (sin buffer), transfiere la columna a un microtubo cónico de 1.5 mL y deja reposar con tala abierta por 1 o 2 min (hasta que no huela a alcohol).
 13. Añade 30 μL de agua libre de nucleasas para eluir el ARN y reposa por 1 minuto.
 14. Centrifuga por 45 segundos y descarta la columna.
 15. Del volumen final se alícuota y almacena a -80°C .

ANEXO H
Síntesis cADN

- Se requiere cuantificar 1 μg de ARNm para la RT exitosa (procurar que no rebase el volumen de 10 μL), por lo que se deben hacer los cálculos correspondientes para determinar el volumen de ARN aislado para cada muestra.
- Deberá evaluar la integridad del ARN antes de llevar a cabo el protocolo: en un el de agarosa debe aparecer la banda intensa y clara del ARNr 18S y 28S en 1.9 y 5 kb aproximadamente.
- El ARN debe estar libre de sales, iones, etanol, fenol o ADN genómico.

- Utilizar material estéril libre de RNAsas tratados con DEPC.
- Previamente descongela, mezcla y centrifuga brevemente cada uno de los componentes del kit y se colocan en hielo.

1. Preparar el coctel de reacción de la siguiente tabla en un microtubo libre de RNAsas (contemplar el control positivo).

Reactivo	Cantidad
ARN	1 μg
<i>Primer dT</i>	1 μL
Agua libre de nucleasas	hasta 12 μL (Varía)
Total	12 L

2. Si el templado es rico en GCs o contiene estructuras secundarias, mezcle suavemente, centrifugue brevemente e incube a 65 ° C durante 5 min. Enfríe en hielo, centrifugue y vuelva a colocar el vial en hielo.
3. Agregar los siguientes componentes en el orden especificado (se puede hacer un *Master Mix* para colocar 8 μL a cada microtubo):

Reactivo	μL
<i>5X Reaction Buffer</i>	4 μg
<i>RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL)</i>	1 μL
10 mM <i>dNTP Mix</i>	2 μL
<i>RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)</i>	1 μL
Total	20 L

4. Mezclar suavemente y centrifugar.

5. Para oligos dT (o específicos para un gen) se incuba por 1 h a 42 °C. (cambia ligeramente el protocolo para primers de genes específicos y templados ricos en GCs).
6. Terminar la reacción calentando a 70 ° C durante 5 min.
7. El producto se puede utilizar directamente en aplicaciones de PCR o se puede almacenar.

ANEXO I
PCR Punto Final

- Los cebadores deben estar previamente diluidos: IDT envía los ácidos nucleicos liofilizados, por lo que se prepara el stock con agua libre de nucleasas a 100 ng/μl, y diluye una alícuota 1:20 para la concentración de 5 ng/μl.
- La mezcla maestra para PCR *Thermo Scientific* (K0171) es una solución concentrada 2X de DNA polimerasa Taq, dNTPs y todos los componentes necesarios para una PCR a la que solo se le añade el templado y los cebadores.

1. Mezcla los siguientes reactivos en el orden correspondiente en un microtubo para PCR:

Reactivo	μL
Agua libre de nucleasas	2
<i>Forward primer</i> (5 ng/μl)	1
<i>Reverse Primer</i> (5 ng/μl)	1
<i>PCR Master Mix 2X</i>	5
cADN (50 ng/μl)	1
Total	10

2. Coloca los tubos en un termociclador y programa las siguientes temperaturas:

Grados Celsius	Tiempo
95	3 min
*95	45 min
*60	40 s
*72	12 s
72	3 min
4	-

ANEXO J

Preparación, corrida y revelado del gel de agarosa

1. En un matraz Erlen-Meyer de pese la cantidad correspondiente de agarosa según el porcentaje, volumen y grosor del gel deseado.
2. Agregue al matraz Erlen-Meyer el volumen de buffer de electroforesis 1x (ya sea TAE o TBE) correspondiente al grosor del gel deseado.
3. Agregue una barra magnética al matraz y mezcle vigorosamente con el agitador magnético.
4. Calienta en el microondas por evitando en lo posible la ebullición de la agarosa.
5. Así caliente se vacía en el molde e inmediatamente después se coloca el peine para generar el gel con sus respectivos pocillos.
6. Por otro lado, se llena la cámara de electroforesis con buffer 1x (TAE o TBE).
7. Una vez gelificado, se retira el peine del gel y se sumerge en la cámara con los pocillos del lado del electrodo de carga negativa. procurando que no hallan burbujas atrapadas.
8. Para cargar el gel se mezcla 1 μ L de buffer de carga y 5 μ L de muestra en un trozo de Parafilm con ayuda de una micropipeta y se pone en el pocillo correspondiente (repite para todas las muestras). Se cargaron 3 μ L del marcador de peso molecular.
9. Tapa la cámara de electroforesis, conecta a la fuente de poder (*Select BioProducts, BioVolt 250V*) y se corre por 45 - 60 min, a 100 V.

10. Una vez terminado el tiempo, se procede a revelar el gel reposando (cuidadosamente) por 15 minutos en una solución de Bromuro de Etidio.
11. Terminado el periodo se retira de la solución escurriendo la mayor cantidad de líquido posible.
12. Se coloca en la bandeja del transiluminador y captura las fotos iluminando el gel con luz UV.

% Agarosa	Rango (kb)	Aplicación
0.3	60 – 5	Evaluación de la integridad de YACs o PACs
0.5	30 – 1	Visualización de constructos artificiales
0.7	12 – 0.8	Evaluación de la integridad de BACs
1	10 – 0.5	Evaluación de la integridad del ADN genómico
1.2	7 – 0.3	Propósito general, visualización de productos de PCR entre 100 y 2000 bp
1.5	4 – 0.2	Evaluación de la integridad de ARNm o ARNr y de propósito General
2	3 – 0.1	Tamizaje genético de fragmentos de PCR pequeños (50 bp a 200 bp)
3	< 0.1	Visualización de STRs, subtipificación con amplicones cercanos

% Gel de Agarosa	Peso de Agarosa (gr)			
	125	250	375	500
Volumen total (ml)				
0.3	0.375	0.75	1.125	1.5
0.5	0.625	1.25	1.875	2.5
0.7	0.875	1.75	2.625	3.5

1	1.25	2.5	3.75	5
1.2	1.5	3	4.5	6
1.5	1.875	3.75	5.625	7.5
2	2.5	5	7.5	10
3	3.75	7.5	11.25	15

ANEXO K

RT qPCR

1. Agite suavemente y centrifugue brevemente todas las soluciones después de descongelarlas a temperatura ambiente.
2. Se prepara una mezcla maestra de reacción agregando los siguientes componentes (excepto el templado de ADN) para cada reacción de 10 µl en un tubo a temperatura ambiente:

Reactivo	µL
<i>Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)</i>	5
<i>Forward primer (5 ng/µl)*</i>	1
<i>Reverse primer (5 ng/µl)*</i>	1
cADN (50 ng/µl)	1
Agua libre de nucleasas	2
Total	10

*Igual que el protocolo de PCR punto final.

3. Mezcle bien la mezcla maestra y dispense los volúmenes adecuados en la placa para la qPCR.
4. Se añade 1 µl del cADN (≤ 500 ng/reacción) a los pocillos o tubos de PCR individuales que contienen la mezcla maestra.

Nota. Para RT-qPCR de dos pasos, el volumen de ADNc agregado de la reacción de RT no debe exceder el 10% del volumen final de PCR.

5. Mezcla suavemente las reacciones sin crear burbujas (no agite), cubre con el film plástico y centrifugue brevemente si es necesario.
6. Se programa el termociclador de acuerdo con las recomendaciones a continuación, coloca las muestras e inicia el programa.

Etapa	Grados Celsius	Tiempo
Desnaturalización	50	2 min
	95	3 min
Ciclos (40)	95	45 s
	60*	40 s
Curva Melt	95	15 s
	60**	1 min
	95	15 s

*Detección de fluorescencia para construir las curvas de amplificación. Varió la temperatura en función al par de oligonucleótidos utilizados.

**Cada +Δ 0.5 °C se detectó la fluorescencia para determinar la especificidad de los cebadores.

Cálculo de la Expresión Relativa

Donde:

gen problema: depende del par de oligos utilizados (tabla 5).

gen control: ARN Ribosomal 18 S.

Tratado: Muestra interactuada con medicamento.

Control: Muestra sin medicamento.

$$\Delta Ct = Ct_{gen\ problema_{tratado}} - Ct_{gen\ control_{tratado}}$$

$$\Delta ct = Ct_{gen\ problema_{control}} - Ct_{gen\ control_{control}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta ct$$

$$\text{Expresión Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ANEXO L

Extracción de Proteínas

Consideraciones previas:

- Alícuotar en Falcon de 15 mL PBS 1X y conservarlo en el refrigerador (se aplica frío).
 - Preparar los inhibidores de proteasas previamente.
 - Preparar el buffer RIPA con inhibidor a su dilución correspondiente inmediatamente antes de aplicar.
1. Decanta el medio de cultivo totalmente o auxíliate con una micropipeta.
 2. Se hacen dos lavados con PBS 1x frío.
 3. Coloca la placa sobre un gel frío y añade 300 μL de buffer RIPA con PMSF 1 mM frío a las células (100 μL por pozo).
 4. Distribuye y raspa con *scraper* por toda la superficie procurando recolectar en una orilla.
 5. Reúne el contenido total con micropipeta y alícuota en microtubos.
 6. Pasar por el vórtex por 30 seg a máxima velocidad.
 7. Reposar 5 min a 4°C en microcentrífuga.
 8. Centrifuga a 14,000 g (RFC) por 15 min.
 9. Recupera el sobrenadante y almacena a -80°C.

Notas.

- En el análisis de la síntesis proteica el buffer RIPA se preparó diluyendo 1% un cóctel inhibitor de proteasa (*Sigma*, P3840), fosfatasa 2 (*Sigma*, P5726) y fosfatasa 3 (*Sigma*, P0044) al volumen total usado. 10 μL de cada inhibidor + 970 μL de buffer RIPA.

- El PMSF es soluble en etanol, isopropanol, metanol hasta a 200 mM. Se preserva en frío (puede almacenarse hasta 9 meses a temperatura ambiente). Para prepara una solución madre a una concentración de 100 mM, se usó la siguiente relación:

$$10 \text{ mL Isopropanol} \left(\frac{100 \text{ mmol}}{1 \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{172.2 \text{ mgr}}{1 \text{ mmol}} \right) = 172.2 \text{ mg PMSF}$$

- Para una concentración de 1 mM (se sugiere utilizar entre 0.1 - 1 mM) en el buffer RIPA se diluye 1:100.

ANEXO M

Ensayo de Bradford

- Preparar la solución de Bradford como se indica al final del apartado.
 - Preparar stock de BSA 1 mg/ml de agua destilada.
1. Se elabora por triplicado una curva patrón mezclando las cantidades correspondientes en los pozos de una microplaca de 96 pozos:

µl Solución de Albúmina (1 mg/ml)	µl Agua	µl Reactivo de Bradford	Concentración de Proteína (µg/µl)
0	10	240	0
2	8	240	2
4	6	240	4
6	4	240	6
8	2	240	8
10	0	240	10

2. Se lee en espectrofotómetro (*Bio-Rad iMark Microplate Reader*) a 595 nm.

Solución de Bradford (1 L)

1. Disuelve 100 mg de Azul de *Comassie G-250* en 50 mL de etanol al 95%.
2. Añade 800 mL de agua destilada y agita por 5 minutos.
3. Agrega 100 mL de ácido fosfórico al 85% con agitación constante durante 5 minutos.
4. Afora a 1 L con agua destilada y pasa por papel filtro *Whatman #3*.
5. Se almacena en lugar fresco sin rayos de luz.

ANEXO N

Consideraciones del análisis de la síntesis proteica.

- Para la solución de Digitonina 0.00036%, primero se hace una solución madre 0.01% que es 1 mg en 10 ml de PBS1x. Se toman 360 μ l de la solución madre y se aforan a 10 mL (Conserva a 4 °C).
- Para el medio de cultivo 1 μ M de Puromicina, se prepara un stock 10 mM en DMSO y a partir de él se usa una proporción de 0.1 μ l de stock/ml medio suplementado.
- Para el medio de cultivo 50 μ M de HHT (*Sigma*, SML1091), se prepara un stock 10 mM en DMSO y a partir de él haz usa una razón de 5 μ l de stock/ml medio suplementado.

ANEXO O

Cuantificación de Proteínas por BCA

Consideraciones previas para microplacas de 96 pozos:

- Prepara el reactivo de trabajo inmediatamente antes de utilizarlo. La cantidad total se calcula con la siguiente ecuación (puede sumar una muestra más para compensar el error de pipeteo):

$$\begin{aligned}
 & (\#Muestras\ Curva + \#Extractos\ problema) * (\#Réplicas) * (200) \\
 & = Volumen\ total\ de\ reactivo\ de\ trabajo
 \end{aligned}$$

- El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes del reactivo "A" + 1 parte del reactivo "B".
- Calienta una incubadora a 37°C.

La concentración de proteínas se determinó con el kit *Pierce (Sigma, 23227)*, basado en el método de detección por ácido bicinconínico (BCA).

1. Prepara las siguientes diluciones en microtubos rotulados para hacer la curva patrón.

Vial	Volumen del Diluyente* (µl)	Volumen de BSA (µl)	Concentración final de BSA (µg/ml)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 del vial B	750
E	325	175 del vial B	500
F	325	175 del vial B	250
G	325	175 del vial B	125
H	400	175 del vial B	25
I	400	0	0

*Se usó Buffer RIPA con coctel de inhibidores.

2. Se añaden 10 µl en cada pozo de una microplaca para ELISA, y por otro lado los extractos de proteína problema (por duplicado o triplicado).
3. Agrega 200 µl de la solución de trabajo a cada pozo con muestra.
4. Cubra con papel aluminio y agite por 30 segundos.

5. Incuba a 37°C por 30 minutos.
6. Finalizado el tiempo de incubación se leen las absorbancias a 562 nm dentro de un periodo no mayor a 10 minutos.
7. Prepare una curva estándar trazando la absorbancia promedio de 562 nm corregida en blanco para cada estándar BSA frente a su concentración en µg/mL. A partir de la ecuación de la curva determina la concentración de proteína de cada extracto problema.

ANEXO P

Western Blot

Consideraciones previas:

- Preparar stock de soluciones de cada etapa (ver “Soluciones de la Electroforesis, Transferencia e Inmunomarcado” al final del anexo)

Electroforesis de proteínas

Consideraciones previas

- Para preparar las muestras se calcula el volumen necesario para ajustar los µg de proteína total necesaria (dependiendo del protocolo), y se mezcla con Buffer de Carga Preparado en microtubos rotulados. Sea *Sample Buffer 4X (Bio-Rad, 1610747)* con β-mercaptoetanol (*Bio-Rad, 1610710*) o *Sample Buffer (Sigma, S3401)*
- Debe cuidarse que el volumen total no sobrepase los 25 – 30 µL (volumen máximo que podrían contener los pocillos del gel).
- Los microtubos se colocan en flotadores y se reposan a 95 °C por 5 min, sea en baño maría o termoblock.
- Las instrucciones hacen referencia al montaje de electroforesis vertical con el equipo *Mini-PROTEAN (Bio-Rad)*.

1. Colocar el cristal delgado sobre el cristal grueso del lado de la ranura manera que quede una apretura entre los dos cristales.

2. Deslizar los cristales sobre el soporte en una superficie plana cuidando que la parte inferior quede alineada en ambos.
3. Presionar las pinzas del soporte para ajustar los cristales.
4. Montar el complejo soporte-cristales sobre el estante transparente (No olvidar colocar la esponja para evitar fugas en la solución del gel).
5. Se prepara el gel separador añadiendo en orden descendente los reactivos la tabla (varían las proporciones de acuerdo con la concentración de poliacrilamida deseada), mezclar invirtiendo y con micropipeta.

Componentes de la Solución	Volumen de los componentes para 10 ml del gel al 10%*
Agua	4 ml
Solución de Acrilamida Bis 29:1 al 30%	3.33 ml
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2.5 ml
SDS 10%	100 µl
PSA 10%	50 µl
TEMED	15 µl

*Un gel aproximadamente. PSA: Persulfato de Amonio

6. Introducir el gel, entre los cristales con micropipeta y con cuidado de que no queden burbujas. Se llenarán hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad aproximadamente (hasta la señal marcada anteriormente).
7. Añadir con una pipeta Pasteur agua destilada a lo largo de la ranura de manera que se vea una pequeña separación entre el agua y el gel.
8. Esperar a que polimerice alrededor de 1 hora.
9. Una vez polimerizado, se decanta el agua y seca con cuidado de no distorsionar el gel, con el papel filtro o sanitas.
10. Se prepara gel concentrador al 4 % de poliacrilamida como se muestra en las indicaciones de la tabla (invariable).

Componentes de la Solución	Volumen de los componentes para 5 ml del gel al 4%*
Agua	3 ml
Solución de Acrilamida Bis 29:1 al 30%	650 µl
Tris 0.5 M (pH 6.8)	1.25 ml
SDS 10%	50 µl
PSA 10%	40 µl
TEMED	6 µl

*Para aproximadamente un gel. PSA: Persulfato de Amonio

11. Agregar el gel de manera similar al paso 6 hasta llenar por completo la capacidad de la ranura y coloca el peine secando lo que se desborde.
12. Dejar que polimerice alrededor de 30 min.
13. Una vez polimerizado el gel y preparadas las muestras como se indica en las consideraciones previas, procede a retirar los cristales de su soporte y se montan en el equipo de la cámara de electroforesis vertical*.
14. Una vez dentro de la cámara de electroforesis llena con buffer de corrida 1x hasta la marca indicada en la cubeta, procurando llenar al ras el espacio que hay entre los dos cristales montados, de manera que la cara interna de los cristales estén completamente embebidas en el buffer de corrida, y fuera de ellos hasta donde lo indique la cámara (sean 2 o 4 geles)**.
15. El primer carril usa 3.5 µl del marcador de peso molecular *Page Ruler* (Thermo Scientific, 26619).
16. Se conecta con el *PowePac* (Bio-Rad) y se corre a 50 - 80 V por 10 - 15 min (hasta que las muestras se concentren en una banda delgada a la misma altura y entren en el gel separador), y posteriormente se sube el voltaje a 100 V y se deja por 1-2 hrs (hasta que la banda del buffer de carga llegue hasta el límite inferior del gel).

*Procura acomodar los cristales adecuadamente en los soportes. En caso de trabajar con uno solo, deberá de montar en el otro lado del soporte el cristal falso, o en dado caso, un gel con buffer de corrida.

**Trata de llenar con buffer de corrida nuevo el espacio entre los geles, y el usado afuera.

Nota: Los geles siempre deberán estar húmedos.

Electrotransferencia

1. Una vez corridas las muestras, se apaga la fuente de poder y desmonta los cristales del aparato (puede reutilizar el buffer de corrida).
2. Se retiran los cristales cuidadosamente, corta y elimina el gel concentrador. El gel separador se despega y coloca sobre un recipiente con buffer de transferencia.
3. Se recorta un trozo de membrana *Immun-Blot PVDF (Bio-Rad, 1620177)* del tamaño del gel (~ 6.5 X 8.5 cm) y se activa sumergiendo en metanol hasta por 5 min*.
4. Procede a armar el sándwich de la siguiente manera (de la parte negra a la roja-blanca), procurando que todos los elementos estén bien empapados en buffer de transferencia y eliminar todas las burbujas entre la membrana y el Gel (pasando un rodillo empapado en buffer sobre las membranas). Los elementos se ponen de la siguiente manera:

Esponja → Papel filtro → Gel SDS-PAGE → Membrana PVDF → Papel filtro → Esponja

5. Sella la estructura sobre la que se hizo el sándwich y coloca dentro de la cámara de electrotransferencia (parte negra con negra y la blanca con la roja).
6. Termina de llenar la cubeta con buffer, colocar dentro de la cubeta un agitador magnético y un gel enfriador (para que no se caliente demasiado el gel).
7. Se pone a funcionar el equipo en cuarto frío a 12 mAmp (o 25 V) toda la noche, o 100 mAmp si se quiere en par de horas (En el caso de ser proteína de alto peso molecular es preferible dejarlo toda la noche).

8. Al día siguiente se apaga el equipo, se desmonta el sándwich, e introduce la membrana en buffer de transferencia para las siguientes etapas.

*Puedes rotular con un lápiz la membrana, procurando no ser muy extenso y que no interfiera con el área donde se va a hacer la transferencia de proteínas.

Nota: la membrana siempre debe estar húmeda.

Inmunomarcado

1. Para comprobar que la transferencia de proteínas a la membrana se hizo exitosamente, la membrana se humedece con una solución de rojo Poceau por unos segundos, se escurre (puede reutilizarse) y se observa a la luz para ver los patrones de bandeos que corresponden a las proteínas separadas en la electroforesis y transferidas de las etapas anteriores.
2. Se puede colocar sobre un par de acetatos limpios para tomarles fotografías y/o escanearlos.
3. Con ayuda de la tinción y el marcador de peso molecular, se pueden identificar las regiones en el gel que corresponden a las proteínas de interés y se cortaron con ayuda de un bisturí*.
4. Los segmentos de la membrana se destiñen con 3 lavados de 5 minutos con TTBS a 110 rpm en agitador orbital.
5. Se procedió a bloquear la membrana, sumergiendo los fragmentos en recipientes individuales con una solución de TTBS con 1-5% de Leche en polvo (Svelty, Nestle) por 2-3 horas a 60 rpm a temperatura ambiente.
6. Finalizado el tiempo de bloqueo, se hacen 2 lavados con TBS Y 1 de TTBS, de 5 min cada uno con agitación.
7. Posteriormente se interactúan las membranas con el anticuerpo primario correspondiente, para esto deberá estar diluido en TTBS 5% de BSA**. La dilución dependerá del anticuerpo, por lo general es 1:1,000.

8. Deja incubar por 24 hrs en cuarto frío a 60 rpm dentro de un recipiente tapado***.
9. Terminado el periodo de incubación, se recupera la solución con el anticuerpo primario (puede usarse una vez más), y se hacen 2 lavados con TTBS y 1 con TBS de 10 min cada uno a 110 rpm.
10. Se llenan los recipientes con el anticuerpo secundario correspondiente, para esto deberá estar diluido en TTBS 1% de leche en polvo como se sugiere en la tabla...
11. Se incuba cubierto a temperatura ambiente con agitación suave por 2 horas.
12. Una vez terminado el periodo de incubación, se hacen 3 lavados con TTBS de 10 min a 110 rpm.
13. Se colocan las membranas sobre un acetato, y se humedece toda la superficie con la solución reveladora *ECL Substrate Kit (abcam, ab133409)* (se mezclan partes iguales de cada solución en un recipiente aparte, alrededor de 200 μ l de cada una).
14. Reposar 2 minutos dentro del *C-Digit blot scanner (Li-cor)*, e inmediatamente después revela la quimioluminiscencia****.
15. Guarda las fotografías más adecuadas para hacer su análisis posteriormente.

*En caso de evaluar proteínas de diferentes pesos moleculares en la misma membrana.

**Puede ser leche en polvo.

***Pueden ser los mismos donde se hace el bloqueo, o en un tubo falcon de 50 ml acostado dentro de un rotor (de manera que bañe por completo la membrana).

****Debe predisponer el equipo y la computadora para hacer el procedimiento eficientemente.

Stripping

Mild Stripping Buffer

1. Coloca la membrana en un recipiente y sumerge en suficiente buffer para cubrirla por completo e incuba a temperatura ambiente por 5 minutos.
2. Descarta el buffer y repite el paso 1.
3. Descarta el buffer y lava en agitación media con PBS 2 veces por 5 minutos.

4. Lava con una solución de TTBS en agitación media 2 veces por 5 minutos.
5. Repite el bloqueo e inmunomarcado (paso 5).

Harsh Stripping Buffer

1. Coloca la membrana en un recipiente y sumerge en suficiente buffer para cubrirla por completo e incuba a 36°C por 5 minutos.
2. Descarta el buffer y repite el paso 1.
3. Descarta el buffer y lava en agitación media con TBST 3 veces por 5 min.
4. Repite el bloqueo e inmunomarcado (paso 5).

Soluciones de la Electroforesis, Transferencia e Inmunomarcado.

Buffer de Corrida 10X (1 L)

Tris Base 250 mM (30.285 gr)

Glicina 1.92 M (144.1344)

SDS 1% (10 gr)

pH: 8.3 – 8.6

Buffer de Transferencia 10X (1 L)

Tris Base 250 mM (30.285 gr)

Glicina 1.92 M (144.1344)

Para preparar 1 L al 1x: 100 ml 10X + 200 ml metanol + 700 ml agua destilada.

Lower Buffer (100 ml)

Tris Base 1.5 M (18.171 gr)

pH: 8.8

Upper Buffer (100 ml)

Tris Base 0.5M (6.055 gr)

pH: 6.8

SDS 10%

SDS 10g/100 ml agua destilada.

Solución de Acrilamida 30%

Mezcla 30 gr de Acrilamida con 1 gr de bis acrilamida y afora a 100 ml con agua destilada y se filtra con papel *Whatman*.

Nota: Tener en cuenta la toxicidad de la acrilamida, por lo que se debe manejar con precaución.

Sample Buffer

Upper Buffer (2.5 ml)

SDS 10% (4 ml)

Glicerol (2 ml)

Bromofenol (400 μ l)

Beta Mercaptoetanol (1 ml)

TBS 10 X (1 L)

NaCl 1.37 M (88 gr)

Tris base 200 mM (24.3 gr)

pH: 7.6

Agua destilada

TTBS 0.05%

1L de TBS con 500 μ l de Tween 20.

Rojo Ponceau

0.1% Rojo Ponceau S

5% Ácido Acético

Guardar en la oscuridad.

Mild Stripping Buffer (1 L)

Glicina (15 g)

SDS (1 g)

Tween 20 (10 ml)

Se disuelven los componentes en 800 ml de agua destilada, ajusta el pH a 2.2 y afora a 1 L.

Harsh Stripping Buffer (0.1 L)

SDS (20 ml 10%)

Tris HCl (12.5 ml)

Agua destilada (67.5 ml)

β -mercaptoetanol (0.8 ml)

Se prepara en campana de extracción.

