



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magíster en Bioquímica y
Bioinformática.

**Participación de catepsina L en procesos de apoptosis y
autofagia en líneas celulares de cáncer de colon sometidas
a estrés metabólico.**

Tesis para optar al grado de magíster
en Bioquímica y Bioinformática

ORLANDO ALEXIS RIQUELME ALARCÓN
CONCEPCIÓN-CHILE
2016

Profesor Guía: Dra. Violeta Morín Muñoz
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dra. Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-tutor

Dr. Ariel Castro Alma
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



Dra. Marcela Torrejón Quezada
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dra. Paulina Bustos Araya
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dra. Violeta Morín Muñoz
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTO

La presente Tesis fue realizada financiada por el proyecto enlace VRID 212.038.018-1.0; y el proyecto FONDECYT 1120923. Además se agradece la adjudicación de la beca de articulación y de estipendio de la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción.

Agradezco también a mis tutores, a mis compañeros de laboratorio, y a mi familia por el apoyo entregado durante la realización de mi tesis.



INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
PROYECCIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

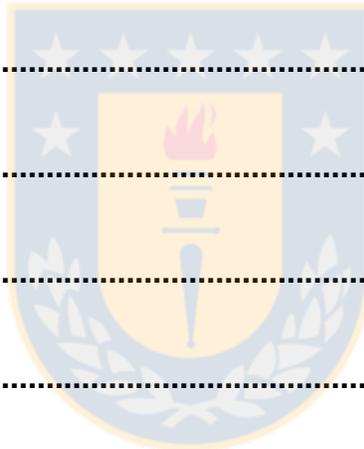


TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	vi
RESUMEN EJECUTIVO	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
Estrés y respuesta celular.....	1
Cáncer y supervivencia celular	2
Vías de señalización que regulan la autofagia celular	4
Vías de señalización que promueven la autofagia celular	5
Catepsinas	6
Catepsina L.....	7
Catepsinas y estrés metabólico	9
Catepsina L y supervivencia de células de cáncer colorectal	9
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y METODOS	14
Cultivo de líneas celulares de cáncer de colon	14
Inducción de estrés metabólico en las líneas celulares en estudio	14
Determinación de la función de catepsina L mediante el uso de un inhibidor o un silenciador específico.....	15
Determinación la actividad de catepsina L usando un sustrato fluorogénico	16
Localización de Catepsina L, alfa-tubulina y LAMP-1, mediante la técnica de Inmunocitoquímica.....	16
Obtención de lisados de proteínas totales mediante buffer RIPA	17
Electroforesis en condiciones denaturantes e inmunodetección mediante Western Blot.....	18
Inmunodetección de marcadores de autofagia	20
Determinación de la integridad del ADN genómico mediante la técnica del cometa	20
Análisis de los gráficos de cometas.....	21

Determinación de la integridad del ADN genómico mediante un análisis en un gel de agarosa.	22
Determinación de la actividad de catepsina L, mediante la técnica de zymograma.	22
Ensayo de viabilidad celular (MTT).....	23
Determinación de la expresión del mensajero de catepsina L, B y D	24
Extracción de ARN total.....	24
Obtención de ADN copia a partir del ARN	25
Amplificación de ADN copia mediante PCR.	26
Análisis densitométrico y estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
Efecto del estrés metabólico en la localización de catepsina L.....	29
Efecto del estrés metabólico en la localización lisosomal de catepsina L.....	33
Efecto del estrés metabólico en la actividad de catepsina L.....	37
Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la supervivencia celular	39
Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la apoptosis celular .	41
Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la autofagia celular ...	42
Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la expresión de otras catepsinas.....	43
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	54
PROYECCIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso de autofagia: fases de iniciación, elongación y maduración del autofagosoma, y fusión con el lisosoma.	3
Figura 2: Vías de señalización involucradas en la activación de la autofagia en células tumorales.....	4
Figura 3: Regulación de la autofagia por mTOR.	5
Figura 4: Diferencias entre los genes de catepsina L1 y catepsina L2.	7
Figura 5: Fotografía de núcleo celular sometido a un campo eléctrico.....	22
Figura 6: Efecto del estrés metabólico en la localización de catepsina L.	31
Figura 7: Efecto del estrés metabólico en la localización de catepsina L.	32
Figura 8: Efecto del estrés metabólico en la localización lisosomal de catepsina L en la línea celular COLO320.	35
Figura 9: Efecto del estrés metabólico en la localización lisosomal de catepsina L en la línea celular SW620.....	36
Figura 10: Efecto del estrés metabólico en la actividad de catepsina L.....	38
Figura 11: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la supervivencia celular.	40
Figura 12: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la apoptosis celular.....	44
Figura 13: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la apoptosis celular.....	45
Figura 14: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la autofagia celular.	46
Figura 15: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la expresión de otras catepsinas.	47
Figura 16: Posible mecanismo que asocia los niveles de glucosa con la función de catepsina L en la supervivencia celular.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados y su secuencia. 27

Tabla 2: Programa utilizado para cada PCR..... 27



ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
ARN: Ácido ribonucleico
AMP: Adenosín Monofosfato
AMPK: AMP-activated Protein Kinase
Atg : Autophagy-related gene
Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bcl2: B-cell linfoma 2
Bid: BH3 Interacting-domain death agonist
BSA: Albúmina de suero bovino
COLO320HSR: Células de carcinoma colorectal
Ctrl: Control
CTL: Catepsina L
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol
DEPC: Dietilpirocarbonato
DMEM: Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetilsulfóxido
dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato
DTT: Ditiotreitól
EDTA: Acido etilendiaminotetraacético
EGTA: Etilenglicol de ácido tetraacético
FITC: Isotiocianato de Fluoresceína
GAPDH: Gliceráldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GFP: Green Fluorescent Protein (proteína fluorescente verde)
IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato
kDa: Kilo Dalton
LC3 : Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LKB1: Liver Kinase B1
MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin
pb: Pares de base
PBS: Tampón Fosfato Salino
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIP2: Fosfatidil Inositol 4,5-bifosfato
PSA: Persulfato de Amonio
PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase
PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PM: Peso molecular
Rheb: Ras Homolog Enriched in Brain
RT-PCR: Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
SW620: Células de carcinoma colorectal
S/G: Sin glucosa
S/S: Sin suero
SDS: Dodecil Sulfato de Sodio
TSC: Tuberous Sclerosis Complex
TAE: Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBS: Tampón Tris Salino
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tm: Temperatura de fusión
TRITC: Isotiocianato de Tetrametil Rodamina
ULK1: UNC-51-like kinases 1



RESUMEN EJECUTIVO

En condiciones patológicas como el cáncer, las células tumorales, por su crecimiento descontrolado, no son nutridas correctamente por el flujo sanguíneo, lo que se traduce en un estrés metabólico. La supervivencia celular frente a un estrés metabólico o de falta de nutrientes está dada por medio de la evasión de la apoptosis y/o la promoción de la autofagia celular. Hay varios antecedentes que asocian la expresión de ciertas proteasas como catepsina L, en estos procesos. Es por ello, que se planteó como objetivo general de la siguiente tesis: Determinar la función de catepsina L en la supervivencia de células de cáncer y como objetivos específicos: determinar la función de catepsina L en la apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer colorectal sometidas tanto a estrés con medio sin suero como con medio sin glucosa. Para la realización de este estudio, se usaron las líneas celulares de adenocarcinoma colorectal COLO320 y SW620, las cuales se sometieron a estrés metabólico, como también se silenció o inhibió a catepsina L, para evaluar su efecto en la supervivencia celular. Los resultados obtenidos, mostraron que catepsina L es necesaria para la supervivencia frente a un estrés del tipo energético o sin glucosa, y su inhibición conllevaría a un defecto en la autofagia celular, que se vería reflejado en un aumento de la apoptosis celular.

RESUMEN

En ciertas condiciones patológicas como el cáncer, las células tumorales generalmente están expuestas a diversos tipos de estrés que pueden generar daños en el ADN o afectar el metabolismo celular debido a la falta de irrigación sanguínea, sin embargo, estas células son capaces de sobrevivir mediante la evasión de la muerte celular programada o apoptosis. Por otro lado, las células tumorales pueden promover la activación de la autofagia celular, la cual consta de la degradación de componentes intracelulares, mediante proteasas lisosomales y de esta forma obtiene energía para la síntesis de biomoléculas necesarias para su supervivencia.

Existen estudios que vinculan la participación de la proteasa lisosomal catepsina L en procesos de supervivencia, siendo su función dependiente del tipo celular y del estrés al que son sometidas las células. Sin embargo, no hay muchos antecedentes sobre la función de catepsina L en la supervivencia de células de cáncer colorectal sujetas a estrés metabólico. Es por ello, que se planteó como objetivo general de la siguiente tesis: Determinar la función de catepsina L en la supervivencia de células de cáncer colorectal y como objetivos específicos: determinar la función de catepsina L en la apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer colorectal sometidas tanto a estrés con medio sin suero como con medio sin glucosa. Para la realización de este estudio, se usaron las líneas celulares COLO320 y SW620, ambas de adenocarcinoma colorectal, las cuales se cultivaron en medio sin suero o con medio sin glucosa durante 24 horas para inducir un estrés del tipo metabólico. De esta forma, para determinar las variaciones en la localización y expresión de catepsina L, se realizó una inmunodetección de esta, junto a otros marcadores tanto del citoesqueleto como del lisosoma. Por otra parte, para analizar las variaciones en la

actividad, se utilizó un sustrato específico de catepsina L; este experimento se complementó con un análisis de las formas activas de catepsina L, por medio de un zimograma. Para determinar la función de catepsina L en el proceso de supervivencia celular se utilizó tanto un inhibidor como un silenciador específico y posteriormente se evaluó su efecto en la viabilidad celular, este análisis se complementó con la detección de marcadores específicos de apoptosis y autofagia, y el análisis de integridad del ADN. Por último, para analizar la expresión de otras proteasas lisosomales luego de inhibición de catepsina L, se realizó un PCR usando partidores específicos de catepsina D y B.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión, localización y actividad de catepsina L se ven alteradas frente a un estrés metabólico. Por otra parte, se observó que catepsina L es necesaria para la supervivencia frente a un estrés del tipo energético o sin glucosa, y que su inhibición conllevaría a un defecto en la autofagia celular, que se vería reflejado en un aumento de la apoptosis. Cabe destacar, que pese a que hubo un aumento de la expresión de catepsina D, esta no fue capaz de suplir la función de catepsina L en la supervivencia celular. Este estudio, nos permitió corroborar la importancia de catepsina L en el proceso de supervivencia celular frente a un estrés energético, sin embargo, aún falta realizar un análisis más profundo sobre las vías de señalización involucradas.

ABSTRACT

In certain pathological conditions such as cancer, tumor cells are exposed to various types of stress that can lead to DNA damage or affect cellular metabolism, due to lack of blood supply. However, these cells are able to survive by evasion of programmed cell death or apoptosis. Furthermore, tumor cells can promote cell autophagy consisting of degradation of intracellular components by lysosomal proteases. The aim of autophagy is to obtain energy, which is used to synthesize essential biomolecules.

Studies have shown that the role of cathepsin L, a lysosomal protease, in cell survival, is dependent on type of cell and of cellular stress. However, it is unknown the role of cathepsin L in the survival of colorectal cancer cells under metabolic stress. Therefore, the general objective of this thesis was to determine the role of cathepsin L in survival of colorectal cancer cells and the specific objectives were to determine the function of cathepsin L on apoptosis and autophagy in colorectal cancer cell lines subject to metabolic stress. For these studies, the colorectal cancer cell lines SW620 and COLO320 were cultured in serum-free medium or medium without glucose for 24 hours to induce metabolic stress. In order to determine variations in the localization and expression of cathepsin L, this protein was detected by immunofluorescence in conjunction with detection of specific cytoskeleton and lysosome markers. To analyze the cathepsin L activity, a specific substrate was used, and this experiment was supplemented by analysis of the active forms of cathepsin L by zymography. To determine the function of cathepsin L on cell survival, drug inhibition or siRNA silencing of cathepsin L was used. On the other hand, apoptosis and cell autophagy were analyzed by immunodetection of specific markers. Apoptosis assays were supplemented by the analysis of DNA

integrity. Finally, RT-PCR was used to analyze whether inhibition of cathepsin L affects the expression of cathepsin D and B lysosomal proteases.

Results showed that the expression, localization and activity of cathepsin L were affected by metabolic stress. In addition, they demonstrated that cathepsin L is necessary for cell survival under stress without glucose. Moreover, inhibition of cathepsin L leads to a defect in cell autophagy, suggesting a mechanism for the observed increase of apoptosis under this condition. It should be noted that although there was an increase on the expression of cathepsin D, this was unable to compensate the role of cathepsin L in cell survival. This study confirms the importance of cathepsin L on cell survival under energetic stress, however, further analysis are needed to understand the molecular mechanisms involved.



INTRODUCCIÓN

Estrés y respuesta celular

Las células responden al estrés celular de variadas maneras, entre las que se encuentra la activación de vías de señalización que promueven la supervivencia o la muerte celular programada. Si el estrés no es nocivo, la célula es capaz de recuperarse y persistir, sin embargo si este es nocivo la célula es llevada a la muerte celular. Dentro de los distintos tipos de estrés que pueden sufrir las células, se encuentran el estrés genotóxico, oxidativo y el metabólico (Fulda y col., 2010). En cuanto al estrés genotóxico, este es causado por la exposición a agentes quimioterapéuticos, irradiación y luz ultravioleta entre otros; los cuales provocan quiebres en el ADN de la forma de doble hebra (DSBs) y simple (SSBs); la respuesta celular consiste en la activación de la quinasa CHK2 y del factor de transcripción p53, las cuales generalmente llevan a la detención del ciclo celular o a la muerte celular (Richard y col., 2009). En cuanto al estrés oxidativo, se encuentran los productos reactivos del oxígeno (ROS), entre los que se encuentran: peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y radical peróxido. Normalmente, las células regulan estas especies reactivas mediante enzimas como la catalasa, superoxidodismutasa y otras proteínas (Fulda y col., 2010). La perturbación de ROS, puede llevar a la muerte celular si estas especies reactivas no son controladas (Fulda y col., 2010). La exposición de las células a un estrés metabólico como la falta de glucosa o también la falta de oxígeno entre otras, conllevan a la interferencia de la biogénesis mitocondrial y ribosomal, esto se relaciona con la activación de genes de la vía de P53, con el factor de crecimiento similar a la insulina 1(IGF-1) y la vía de señalización del blanco de inhibición de rapamicina (mTOR). La activación de estas vías de señalización se relaciona a un retraso de la glicolisis y la restauración de la fosforilación oxidativa (Milisav, 2011). Estos tipos de estrés fluctúan en condiciones normales y las células pueden adaptarse a ellos

mediante la reparación de daños celulares, la reutilización de recursos y mediante la muerte celular programada si el estrés se mantiene (Milisav, 2011).

Cáncer y supervivencia celular

En ciertas condiciones patológicas como el cáncer, las células están sujetas a variados tipos de estrés del tipo genotóxico, oxidativo y metabólico. Sin embargo, las células cancerígenas tienen alterados los mecanismos de regulación asociados a estos tipos de estrés, como lo es la apoptosis, donde se encuentran mutadas proteínas supresoras de tumores como p53, y se sobreexpresan oncogenes con respuesta antiapoptótica, alteraciones que promueven el crecimiento celular descontrolado (Fulda y col., 2010, Hanahan y col., 2011). Por otra parte, otro de los mecanismos involucrados en la persistencia tumoral es la autofagia, ya que las células tumorales, sujetas a algún tipo de estrés como el metabólico, la presentan como un mecanismo de supervivencia que permite la obtención de energía y de componentes orgánicos esenciales para la síntesis de biomoléculas de importancia biológica (Lozy y col., 2012). En el proceso de autofagia, el material citoplasmático defectuoso, ya sea proteínas o organelos, se almacenan en vesículas de doble membrana o autofagosomas; las etapas que se requieren para su conformación se denominan: inicio, elongación y maduración (Yagn y col., 2015) (**figura 1**). La etapa de iniciación, comienza con el secuestro de una porción de la membrana del aparato de Golgi conocida como fagóforo, por el complejo ULK1, constituido por las proteínas: ULK1, Atg13, FIP200 y Atg101. Luego, el heterodímero Atg12-Atg5 interactúa con la proteína Atg16L, promoviendo la expansión y elongación del fagóforo (Jung y col., 2009; Mercer y col., 2009). Posteriormente durante la etapa de maduración, las proteínas Atg7 y Atg3, adicionan a la proteína LC3I, el fosfolípido fosfatidiletanolamina, por lo que pasa a llamarse LC3II, esta proteína conjugada se inserta en la membrana en formación, permitiendo el anclaje y conformación del autofagosoma (Apel y col., 2009). Finalmente el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para formar el autolisosoma, donde se lleva a cabo la

digestión de los componentes citoplasmáticos mediante hidrolasas y/o proteasas lisosomales como las catepsinas (Bohley y Seglen, 1992, Yang y col., 2015).

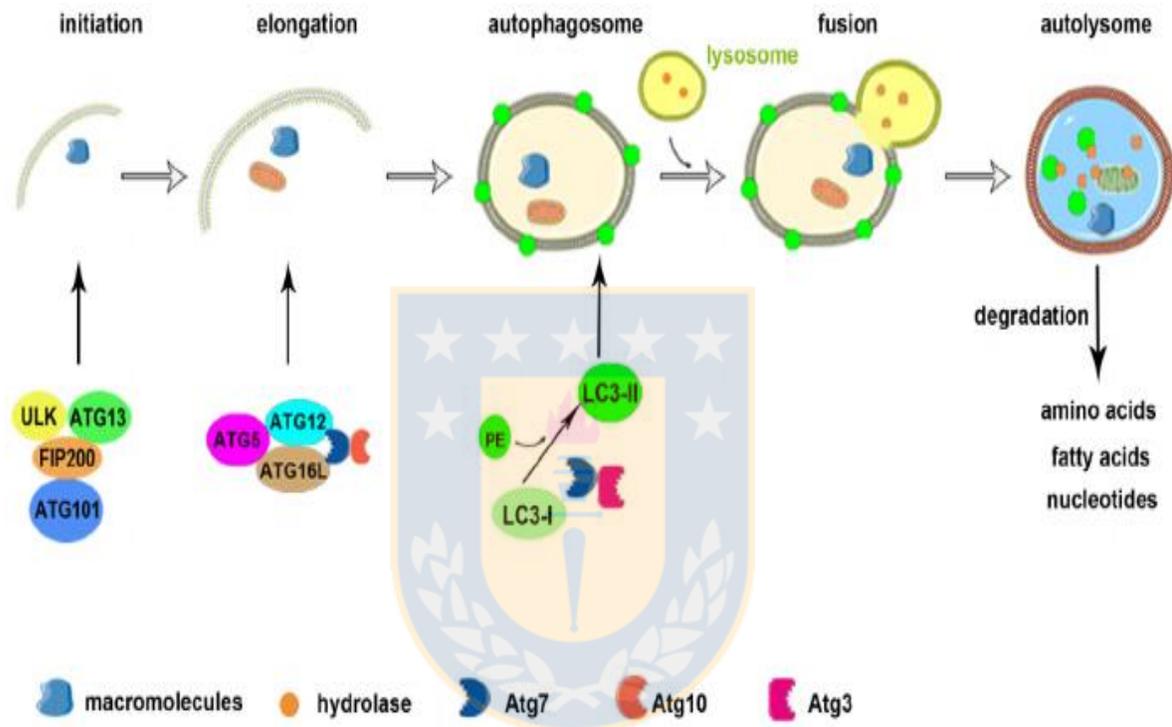


Figura 1: Proceso de autofagia: fases de iniciación, elongación y maduración del autofagosoma, y fusión con el lisosoma. Para llevar a cabo la autofagia se necesita conformar el autofagosoma o vesícula de doble membrana donde se almacenan organelos o proteínas defectuosas. Para la formación del autofagosoma es requerido el complejo ULK1, el cual permite secuestrar una porción de membrana celular, durante una etapa llamada iniciación. Posteriormente en la etapa de elongación participa el heterodímero Atg12-Atg5; y en la etapa de maduración se le adiciona la proteína LC3II. Finalmente el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, conformando lo que se conoce como autolisosoma, el cual permite la degradación de componentes citoplasmáticos como proteínas o organelos defectuosos (Yagn y col., 2015).

Vías de señalización que regulan la autofagia celular

Existen muchas vías de señalización que regulan la autofagia de acuerdo al estado fisiológico de la célula, como lo es, el estado nutricional, niveles energéticos y factores de crecimiento (Lozy y col., 2012). Una de las vías involucradas en el crecimiento y supervivencia de células cancerígenas es la vía de mTOR (blanco de inhibición de rapamicina), la cual se encuentra anormalmente activada en muchos tipos de cánceres (LoPiccolo y col., 2008). Esta es activada por muchas vías de señalización corriente arriba de mTOR, una de las vías más conocidas es PI3 quinasa-AKT1 (**figura 2**); la cual es promovida en respuesta a la presencia de nutrientes y factores de crecimiento en el medio extracelular, los cuales son censados mediante receptores tirosina quinasa, que promueven la activación de forma directa o indirecta (a través de la GTPasa RAS) de la quinasa PI3 (PIK3) (Brech y col., 2009; Chen y col., 2009).

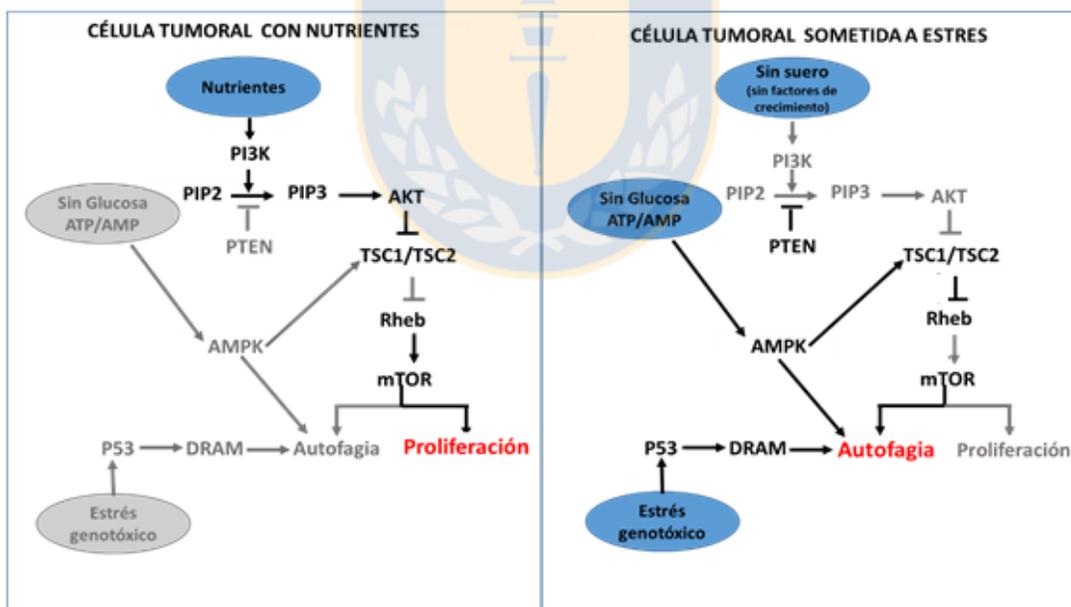
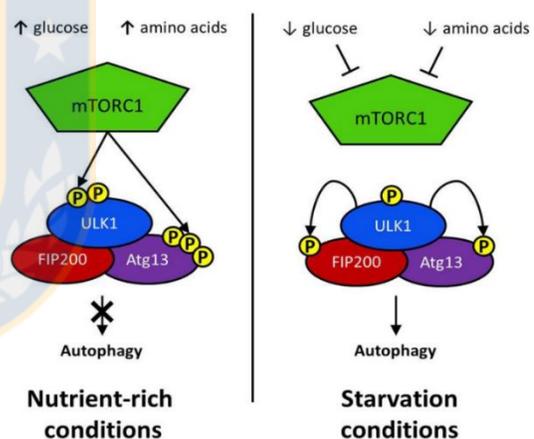


Figura 2: Vías de señalización involucradas en la activación de la autofagia en células tumorales. En este esquema se puede apreciar vías de señalización que se encuentran activas tanto en condiciones favorables como en condiciones de estrés celular. Cabe destacar que en condiciones de estrés celular se promueve la autofagia como efector final (Chen y col., 2009).

Una vez que PIK3 es activada, esta fosforila al lípido de membrana fosfatidil inositol 4,5 (PIP2), y lo convierte a la forma de fosfatidil inositol 3,4,5 (PIP3); este segundo mensajero recluta a la proteína quinasa PDK1, que activa a la proteína quinasa AKT1 que a su vez fosforila a TSC1/TSC2 (complejo de esclerosis tuberosa), la cual pierde su interacción con la GTPasa Rheb (Menon y col., 2014, Degenhardt y col., 2006, Brech y col., 2009). La salida de este complejo, conlleva posteriormente al aumento de la actividad de la GTPasa Rheb, que activa a la proteína del complejo mTOR (TORC1), el cual promueve el crecimiento, proliferación y traducción celular (**figura 2**), mediante la activación de la síntesis de proteínas y la inactivación de la autofagia por fosforilación del complejo proteico ULK1 (**figura 3**) (Brech y col., 2009, Chen y col., 2009).

Figura 3: Regulación de la autofagia por mTOR.

En este esquema se puede apreciar que en condiciones ricas en nutrientes, mTOR fosforila residuos de serina del complejo ULK1 e impide la activación de la autofagia. Por otra parte en condiciones de estrés metabólico, debido a una disminución de la actividad de mTOR, este no puede fosforilar al complejo ULK1, favoreciendo de este modo el proceso de autofagia (François y col. 2015).

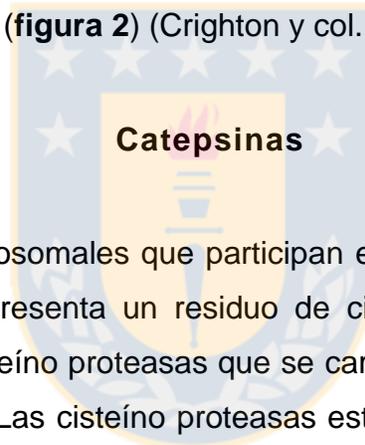


Vías de señalización que promueven la autofagia celular

Dentro del estrés metabólico, se destaca el estrés sin suero o sin factores de crecimiento y el estrés energético o sin glucosa. La falta de factores de crecimiento se asocia a la inactivación de la quinasa PI3-AKT1, lo que conlleva a la permanencia y estabilización del complejo TSC1/TSC2 (complejo de esclerosis tuberosa) (Chen y col., 2009). Por otro lado, frente a estrés energético o sin glucosa, la vía de

señalización de AMP dependiente de quinasa (AMPK) es activada corriente arriba por la quinasa LKB1, la cual frente a un incremento de la relación AMP/ATP, puede activar la autofagia de forma directa a través del complejo ULK1. Como también de forma indirecta, al fosforilar el complejo TSC1/TSC2, permitiendo de esta forma su heterodimerización y por lo tanto su estabilización. La activación de este complejo se relaciona con una disminución de la actividad de la GTPasa Rheb, y por lo tanto la inactivación de mTOR (TORC1); lo que conlleva posteriormente a la activación de la autofagia celular (**figura 2**) (Brech y col., 2009).

Por otra parte, en condiciones de estrés genotóxico, la proteína p53 citosólica puede promover la autofagia por medio de la activación directa del regulador de daño por autofagia (DRAM) (**figura 2**) (Crighton y col., 2006).



Dentro de las proteasas lisosomales que participan en el proceso de autofagia, se encuentra un grupo que presenta un residuo de cisteína e histidina en su sitio catalítico, estas son las cisteíno proteasas que se caracterizan por ser activas a pH ácido (Stoka y col., 2005). Las cisteíno proteasas están conformadas por un grupo de 11 proteasas denominadas catepsinas B, H, L, S, C, K, O, F, V, X y W (Mason y Wilcox, 1993; Turk y col., 2002). Estas proteasas se caracterizan por presentar una región regulatoria o propéptido, el cual también participa en el plegamiento de las catepsinas. Las catepsinas necesitan del pH ácido, el cual otorga un ambiente reductor que permite la conformación de su sitio activo y posteriormente la escisión de su cadena pesada y liviana por autocatálisis, procesos que son necesarios para su maduración (Mach y col., 1994). En cáncer, se han registrado catepsinas secretadas por células tumorales que participan en la degradación de componentes de la membrana basal como colágeno, elastina y de proteínas de adhesión celular como E-caderina, favoreciendo de este modo procesos de invasión y metástasis

tumoral (Tan y col., 2013). Por otra parte, las catepsinas B y L se han asociado a proceso angiogénicos y proliferativos (Vasiljeva y col., 2008, Gocheva y col., 2007).

Catepsina L

En humanos existen dos tipos de catepsina L, las cuales son catepsina L o L1 y catepsina L2, ambas provienen de un ancestro común, es por ello que presentan un alto porcentaje de identidad, cercano a un 80% de identidad (Bromme y Wilson, 2011). Ambas catepsinas son codificadas por genes distintos y se caracterizan por presentar el mismo número de exones, los cuales presentan un alto porcentaje de identidad, sin embargo difieren en las regiones intrónicas (**figura 4**) (Itoh y col., 1999). En cuanto a la composición aminoacídica, la principal diferencia entre ambas proteínas es en la región del propéptido, cabe destacar que catepsina L2 no posee sitios de glicosilación y su localización es tejido específica, a diferencia de catepsina L o L1 que es expresada en todos los tejidos y presenta una alta glicosilación (Itoh y col., 1999).

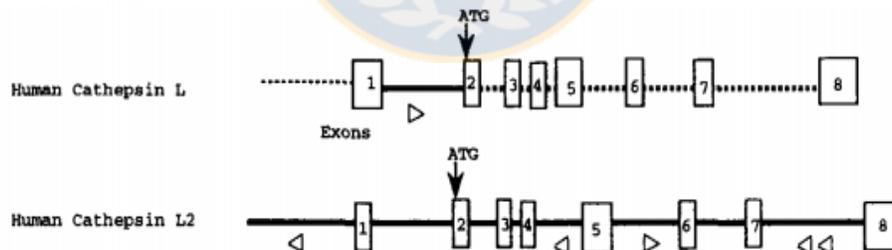


Figura 4: Diferencias entre los genes de catepsina L1 y catepsina L2. El exón 2 como sitio de inicio de transcripción es común para ambas catepsinas. Por otra parte, catepsina L y L2 poseen el mismo número de exones, los cuales presentan una alto porcentaje de similitud. La principal diferencia entre ambos genes se da en las regiones intrónicas (Itoh y col., 1999).

La forma madura de catepsina L presenta un peso molecular de 29kDa, por otra parte, la cadena pesada que la conforma, tiene un tamaño de 25kDa y su cadena liviana de 5kDa (Mach, 1994; Mason y Wilcox, 1993). La actividad óptima de catepsina L se encuentra en el rango de pH 3 al 6,5 y es inhibida por agentes alquilantes como Iodoacetamida, y por inhibidores comerciales como E-64d (Kirschke y col., 1977).

Se han registrado distintas variantes de corte y empalme de catepsina L, siendo algunas de ellas asociadas a la progresión de ciertos tipos de cáncer, como el colorectal, donde catepsina L es sobreexpresada tanto a nivel nuclear como a nivel citosólico (Abudula y col., 2001, Jean y col., 2002, Sullivan y col., 2009). La activación de esta catepsina en cáncer, se debe principalmente a la disminución de los inhibidores endógenos como es cistatina A (Bromme y Wilson, 2011). En cuanto a catepsina L nuclear, Sullivan y colaboradores (2009) detectaron en tejidos de cáncer colorectal dos isoformas de catepsina L de 50 y 25kDa respectivamente, las cuales también presentan una localización citoplasmática. Por otro lado, Hiwasa y colaboradores (1996), demostraron que fibroblastos que han sido transformados con el oncogén RAS, expresan una variante nuclear de catepsina L, sin embargo su función no ha sido dilucidada. Por otra parte, se ha registrado una variante nuclear de catepsina L, la cual participa en la degradación del factor de transcripción CDP/CUX, lo que genera una isoforma de menor tamaño molecular que participa en la transcripción de genes asociados a la proliferación celular como es la ADN polimerasa alfa (Goulet y col., 2004). Por otra parte, se ha registrado la participación de catepsina L en modificaciones epigenéticas, como es el clivaje de la región N-terminal de la histona H3 en células de ratón, lo que está relacionado con el grado de compactación de la cromatina (Duncan y col., 2008).

Catepsinas y estrés metabólico

Las células tumorales presentan distintos niveles de nutrición, debido a que la irrigación sanguínea no es homogénea, sin embargo, estas células son capaces de adaptarse a estos cambios metabólicos y sobrevivir. De esta forma, cuando las células no son nutridas con factores de crecimiento provenientes del suero o con glucosa, hay una disminución del recambio proteico o del proceso de síntesis y degradación de proteínas (Cockle y col., 1984). Tournu y col., (2001) utilizando fibroblastos transformados con el oncogén RAS, demostraron que cambios en los niveles de glucosa, se asocian con la expresión tanto de catepsina B y L y no de otro tipo de proteasas (Tournu y col., 2001).

Catepsina L y supervivencia de células de cáncer colorectal

La supervivencia de las células cancerígenas a estrés celular, está dada principalmente por la inactivación de vías apoptóticas y/o la activación de vías de señalización que promueven la autofagia celular como mecanismo de supervivencia (Lozy y col., 2012). La función que catepsina L tiene en la apoptosis celular es dependiente del tipo celular y del estrés, al cual son sometidas las células en estudio. De esta forma, si las células NT2 de carcinoma embrional son sometidas a un estrés oxidativo parcial, las catepsinas promueven la activación de la vía intrínseca de la apoptosis por medio del rompimiento proteolítico de la proteína Bid, un miembro antiapoptótico de la familia Bcl-2 (Vasiljeva et al, 2007). Relacionado a esto, en células de osteosarcoma que son sometidas a estrés del tipo genotóxico, catepsina L2 también se encuentra participando en procesos proapoptóticos mediados por el factor de transcripción E2F1 (Wong y col., 2013).

Sin embargo, en células de glioblastoma sometidas a estrés mediante la activación de un receptor de muerte celular, se ha demostrado la participación de una variante de catepsina L1 en procesos antiapoptóticos, ya que al silenciar esta variante

mediante silenciadores específicos, hay un aumento considerable de la permeabilidad mitocondrial y en la expresión de caspasas efectoras 3 y 7 (Kenig y col., 2011). Cabe destacar, que catepsina L puede proteger a las células cáncergenicas sometidas a agentes quimioterapéuticos al degradar a catepsina D, una proteasa principalmente proapoptótica (Zheng y col., 2008). Con respecto a la participación de catepsina L directamente en la apoptosis de células de cáncer colorectal sometidas a estrés metabólico, no hay antecedentes hasta la fecha.

En cuanto a la función de catepsina L1 en la autofagia celular, se sabe que esta participa en etapas finales de la autofagia, ya que forma parte del lisosoma durante la fusión de este con los autofagosomas (Lozy y col., 2012). Se tiene como antecedente, que células de osteosarcoma tratadas con un inhibidor de catepsina L1, presentan una acumulación de vacuolas autofágicas, lo que se relaciona con una disminución de la viabilidad celular (Zheng y col., 2008). Con respecto a las etapas iniciales de la autofagia, se tiene como antecedente que en células de ratón (PC12) sometidas a estrés metabólico, catepsina D y B participan en la promoción e inhibición de la autofagia respectivamente (Boya y col., 2008). Por otro lado, la función de catepsina L1 en etapas tempranas de la autofagia, en líneas celulares de cáncer colorectal, se desconoce, sin embargo hay antecedentes que la asocian con la vía de señalización kRAS, la cual se caracteriza por promover diversas vías de señalización como la de PI3K-AKT-mTOR y la vía de MAPK, induciendo la proliferación celular en condiciones nutricionales favorables (presencia de factores de crecimiento) o la autofagia celular en condiciones desfavorables (sin factores de crecimiento) (Urbanelly y col., 2010). La relación entre kRAS y la expresión de catepsina L1 ha sido estudiada en diversas líneas celulares de fibroblastos, donde se ha demostrado la presencia de una forma nuclear de catepsina L1 cuando la vía de señalización de kRAS se encuentra activa (Hiwasa y col., 2001, Chambers y col., 1992), como también el aumento de diversas formas de catepsina L1 cuando estas líneas celulares transformadas son sometidas a cambios metabólicos, participando en la supervivencia de estas (Tournu y col., 2001). Sin embargo, estos

estudios no han sido realizados en líneas celulares de cáncer colorectal, es por ello, que se planteó como hipótesis:

“Catepsina L es fundamental para la supervivencia de líneas celulares de cáncer de colon sometidas a estrés metabólico”. Para demostrar la hipótesis se propone como objetivo general del proyecto: **Determinar la función de catepsina L en la supervivencia de líneas celulares de cáncer colorectal**. Para el cumplimiento de este objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos. Objetivo específico 1: **Determinar la función de catepsina L en la apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer colorectal sometidas a estrés con medio sin suero**. Objetivo específico 2: **Determinar la función de catepsina L en la apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer colorectal sometidas a estrés con medio sin glucosa**.



HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en la presente Tesis, tomando en cuenta los antecedentes citados anteriormente, es la siguiente:

Catepsina L es fundamental para la supervivencia de líneas celulares de cáncer de colon sometidas a estrés metabólico.



OBJETIVOS

El objetivo general desarrollado en la presente Tesis es:

Determinar la función de catepsina L en la supervivencia de líneas celulares de cáncer colorectal.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- **Determinar la función de catepsina L en la apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer colorectal sometidas a estrés con medio sin suero.**
- **Determinar la función de catepsina L en la apoptosis y autofagia en líneas celulares de cáncer colorectal sometidas a estrés con medio sin glucosa.**



MATERIALES Y METODOS

Cultivo de líneas celulares de cáncer de colon

Se cultivaron células SW620 en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose (DMEM/low glucose, 4mM L-glutamina, 1g/L glucosa, 110mg/L piruvato sódico), y la línea celular COLO320 en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640, 2g/L glucosa, 25mM HEPES, 2mM L-glutamina, 2mg/L piruvato sódico). Los dos medios se suplementaron con suero bovino fetal 10%v/v (HyClone); penicilina 100U/mL–estreptomicina 100 ug/mL (HyClone), fungizona 1% p/v (HyClone), aminoácidos no esenciales 1X (HyClone), penicilina 100U/mL y estreptomicina 100µg/mL. Las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ en estufa de cultivo. Para traspasar el cultivo de las células desde una placa 100x20mm a otra de pocillos más pequeñas (4, 6 y 96 pocillos) con o sin cubreobjetos, se procedió en primer lugar a retirar el medio de cultivo, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS1X (NaCl 137mM, Merck; KCL 2,7mM, Merck; Na₂HPO₄*2H₂O 4,3mM, Merck; KH₂PO₄*2H₂O 1,4mM, Merck, ajustando el pH a 7,4), luego se adicionó 600 µL de tripsina 0,25% p/v (HyClone) para remover las células, que posteriormente se homogenizaron con pipeta. Finalmente, las células se traspasaron a las placas de pocillos más pequeños que ya contenían medio fresco.

Inducción de estrés metabólico en las líneas celulares en estudio

Para inducir el estrés metabólico, las líneas celulares en estudio se estresaron durante diferentes tiempos con medios sin suero o sin glucosa. En una primera instancia, para estresar con medio sin suero la línea celular COLO320, esta se cultivó en medio RPMI-1640 (HyClone), suplementado con penicilina 100U/mL–estreptomicina 100 ug/mL (HyClone), fungizona 1% p/v (HyClone), aminoácidos no esenciales 1X (HyClone). Por otra parte, para estresar la línea celular COLO320 con medio sin glucosa, las células se cultivaron con medio Roswell RPMI-1640 (Gibco)

suplementado con suero bovino fetal 10%v/v (FBS;HyClone); penicilina 100U/mL–estreptomicina 100 ug/mL (HyClone), fungizona 1% p/v (HyClone), aminoácidos no esenciales 1X (HyClone).

Determinación de la función de catepsina L mediante el uso de un inhibidor o un silenciador específico

Para determinar la función de catepsina L, se propuso en una primera instancia, inhibir la actividad de catepsina L, de este modo, las células se incubaron en presencia de Inhibidor I de Catepsina L 25 uM (Calbiochem), como control se utilizó un volumen de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) equivalente al volumen de inhibidor empleado.

Otra manera de determinar la función de catepsina L, es el uso de un silenciador del mensajero de catepsina L. De este modo, la línea celular COLO320 se transfectó con un siRNA diseñado previamente en nuestro laboratorio: siRNA1 sentido 5'-AAGAUGAUUGAACUGCACAUU-3', el cual es específico para el mensajero de catepsina L, como control negativo se utilizó un siRNA inespecífico (Invitrogen). Las células se cultivaron hasta alcanzar un 60 a 80 % de confluencia, posteriormente se tripsinizaron, y luego se contaron en una cámara de Neubauer (Hirschmann) y posteriormente se centrifugaron a 300g hasta formar un pellet de un millón de células. Al pellet de células se le adicionó un buffer específico de suspensión (buffer R) y el siRNA a una concentración de 25nM, hasta completar un volumen de 10µL. Posteriormente se llevó a cabo la transfección, mediante el uso de un equipo de electroporación “NEON transfection system (invitrogen)”, donde se aplicó un voltaje específico recomendado por el proveedor, el cual fue de 1,450 volts y 2 pulsos de 20 ms. Posterior a la transfección, a las células se le adicionó medio de cultivo fresco y se dejaron durante 24 horas en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂; luego se procedió a realizar el estrés metabólico respectivo.

Determinación la actividad de catepsina L usando un sustrato fluorogénico

Para realizar el ensayo de actividad *in vitro* de catepsina L, se utilizaron 20 µg de proteínas, a las cuales se les añadió buffer de lisis RIPA, hasta completar un volumen de 27 µL, mientras que para los blancos sólo se utilizó buffer de lisis RIPA sin proteínas. Posteriormente, se añadieron 307 µL de tampón AB-Tritón (tampón fosfato 0.05 M, pH 5.5; EDTA 2 mM, pH 6.0; Tritón X-100 al 0.05% v/v) y las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego, se añadieron 327 µL de tampón AB-DTT (tampón fosfato 50 mM, pH 5.5; DTT 10 mM) y sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA a una concentración final de 15 µM. Los tubos se incubaron a 37° C durante 90 minutos y una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 334 µL de reactivo de detención (Monocloroacetato 0.1 mM; Acetato de Sodio 30 mM, pH 5.5; Ácido Acético 70 mM pH 4.3). Para cuantificar la actividad, se midió la emisión de fluorescencia a una longitud de onda en el rango de 430 a 450nm, con una longitud de onda de excitación de 360nm, en espectrofotómetro de fluorescencia Shimadzu RF-5301PC.

Localización de Catepsina L, alfa-tubulina y LAMP-1, mediante la técnica de Inmunocitoquímica

Se realizó un cultivo de células COLO320 o SW620 en placas de 24 pocillos (Orange Scientific) sobre cubreobjetos de vidrio, tratados previamente con poli-L-lisina 0,01% p/v (Sigma). Las células se sometieron a estrés metabólico, utilizando medio sin suero o sin glucosa según la metodología establecida en el punto anterior. Dependiendo del experimento realizado, en algunas condiciones también se utilizó el inhibidor I de catepsina L a una concentración de 25µM. Posterior al tratamiento, las células adheridas al cubreobjeto se fijaron con paraformaldehido 4% p/v en PBS 1X, durante 10 minutos a 37°C. Tras lavar las células una vez rápido y tres veces durante 8 minutos con PBS 1X a temperatura ambiente, las células se permeabilizaron con

Tritón X-100 0,5% v/v (Sigma) en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se lavaron una vez rápido y tres veces durante 8 minutos. Luego, los sitios inespecíficos se bloquearon con una solución de albúmina de suero de bovino 1% v/v (BSA; Sigma) en PBS 1X durante 1 hora, tras lo cual las células se incubaron en cámara húmeda con cualquiera de los dos anticuerpo monoclonales de ratón anti α -tubulina diluido 1:350 (DM1A, Santa Cruz) o el anticuerpo anti LAMP-1 1/200 (E-5, Santa Cruz), que se incubaron en conjunto con el anticuerpo policlonal de cabra anti porción c-terminal de catepsina L 1/200 (Santa Cruz, C18), ambos en una solución de BSA 1% v/v diluida en PBS 1X a pH 7,4 toda la noche a 4°C. Luego, las células se lavaron una vez rápido y tres veces durante 8 minutos y se incubaron con anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) y anti-IgG de conejo conjugados a isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC; Sigma), ambos diluidos 1:250 junto a dihidrocloruro de 4',6-diamidino-2-fenilindol 100 ng/mL (DAPI, Invitrogen), en solución de BSA 1% en PBS 1X durante 2 horas, en cámara húmeda y oscuridad. Tras lavar dos veces más por 8 minutos, las células se montaron en portaobjetos de vidrio utilizando medio de montaje para fluorescencia DAKO (DakoCytomation) y se conservaron a 4°C protegidos de la luz. La observación de las células se llevó a cabo en microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600) y/o con microscopio Confocal LSM400, Zeiss del Centro de Microscopía Avanzada (CMA).

Obtención de lisados de proteínas totales mediante buffer RIPA

Las células cultivadas en placas de 100x20mm se lavaron con PBS 1X (NaCl 137mM, Merck; KCL 2,7mM, Merck; Na₂HPO₄*2H₂O 4,3mM, Merck; KH₂PO₄*2H₂O 1,4mM, Merck, ajustando el pH a 7,4); posteriormente en frío (en hielo) se agregó 100 μ L de buffer RIPA (50mM Tris-HCL, pH 7,4, 1% NP-40, 0,5% deoxycolato, 0,1%SDS, 150mM NaCl, 2mM EDTA) con cóctel de inhibidores de proteasas (roche), luego de 30 minutos se procedió a raspar la placa con un raspador de células.

Posteriormente el lisado se pasó por una jeringa de tuberculina de 1mL, para romper el ADN genómico.

Electroforesis en condiciones denaturantes e inmunodetección mediante Western Blot

El análisis electroforético de proteínas se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). La muestra a analizar se cuantificó por el método de Bradford (1976) utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad), mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm (Bio-Rad, modelo SmartSpec Plus). El volumen determinado a tomar para la cantidad de proteína deseada, se mezcló con una tercera parte de tampón de carga reductor 4X (Tris-HCl pH 6,8, 200 mM, US Biologicals; β -mercaptoetanol 40% v/v, Merck; SDS 8% p/v, Calbiochem; azul de bromofenol 0,4% p/v, Bio-Rad; glicerol 40 % v/v, Merck), se calentó a 100 °C durante 5 minutos y tras ello se centrifugó a 10.000 g durante 5 minutos. Cada muestra se sembró en un gel de poliacrilamida/SDS de 0,75 mm de grosor, compuesto de un gel concentrador (acrilamida, Merck: bisacrilamida, Sigma, en proporción 29:1, 5% p/v; Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 1% p/v; persulfato de amonio, PSA, 1% p/v, Sigma; N,N,N',N'-tetrametiletilendimina TEMED 0,04% v/v, Bio-Rad) y un gel separador (acrilamida: bisacrilamida 29:1 al 12% p/v; Tris 0,375 M pH 8,8; SDS 1% p/v; PSA 1% p/v; TEMED 0,04% v/v). La separación de proteínas se realizó en cámara de electroforesis a voltaje constante (120V) en tampón de corrida (Tris-HCl, 25 mM; glicina 250 mM; y SDS, 0.1% p/v) frente a marcador de pesos moleculares preteñido (Fermentas).

La verificación de la presencia de Catepsina L y de los marcadores apoptóticos en los lisados totales de células se realizó por inmunodetección mediante Western blot. Previamente, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa según el método descrito por Towbin y col. (1979). Para la confección del cassette de transferencia, se dispuso de una membrana de nitrocelulosa (Thermo

Scientific), la cual se ubicó en contacto directo con el gel de poliacrilamida que contenía las proteínas. Tanto la membrana de nitrocelulosa como el gel se cubrieron directamente con papel filtro N° 3 (Whatman), y se utilizaron esponjas en la parte exterior. El sistema se cerró e instaló en la cámara de transferencia (Bio-Rad) con el gel hacia el polo negativo (cátodo) y la membrana hacia el polo positivo (ánodo). La transferencia se realizó a intensidad eléctrica constante (250 mA) en tampón de transferencia (Tris-HCl, 48 mM; glicina, 39 mM; metanol 20% v/v). La eficiencia del proceso se verificó mediante tinción de la membrana con solución de Rojo Ponceau (ponceu 0,1% p/v; ácido acético al 5% v/v) decolorado con agua destilada hasta visualización de las bandas de proteínas. La membrana se lavó con solución de TBS-Tween (Tween 20 0,05% en TBS 1X) hasta decoloración total y luego, se bloqueó con reactivo de bloqueo (suspensión de leche descremada) 5% p/v en PBS-Tween durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Tras un lavado de 15 minutos y tres de 5 minutos con TBS-Tween, la membrana se incubó en cámara fría, bajo agitación durante toda la noche, con 10 mL de anticuerpo primario en TBS-Tween, ya sea IgG de cabra: anti catepsina L (1:1000, Santa Cruz Biotechnology SC-6498) o anti Beta Actina (1/800, SC-1616) o IgG de ratón: anti PARP-1 (1/500, Santa Cruz Biotechnology) o anti Tubulina (1/800, DM1A Santa Cruz) o IgG de conejo: caspasa 3 clivada (1/250). Posteriormente, se realizó un lavado de 15 minutos y tres de 5 minutos con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo, cabra o ratón, dependiendo del anticuerpo primario usado, conjugado con la peroxidasa de rábano, 1:10000, en solución de PBS-Tween. Finalmente, la membrana se lavó una vez durante 15 minutos y cuatro veces durante 5 minutos. Para la detección, la membrana se incubó durante 5 minutos con una mezcla en partes iguales de los reactivos 1 (luminol) y 2 (peróxido de hidrógeno) de un kit potenciador de la quimioluminiscencia (GE Healthcare). Luego, la membrana se introdujo en un cassette de exposición (Amersham) cubierta con una mica transparente y sobre ella se expuso una placa fotográfica (Kodak) por el tiempo necesario para hacer evidente la presencia de proteína.

Inmunodetección de marcadores de autofagia

Para detectar las vacuolas autofágicas, se procedió a tratar las células con un inhibidor del flujo autofágico bafilomicina (20nM), antes de realizar el estrés metabólico respectivo. Posteriormente, se realizó la lisis celular con buffer RIPA, y el mismo día se realizó el western blot, utilizando el anticuerpo anti LC3 (Novus).

Determinación de la integridad del ADN genómico mediante la técnica del cometa

Una vez realizado el cultivo celular en medio RPMI para línea celular de carcinoma COLO320, se procedió en primer lugar a retirar el medio de cultivo, posteriormente se realizaron dos lavados con PBS1X (NaCl 137mM, Merck; KCL 2,7mM, Merck; Na₂HPO₄*2H₂O 4,3mM, Merck; KH₂PO₄*2H₂O 1,4mM, Merck, ajustando el pH a 7,4), luego se adicionó 600 µL de tripsina 0,25% p/v (HyClone), las células se resuspendieron y se adicionaron a un tubo eppendorf, y se centrifugaron a 300g, hasta formar un pellet. Posteriormente el pellet se resuspendió en un volumen adecuado de PBS estéril (1X) hasta lograr una concentración de un millón de células por mL.

Por otra parte, los portaobjetos (cat. N°7105, Sail Brand) y cubreobjetos (24x50 mm), se lavaron con H₂O(d) y se desengrasaron con etanol 70% v/v. Una vez limpios y secos, a los portaobjetos se les agregó 200 µL de agarosa NMP (agarosa de punto fusión normal, CSL-AG100 Cleaver Scientific) al 1%, procurando cubrir una parte del esmerilado, para mejorar la adherencia. Antes de que enfríe, se dejó caer el cubreobjeto sobre el gel. Luego, en una cámara de hielo, se dejó enfriar a 4°C por 5 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el gel solidificado se retiró cuidadosamente del cubreobjeto, deslizándolo hacia uno de los lados. Luego en un tubo eppendorf 0,5 mL se agregó una alícuota de 10 µL de la suspensión de células en conjunto con 75 µL de agarosa LMP (agarosa de bajo punto de fusión, Promega) al 0,5%, luego se

homogenizó, y rápidamente se dejó la muestra sobre el primer gel, teniendo especial cuidado en que la agarosa no estuviera muy caliente (debe estar máximo a 37°C). Antes de que enfriara, se dejó caer el cubreobjeto, y luego las muestras se llevaron a 4°C durante 15 minutos. Luego de solidificado el gel, se retiró cuidadosamente el cubreobjeto, deslizándolo. Luego se agregó 100 µL de agarosa NMP al 0,5%, y se dejó caer el cubreobjeto, posteriormente se llevó a 4°C por 10 minutos. Una vez solidificado el gel, se retiró el cubreobjeto, deslizándolo hacia uno de los lados. Luego los portaobjetos se llevaron a una caja Coplin vertical y se le agregó una solución de lisis (0,25 M NaCl, 10 mM EDTA, 10M Tris, ajustado a pH 10, y 1% Tritón X-100), manteniendo los geles sumergidos hasta antes del esmerilado. Se dejaron en oscuridad a 4°C en cámara húmeda, durante 24 horas. Luego se retiraron los portaobjetos de la solución de lisis, teniendo cuidado en que no se despeguen los geles. Posteriormente éstos se llevaron a una cámara de electroforesis horizontal, y luego los cubreobjetos se sumergieron en solución de electroforesis (0,3N NaOH, 1 mM EDTA, pH≥13), y se dejaron correr por 20 minutos a 25V. Una vez terminada la electroforesis, se retiraron cuidadosamente los portaobjetos, se secaron los vidrios y se realizaron entre 3 a 5 lavados en solución de neutralización (0,4 M Tris, pH 7,5) a 4°C durante 5 minutos. Una vez terminados los lavados, se secaron los vidrios, y los geles se tiñeron con 15 µL de solución GelRed 3X durante 10 a 20 minutos. Finalmente la muestra se observó bajo microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600).

Análisis de los gráficos de cometas

A partir de tres ensayos diferentes, se tomaron como referencia aproximadamente 50 cometas en cada condición realizada, a los cuales se le midió la cola de degradación (Tail Moment Length) (**figura 5**) mediante un software llamado Comet Assay IV;; ésta distancia es representativa del grado de degradación del ADN.

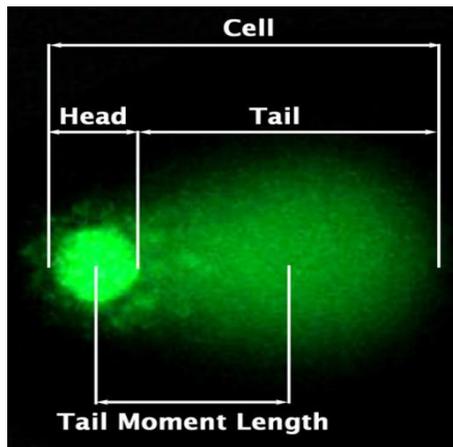


Figura 5: Fotografía de núcleo celular sometido a un campo eléctrico (cometa). El cometa obtenido, se analizó mediante el software Comet Assay IV, que puede medir la distancia entre la cabeza del cometa (head) hasta la cola (tail), ésta es representativa del grado de degradación del ADN, y por lo tanto del grado de apoptosis celular.

Determinación de la integridad del ADN genómico mediante un análisis en un gel de agarosa.

Las células la línea celular COLO320 se sometió a estrés metabólico tanto con medio sin suero como sin glucosa durante distintos tiempos, como control se utilizó DMSO. Por otra parte, las células se trataron con el inhibidor I de catepsina L a una concentración de 100µM, posteriormente el ADN genómico se extrajo usando un kit específico (Nucleo Spin Blood) y las muestras se sembraron en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se realizó una electroforesis a 40V durante 40 a 60 minutos; luego el ADN genómico se tiñó con 1.5% v/v con bromuro de etidio 0.5 µg/mL. La visualización de las bandas de ADN se realizó con un transiluminador UV a una longitud de onda de 340nm. Como marcadores de peso molecular se utilizó el marcador Gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Thermoscientific).

Determinación de la actividad de catepsina L, mediante la técnica de zymograma.

El ensayo de zimograma está basado en la visualización de actividad enzimática en un gel de poliacrilamida polimerizado con un sustrato como la gelatina o caseína. La

actividad enzimática de catepsina L se determinó mediante este ensayo según la metodología descrita por Vafa y Nishioka (1995). Las muestras de proteínas en concentraciones previamente estandarizadas se suspendieron en tampón de carga 4x no denaturante (Tris-HCl 0.25 M (pH 6.8), glicerol 30% (v/v), SDS 8% (p/v) y 0.02% de Azul de Bromofenol). Luego, cada muestra se sembró en un gel de poliacrilamida/SDS de 0,75 mm de grosor, compuesto de un gel concentrador (acrilamida, Merck: bisacrilamida, Sigma, en proporción 29:1, 5% p/v; Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 1% p/v; persulfato de amonio, PSA, 1% p/v, Sigma; N,N,N',N'-tetrametiletilendimina TEMED 0,04% v/v, Bio-Rad) y un gel separador (acrilamida: bisacrilamida 29:1 al 12% p/v; Tris 0,375 M pH 8,8; SDS 1% p/v; PSA 1% p/v; TEMED 0,04% v/v y gelatina 0.2% (p/v)). La separación de proteínas se realizó en cámara de electroforesis a voltaje constante (120V) en tampón de corrida (Tris-HCl, 25 mM; glicina 250 mM, Promega; y SDS, 0.1% p/v) frente a marcador de pesos moleculares preteñido (Fermentas). Posteriormente el gel se lavó durante una hora con una solución de 2,5% (v/v) de detergente no-iónico Triton x-100, el cual permite remover el detergente SDS y así renaturalizar las proteínas. Posteriormente, el gel con las proteínas renaturalizadas, se incubó en un buffer de activación (Acetato de sodio 0.1 M pH 5.5, EDTA 1mM, y DTT (ditiotreitól) 2mM) durante 18 horas. Luego, al otro día, el gel se tiñó con solución de amidoblack 0.2 (p/v) en 400 ml de metanol, 70 ml de ácido acético y 530 ml durante una hora, y luego se destiñó en el mismo solvente con lavados sucesivos hasta evidenciar las bandas de actividad gelatinolítica.

Ensayo de viabilidad celular (MTT)

Este método desarrollado por Mossman (Mossman, 1983) se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolium (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro. Tras la captación del MTT,

las células se rompen y se solubiliza el formazán con DMSO. La absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables. Para llevar a cabo este ensayo se preparó una solución Stock 12mM de MTT (Sigma) disolviendo 5mg de reactivo MTT en 1 mL de PBS estéril en un tubo ámbar de 2mL (PGC Scientifics), se mezcló bien mediante vortex y se almacenó a 4°C. Posteriormente 3000 a 5000 células SW620 o COLO320 se cultivaron en placa de 96 pocillos (Falcon), en el caso del silenciamiento, las células se transfectaron previo al conteo. Luego se cultivaron 24 horas para su recuperación, y posteriormente se realizó el estrés con medio sin suero o sin glucosa por 24 horas, adicionándole inhibidor de catepsina L, dependiendo del experimento. Posteriormente, se les removió el medio de cultivo y se reemplazó por el medio de cultivo DMEM o RPMI fresco sin rojo fenol (Santa Cruz), y se adicionó medio fresco con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) a una concentración de 1 mM por pocillo. Luego de 4 horas, los cristales de formazan formados se disolvieron con DMSO, y la absorbancia se midió a 540-570nm, en un espectrofotómetro (CM-700D, cónica).

Determinación de la expresión del mensajero de catepsina L, B y D

Extracción de ARN total

En una primera instancia, se realizó la extracción de ARN total desde células COLO320 sometidas a estrés metabólico de acuerdo a la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (1987), basada en separar las moléculas de ARN en un sistema de fenol y precipitación con alcohol. Para la lisis directa de las células, se utilizó 1 mL del reactivo TRIzol (Ambion) por placa de cultivo (BD Falcon). Las células se resuspendieron vigorosamente, y se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1,6 mL (Neptune) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, permitiendo la disociación del complejo nucleoproteico. Tras ello, las

células se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, descartándose el sedimento. Al sobrenadante obtenido, se le agregó 200 µL de cloroformo (Merck) y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. El lisado total obtenido se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior correspondiente a ARN, se precipitó con 500 µL de isopropanol (Merck) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones descritas. El sedimento obtenido correspondiente a ARN precipitado, se lavó con 1 mL de etanol 75% v/v (Merck) agitando vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos. Luego, el ARN obtenido se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua esterilizada, tratada previamente con dietilpicrocarbonato 0,1% (DEPC; Winkler). Finalmente el ARN resuspendido se calentó a 60 °C durante 10 minutos para contribuir a su solubilización. El ARN total se cuantificó por espectrofotometría (Bio-Rad, modelo SmartSpec Plus) a 260 nm y 280 nm y se verificó su integridad analizando 200ng de ARN junto a un volumen de tampón de carga (Fermentas: Tris-HCl pH 7.6 10 mM, azul de bromofenol 0.03%, xylene cyanol FF 0.03%, glicerol 60%, EDTA 60 mM) correspondiente a la sexta parte del volumen total de carga en gel de agarosa 1% p/v (Sigma), en presencia de bromuro de etidio 0,5 µg/mL (Apex) y tampón TAE 1X (Winkler; Tris 4,84 g/L, ácido acético glacial 0,11% v/v y EDTA 0,37 g/L, pH 8,4), el cual se utilizó también como tampón de corrida. La separación de ARN se realizó en cámara electroforética (Labnet International, Inc., modelo GEL XL ENDURO) a diferencia de potencial constante de 50 V. Las bandas de ARN se visualizaron en un transiluminador ultravioleta (UV) a 340 nm.

Obtención de ADN copia a partir del ARN

La obtención de ADNc se realizó mediante la técnica de transcripción reversa (RT). Para ello, se utilizó un sistema de transcripción reversa Improm-II (Promega). Del ARN obtenido previamente se tomaron 5 µg y se mezclaron en tubos de PCR de

0,20 mL (Sorenson Bioscience, Inc) con 0,5 µg de oligo (dT) (Promega) y agua libre de nucleasas (IDT Technologies, Inc.), alcanzando un volumen final de 5 µL. Posteriormente, la mezcla se incubó en un termociclador (MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler, Modelo MG25+) a una temperatura de 70 °C durante 5 minutos y luego a 4 °C durante 5 minutos para linealizar el ARN (mezcla de linealización). La mezcla de reacción de RT se preparó en tubos de PCR con: tampón de reacción Improm-II 1X (Promega), MgCl₂ 4,5 mM (Promega), dNTPs 0,5 mM (Promega), inhibidor de RNasa 20 U (Promega), 1 µL de transcriptasa reversa (Promega) y agua libre de nucleasas, alcanzando un volumen final de 15 µL. A la mezcla de reacción se agregó 5 µL de la mezcla de linealización, y se sometió a un ciclo de PCR de 25 °C durante 5 minutos, 42 °C durante 60 minutos, 70 °C durante 15 minutos, en un termociclador (MyGene™ Series Peltier Thermal Cycler, Modelo MG25+). El ADNc obtenido se cuantificó a 260 nm por espectrofotometría (Bio-Rad, modelo SmartSpec Plus).

Amplificación de ADN copia mediante PCR.

Para la amplificación de un producto de PCR a partir de ADNc, se realizó una mezcla de reacción compuesta de: 12.5 µL de Master Mix (ThermoScientific, 0.05 U/µL Taq DNA polimerasa, tampón de reacción, MgCl₂ 4 mM, 0.4 mM de cada dNTP), 2 µL de cDNA, 1 µL de cada partidor (detallados en la **tabla 1**) y agua libre de nucleasas, en un volumen final de 25 µL. Luego, esta mezcla se homogenizó y se incubó en un termociclador (Tempra), utilizando el programa detallado en la **tabla 2**. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1.5% v/v con bromuro de etidio 0.5 µg/mL. La visualización de las bandas de ADN se realizó con un transiluminador UV a una longitud de onda de 340 nm. Como marcadores de peso molecular se utilizó el marcador Gene Ruler™ 100 pb DNA Ladder (Thermoscientific).

Tabla 1: Partidores utilizados y su secuencia. Se usaron partidores para catepsina B, D y L. Se utilizó como control de carga los partidores de Beta Actina. Se detallan tanto las secuencias sentido como antisentido de cada oligo.

PCR	Partidor orientación sentido	Partidor orientación antisentido	Tamaño (pb)
Catepsina L	5'-ctgtggattggagaaagaaag-3' (Tm = 53.5° C)	5'-tagccaacaactagaacaccatg-3' (Tm = 54.9)	419
Catepsina B	5'-ggggacggctgtaatggt-3' (Tm=57,4)	5'-gaagccattgtcaccacag-3' (Tm=57,5)	118
Catepsina D	5'-cgcagtgttcacagtcgt-3' (Tm=55,7)	5'-gagccgtagtgatgtcaa-3' (Tm=55,9)	165
Beta Actina	5'-aggcccagagcaagagag-3'	5'-ggggtgtgaaggctcaaa-3'	220

Tabla 2: Programa utilizado para cada PCR. Debido a que cada par de partidores tenían distinta temperatura de alineamiento (TM), se utilizaron distintos programas para catepsina B, D, L y Beta Actina. Se detallan las temperaturas de denaturación, alineamiento y extensión.

N° Ciclos	Etapas	Catepsina L	Catepsina B	Catepsina D	B-actina
1	Denaturación inicial	95° C / 5 min 95			
30	Denaturación	95° C / 1 min 95			
	Alineamiento	59° C / 1 min 95	58° C / 1 min 95	56° C / 1 min 95	59° C / 1 min 95
	Extensión	72° C / 1 min 95			
1	Extensión Final	72° C / 5 min 95			

Análisis densitométrico y estadístico

Los resultados que requerían ser analizados por densitometría, se analizaron mediante el software ImageJ. Por otra parte, los resultados correspondientes a tres o más experimentos fueron representados con su desviación estándar, y sometidos a un análisis de t-student, el cual se usó para comparar dos grupos. En la mayor parte de los experimentos se comparó en forma individual cada tratamiento con su control específico, y se determinó si existían o no diferencias significativas. El valor $P < 0,05$ fue utilizado para determinar si existían diferencias significativas. El programa utilizado para graficar y realizar el análisis estadístico fue GraphPad Prism 6.



RESULTADOS

Efecto del estrés metabólico en la localización de catepsina L

Para efectuar este estudio, se utilizaron las líneas celulares COLO320 y SW620, ambas de adenocarcinoma colorectal. Para los ensayos del estrés metabólico, las líneas celulares mencionadas, se cultivaron con medio desprovisto de nutrientes y factores de crecimiento (medio sin suero) o con medio sin glucosa por un tiempo específico. Para determinar si la morfología celular se veía afectada con el estrés realizado, se efectuó una inmunocitoquímica donde se detectaron tanto catepsina L como alfa tubulina, una proteína del citoesqueleto. Los resultados obtenidos en la línea celular COLO320, sugieren que la localización de catepsina L se ve afectada con el estrés metabólico, lo cual queda en evidencia principalmente a las 24 horas (**figura 6a**). Por otra parte, en la línea células SW620, la localización de catepsina L no se vio alterada con ninguno de los dos estrés metabólicos realizados (**figura 6b**).

Para realizar un análisis más exhaustivo, se observó mediante microscopia confocal la línea celular COLO320 sometida a un estrés metabólico por 24 horas. Los resultados obtenidos demuestran que en una situación control, catepsina L se encuentra tanto a nivel nuclear como a nivel del citoesqueleto, donde colocaliza con alfa tubulina. Esta situación cambia en el estrés metabólico, donde se observa un aumento de catepsina L citosólica (**figura 7a**). Por otra parte, al realizar una reconstrucción 3D de las imágenes inmunocitoquímicas de células cultivadas sin glucosa, se observa un cambio morfológico, donde las células se ven más alargadas, al compararla con la condición control, en cambio en la situación sin suero, se observa una morfología más redondeada. Por otra parte, para determinar que formas proteicas de catepsina L se expresan principalmente a nivel citosólico en las condiciones de estudio; se realizó un fraccionamiento subcelular, con el objeto de aislar el citosol de organelos membranosos y del núcleo; para posteriormente analizar la expresión de catepsina L mediante inmunodetección. Los resultados

obtenidos (**figura 7b**), dan a conocer que tanto en la situación control como en la situación de estrés, se observan varias bandas correspondientes a catepsina L. Cabe destacar que en la condición sin glucosa, se observa el aumento de expresión principalmente de la forma simple de catepsina L. Por otra parte, extractos celulares totales se utilizaron para determinar la actividad de las distintas formas de catepsina L mediante un análisis de actividad por zimograma (**figura 7c**). Los resultados obtenidos demuestran que hay una disminución de la actividad de las distintas formas de catepsina L en ambas condiciones de estrés metabólico.



Figura 6

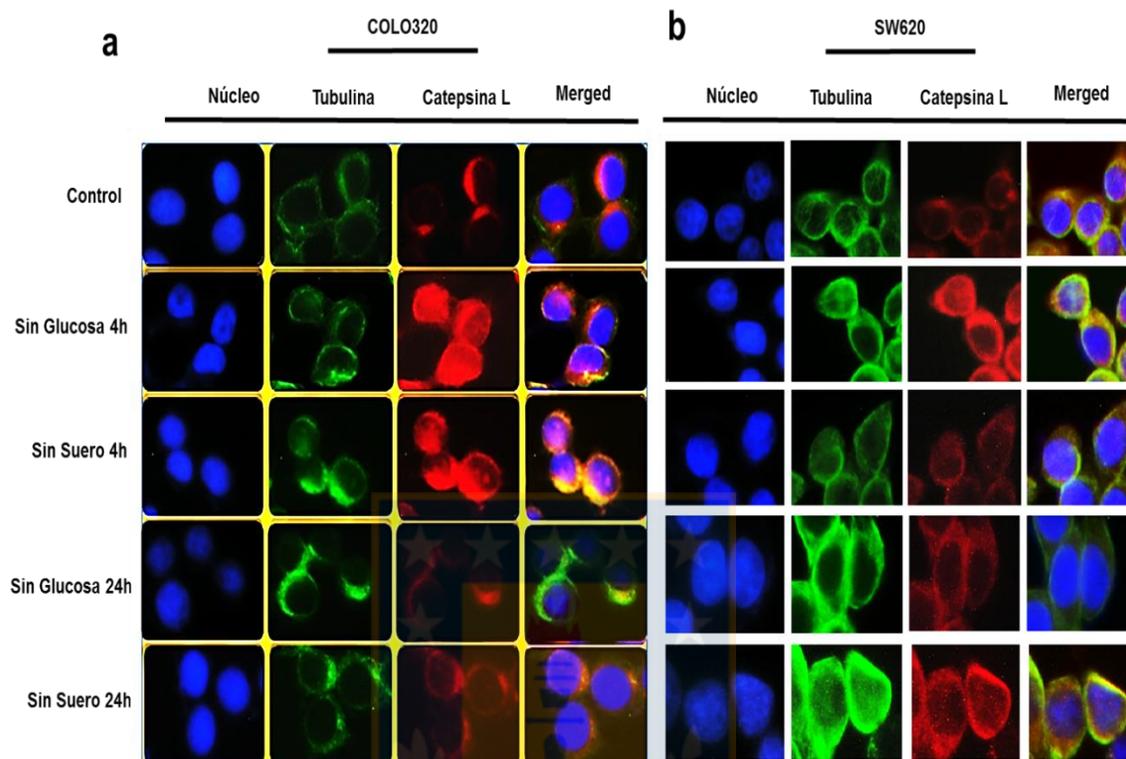


Figura 6: Efecto del estrés metabólico en la localización de catepsina L. Las células COLO320 (a) y SW620 (b) se estresaron con medio libre de glucosa (S/G) y con medio libre de suero (S/S) durante 4 y 24 horas. Para determinar la localización celular, se realizó una inmunocitoquímica donde catepsina L se detectó mediante un anticuerpo específico (rojo), el ADN se tiñó con DAPI (azul) y el citoesqueleto se visualizó con un anticuerpo anti alfa tubulina (verde). La última columna muestra la fusión de todos los campos (merge). Los análisis se realizaron por microscopia de epifluorescencia.

Figura 7

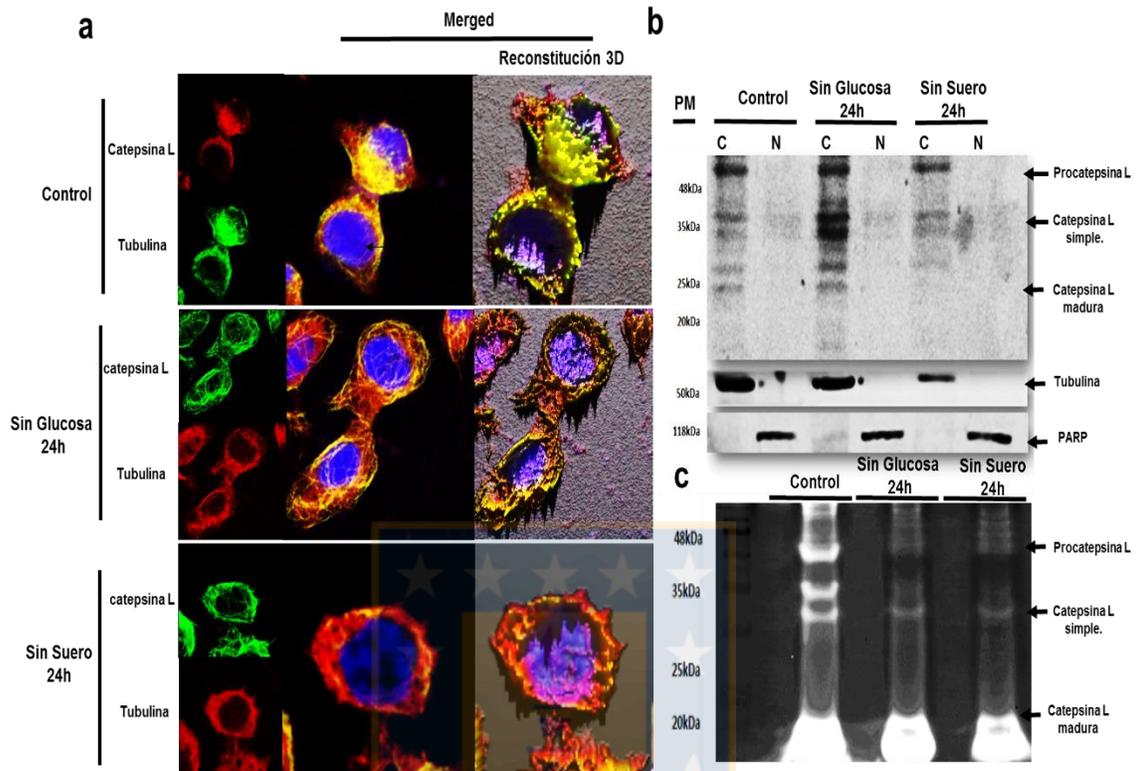


Figura 7: Efecto del estrés metabólico en la localización de catepsina L. Las células COLO320 se estresaron con medio libre de glucosa (S/G) y con medio libre de suero (S/S) durante 24 horas. Para determinar la localización celular se realizó una inmunocitoquímica (**a**) donde catepsina L se detectó mediante un anticuerpo específico (rojo), el ADN se tiñó con DAPI (azul) y el citoesqueleto se visualizó con un anticuerpo anti alfa tubulina (verde). Las dos últimas columnas muestran la fusión de todos los campos (merge), imagen que se puede visualizar tanto en 2D como en 3D. Los análisis se realizaron por microscopía confocal. Las células también se lisaron y posteriormente se realizó un fraccionamiento celular de citosol (C) y núcleo (N) (**b**). Luego se determinó la expresión de catepsina L por western blot utilizando un anticuerpo específico; como marcador citosólico se utilizó alfa tubulina y como marcador nuclear PARP. Los extractos totales de las células tratadas, también se utilizaron para realizar un análisis de la actividad de catepsina L mediante un zimograma (**c**).

Efecto del estrés metabólico en la localización lisosomal de catepsina L

Para determinar si los cambios en la localización de catepsina L, observados frente a un estrés metabólico, se asocian a su distribución lisosomal, se propuso inmunolocalizar también el lisosoma. El marcador lisosomal utilizado, fue la proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP-1), la cual se detectó en conjunto con catepsina L. Los resultados obtenidos, en la línea celular COLO320, muestran que en una situación control o sin estrés, hay una alta expresión de catepsina L, la cual comienza a disminuir cuando las células son sometidas a estrés metabólico (**figura 8a**). Por otro lado, en cuanto a la localización de catepsina L en una situación control, esta se encuentra colocalizando con LAMP-1 principalmente en la periferia celular; también se observa a nivel citoplasmático donde se distribuye uniformemente e incluso se detecta en el núcleo (**figura 8b**), resultado que concuerda con lo obtenido anteriormente en la **figura 7**. Por otra parte, en la situación de estrés con medio sin glucosa, se observa un cambio morfológico, ya que las células se aprecian más alargadas. En cuanto a catepsina L, esta pierde en gran medida su localización nuclear y citoplasmática; concentrándose de esta forma en la periferia celular, donde colocaliza con LAMP-1.

En el caso de la línea celular COLO320 sometida a estrés sin suero por 24 horas, la morfología es principalmente redonda, por lo que, es similar a la situación control. También se observó una clara disminución de la expresión de catepsina L, la cual se encuentra esencialmente en los lisosomas, y no fuera de estos. Estos resultados, se compararon con los obtenidos al utilizar una sonda de marcaje de vesículas ácidas (lysotracker), el resultado obtenido muestra que independiente del estrés metabólico realizado, las células presentan un aumento de vesículas ácidas (**figura 8c**).

Por otra parte, también se utilizó la línea celular SW620 para evaluar la distribución de catepsina L con respecto al lisosoma. Para ello, la línea celular en estudio, se

sometió a estrés con medio sin suero durante 24 horas, y posteriormente se inmunodetectó LAMP-1 y catepsina L. El resultado obtenido, muestra en una primera instancia que la localización de catepsina L es principalmente a nivel lisosomal, ya que se encuentra colocalizando con LAMP-1, no hay una deslocalización de esta, tanto en la condición control como en la de estrés. Por otra parte, la morfología celular también es similar a la condición sin estrés o control. En cuanto a la expresión de catepsina L, no se observaron diferencias entre la condición control, con la condición sometida a estrés con medio sin suero (**figura 9**).



Figura 8

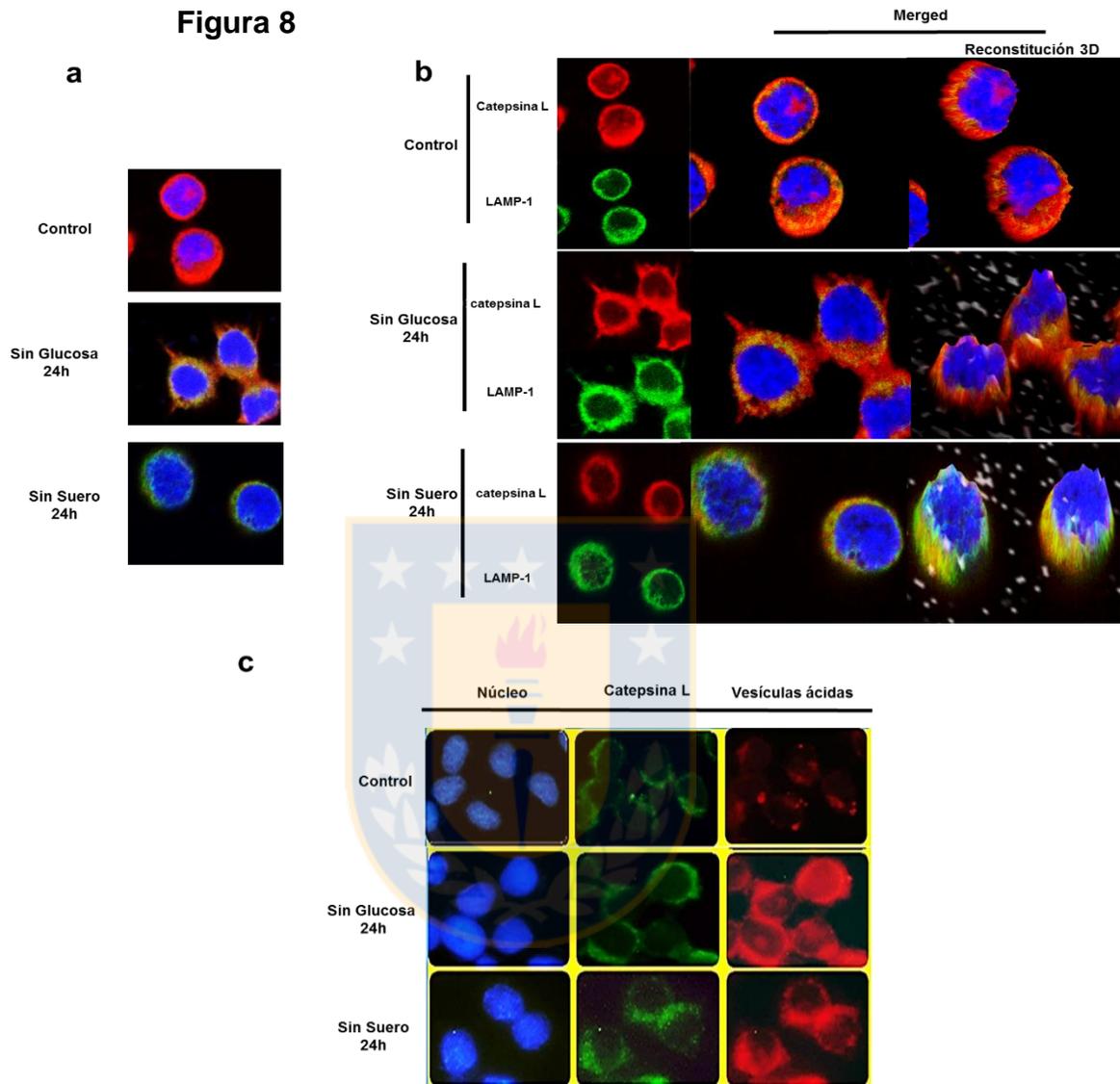


Figura 8: Efecto del estrés metabólico en la localización lisosomal de catepsina L en la línea celular COLO320. Las células COLO320 se estresaron con medio libre de glucosa (S/G) y con medio libre de suero (S/S) durante 24 horas. Para determinar la localización lisosomal se realizó una inmunocitoquímica (**a y b**) donde catepsina L se detectó mediante un anticuerpo específico (rojo), el ADN se tiñó con DAPI (azul) y el lisosoma se visualizó con un anticuerpo anti LAMP-1 (verde). Las dos últimas columnas muestran la fusión de todos los campos (merge), imagen que se puede visualizar tanto en 2D como en 3D (**b**). Los análisis se realizaron por microscopía confocal. En **a**, se pueden observar las fotografías de los merge obtenidos directamente del microscopio, lo que permite realizar una comparación de la expresión de los marcadores utilizados. Por otra parte, en **c**, para complementar lo obtenido, se realizó una inmunocitoquímica donde el lisosoma se visualizó mediante una tinción específica (lysotracker, rojo), y catepsina L se detectó mediante un anticuerpo específico (verde).

Figura 9

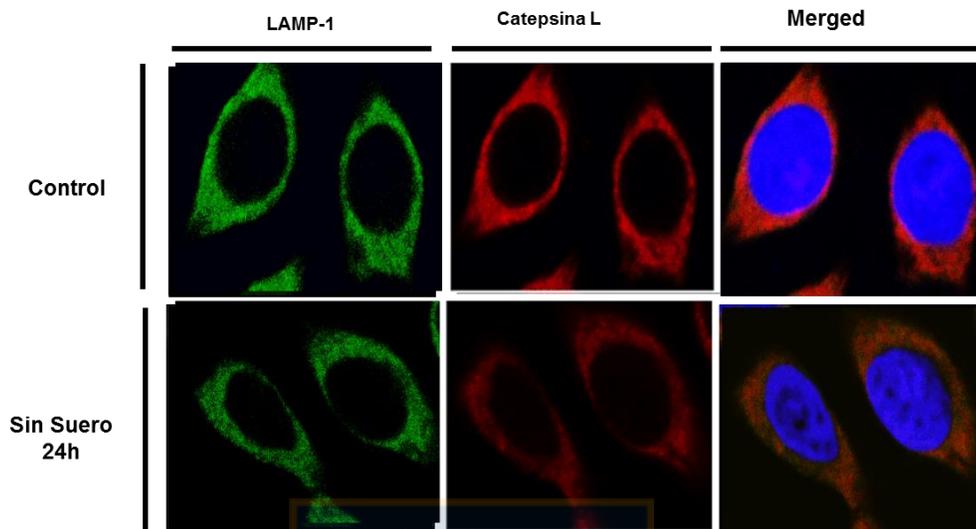


Figura 9: Efecto del estrés metabólico en la localización lisosomal de catepsina L en la línea celular SW620. Las células SW620 se estresaron con medio libre de suero (S/S) durante 24 horas. Para determinar la localización lisosomal se realizó una inmunocitoquímica donde catepsina L se detectó mediante un anticuerpo específico (rojo), el ADN se tiñó con DAPI (azul) y el lisosoma se visualizó con un anticuerpo anti LAMP-1 (verde). La última columna muestra la fusión de todos los campos (merge).

Efecto del estrés metabólico en la actividad de catepsina L

Para determinar la función de catepsina L durante el estrés metabólico se utilizó un inhibidor específico de esta, el inhibidor I de catepsina L. De esta forma, en una primera instancia, se evaluó la concentración efectiva de este inhibidor competitivo. Para ello, se utilizó un sustrato específico de catepsina L, el cual permite cuantificar la actividad de la proteasa. El resultado obtenido, muestra que la concentración de 25 μ M del inhibidor, es capaz de inhibir aproximadamente el 80% de la actividad de catepsina L, siendo esta la concentración que se utilizó en ensayos posteriores (**figura 10a**). A la hora de evaluar el efecto del estrés metabólico en la actividad de catepsina L, se procedió a utilizar el mismo sustrato específico. Los resultados obtenidos en la línea celular COLO320 (**figura 10b**), muestran que el estrés sin glucosa afecta significativamente la actividad de catepsina L, por otra parte, el tratamiento con medio sin suero también la afecta, pero no de manera significativa. Cabe destacar, que independiente del estrés metabólico realizado, el aumento del pH lisosomal influye en la actividad de catepsina L, esto quedó en evidencia al utilizar un inhibidor de la bomba de protones como bafilomicina y luego realizar el ensayo de actividad específica (**figura 10b**).

Para determinar si catepsina L también participa en la modulación de su expresión, las líneas celulares COLO320 y SW620 se trataron con el inhibidor I, y luego se realizó una inmunocitoquímica donde se detectó tanto catepsina L como el marcador lisosomal LAMP-1. Los resultados obtenidos muestran que catepsina L participa de alguna forma, en la modulación de su expresión en la línea celular COLO320. Por otro lado, en la línea celular SW620 no se observaron mayores diferencias en cuanto a la expresión de catepsina L (**figura 10c**).

Figura 10

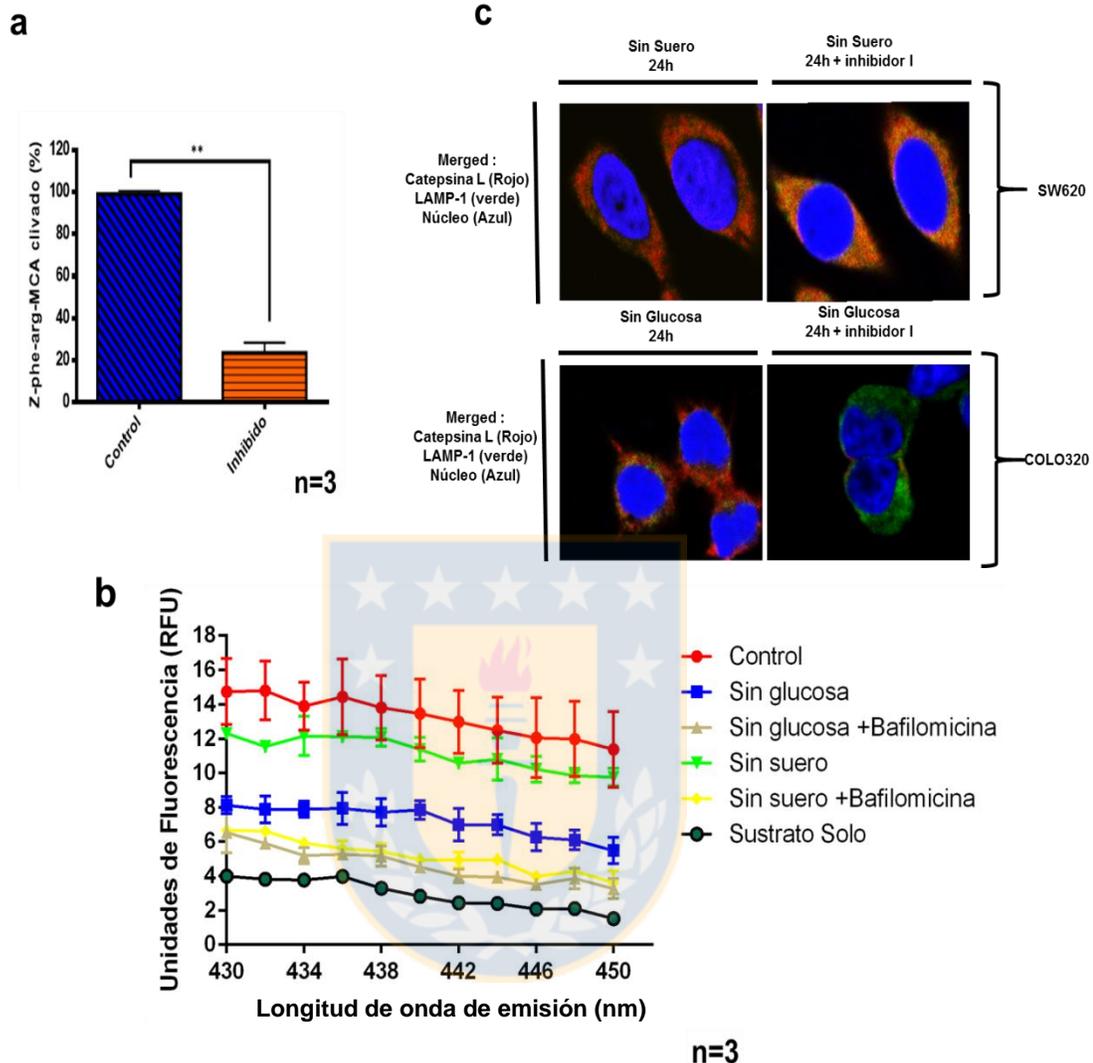


Figura 10: Efecto del estrés metabólico en la actividad de cathepsina L. Extractos de células sometidas a estrés metabólico se utilizaron para la medición de la actividad de cathepsina L, este ensayo se basa en el uso del sustrato fluorogénico (Z-PHE-ARG-MCA) específico de cathepsina L, el cual al ser clivado y excitado a una longitud de onda específica, presenta un rango de emisión entre los 430 a 450nm. En **a**, se puede observar que la condición a la cual se le adiciona una concentración de 25 μ M del inhibidor I, esta es capaz de inhibir un gran porcentaje de la actividad de cathepsina L. Por otra parte en **b**, se usaron extractos de células sometidas a estrés metabólico, como también tratadas con el inhibidor bafilomicina; el control corresponde a extractos de células cultivadas en medio enriquecido en nutrientes; como control basal o blanco, se usó el sustrato fluorogénico. Para determinar el efecto del inhibidor en la expresión de cathepsina L en las líneas celulares SW620 y COLO320, se realizó una inmunocitoquímica donde cathepsina L se detectó mediante un anticuerpo específico (rojo), el ADN se tiñó con DAPI (azul) y el lisosoma se visualizó con un anticuerpo anti LAMP-1 (verde) (c).

Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la supervivencia celular

Se determinó la función que presenta catepsina L en la supervivencia de las líneas celulares en estudio sometidas a estrés metabólico. Para ello, se procedió a tratar las líneas celulares COLO320 y SW620 con el inhibidor I, posteriormente estas células se sometieron a estrés metabólico, para luego evaluar la supervivencia celular mediante un ensayo de viabilidad, el cual permitió cuantificar las células metabólicamente activas. Los resultados obtenidos, muestran que catepsina L es importante para la supervivencia de la línea celular COLO320 en condiciones de estrés sin glucosa, a diferencia de la condición sin suero. Por otra parte, también se utilizó bafilomicina, una droga que afecta el pH lisosomal, y por lo tanto, la actividad de la mayor parte de las catepsinas lisosomales. Los resultados obtenidos muestran que hay una disminución significativa de la viabilidad celular en ambos tipos de estrés metabólico al utilizar bafilomicina. Por otro lado, al usar este último inhibidor, en conjunto con el inhibidor I, no se observa un efecto aditivo en la viabilidad celular **(figura 11 a,b)**. Para corroborar la función de catepsina L en la supervivencia de la línea celular COLO320 sometida a estrés sin glucosa, también se utilizó un silenciador específico de catepsina L. Los resultados obtenidos, muestran que el silenciamiento de catepsina L, afecta la viabilidad celular en condiciones de estrés con medio sin glucosa **(figura 11c)**.

En cuanto la línea células SW620, se observó que catepsina L es importante para su supervivencia en condiciones de estrés con medio sin suero. Por otro lado, al utilizar bafilomicina, tanto independiente como combinada con el inhibidor I, también se observa una disminución significativa de la supervivencia celular **(figura 11d)**.

Figura 11

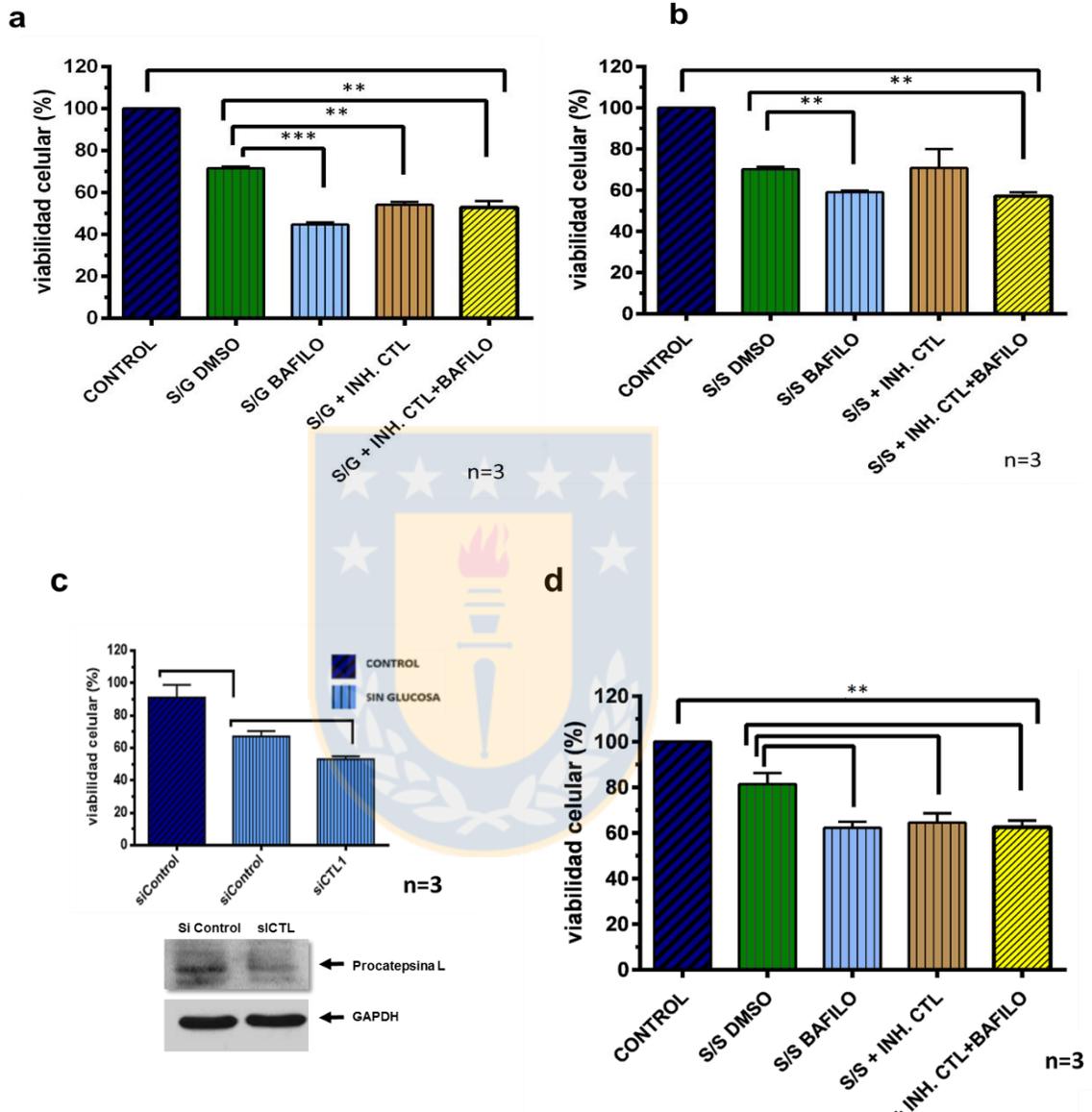


Figura 11: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la supervivencia celular. Las células COLO320 (a y b) y SW620 (d) se estresaron con medio libre de glucosa (S/G) o libre de suero (S/S) por 24 horas. Por otra parte, además del estrés, las células se trataron con el inhibidor I de catepsina L (25 μ M) o con bafilomicina (20nM). Posteriormente, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. Por otra parte, también se utilizó un silenciador específico de catepsina L (siCTL) antes de realizar el ensayo de viabilidad celular (c). En c también se muestra un western blot, realizado para corroborar el silenciamiento de catepsina L, como control de carga se utilizó GAPDH.

Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la apoptosis celular

Los resultados anteriores muestran que al estar inhibida catepsina L, las células sometidas a estrés metabólico presentan una disminución significativa de la viabilidad celular. La disminución de células metabólicamente activas podría deberse a un aumento de la apoptosis; para evaluar este efecto, en una primera instancia se detectaron marcadores específicos de apoptosis como la proteína antiapoptótica Bcl-2, la proteasa efectora de la apoptosis caspasa 3 clivada y su sustrato, la proteína reparadora del ADN PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase). Los resultados obtenidos, en la línea celular COLO320, muestran que al inhibir catepsina L y luego someterla a estrés sin glucosa, hay un aumento en la expresión de la caspasa 3 clivada y PARP clivado, y hay una disminución de la expresión de la proteína Bcl-2 (**figura 12a**), lo cual indicaría un aumento de apoptosis. Por otro lado, en la condición sin suero en presencia del inhibidor I, en la misma línea celular, se observó una disminución de la expresión de los marcadores apoptóticos, lo que se asocia a un aumento leve, no significativo, en la supervivencia celular.

En cuanto a la línea celular SW620, se evaluó si la disminución en la supervivencia celular, en la condición sin suero en presencia del inhibidor de catepsina L, se debía a un aumento de la apoptosis. Para ello, se utilizaron extractos celulares de la condición sin suero, y se detectaron los marcadores apoptóticos: PARP, caspasa 3 clivada y Bcl-2. Los resultados obtenidos, muestran que no hay una diferencia significativa entre la condición control o sin suero, con la condición en la que catepsina L se encuentra inhibida (**figura 12b**).

Para corroborar en la línea celular COLO320, el aumento de apoptosis en la condición sin glucosa más inhibidor de catepsina L se realizó un análisis de integridad de ADN genómico. De esta forma, los resultados obtenidos, muestran que las células sometidas a estrés metabólico de 24 horas sin glucosa, presentaron un

aumento en la degradación de ADN en comparación a la condición control; por otra parte, en la condición sin suero no se observan grandes diferencias con respecto a la condición control (**figura 13a**). La condición sin glucosa más inhibidor de catepsina L, también se evaluó mediante el ensayo del cometa (**figura 13b**). Los resultados obtenidos, en base a la medición de la degradación o cola de ADN, muestran que al someter a las células a un estrés sin glucosa hay un aumento considerable de células apoptóticas, las cuales presentan un leve aumento en la condición donde catepsina L se encuentra inhibida (**figura 13c**).

Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la autofagia celular

La función que podría tener catepsina L en la supervivencia celular a un estrés del tipo metabólico, podría estar asociada también a un rol en la autofagia celular. Para evaluar este efecto, las líneas celulares COLO320 y SW620 se trataron con el inhibidor I antes de someterlas a estrés metabólico, y se detectó si existía una variación en los niveles de vacuolas autofágicas. Cabe destacar que para detener el flujo autofágico y observar la acumulación de autofagosomas, se utilizó bafilomicina en todas las condiciones. Los resultados obtenidos muestran que en la línea celular COLO320, tratada con el inhibidor I de catepsina L y luego sometida a estrés con medio sin glucosa, se observa un aumento en la conversión de LC3I a LC3II, lo cual se correlaciona con un aumento en el número de autofagosomas (**figura 14a**). Por otra parte, en la condición sin suero y sin inhibidor hay un mayor número de vacuolas autofágicas o mayor expresión de LC3II que la condición con inhibidor.

En cuanto a la línea celular SW620, se observa que en la condición sin suero y sin inhibidor, hay una mayor acumulación de autofagosomas, lo cual se ve reflejado en una mayor expresión de LC3II (**figura 14b**).

Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la expresión de otras catepsinas

Al estar inhibida catepsina L, otro tipo de catepsina podría estar compensando su función degradativa, es por ello, que se utilizaron extractos de la línea celular COLO320 tratadas con el inhibidor I de catepsina L, y posteriormente se realizó un RT-PCR, donde se evaluó la expresión del mensajero de catepsina D y B. Los resultados obtenidos muestran que en una situación control, hay una alta expresión de las catepsinas en estudio, cuando las células son sometidas a estrés sin glucosa, se observa una disminución de la expresión de todas estas. Cuando catepsina L se encuentra inhibida, no hay una alteración en la expresión génica de esta, pero si lo hay de catepsina B y D, las cuales aumentan su nivel de expresión (**figura 15**).



Figura 12

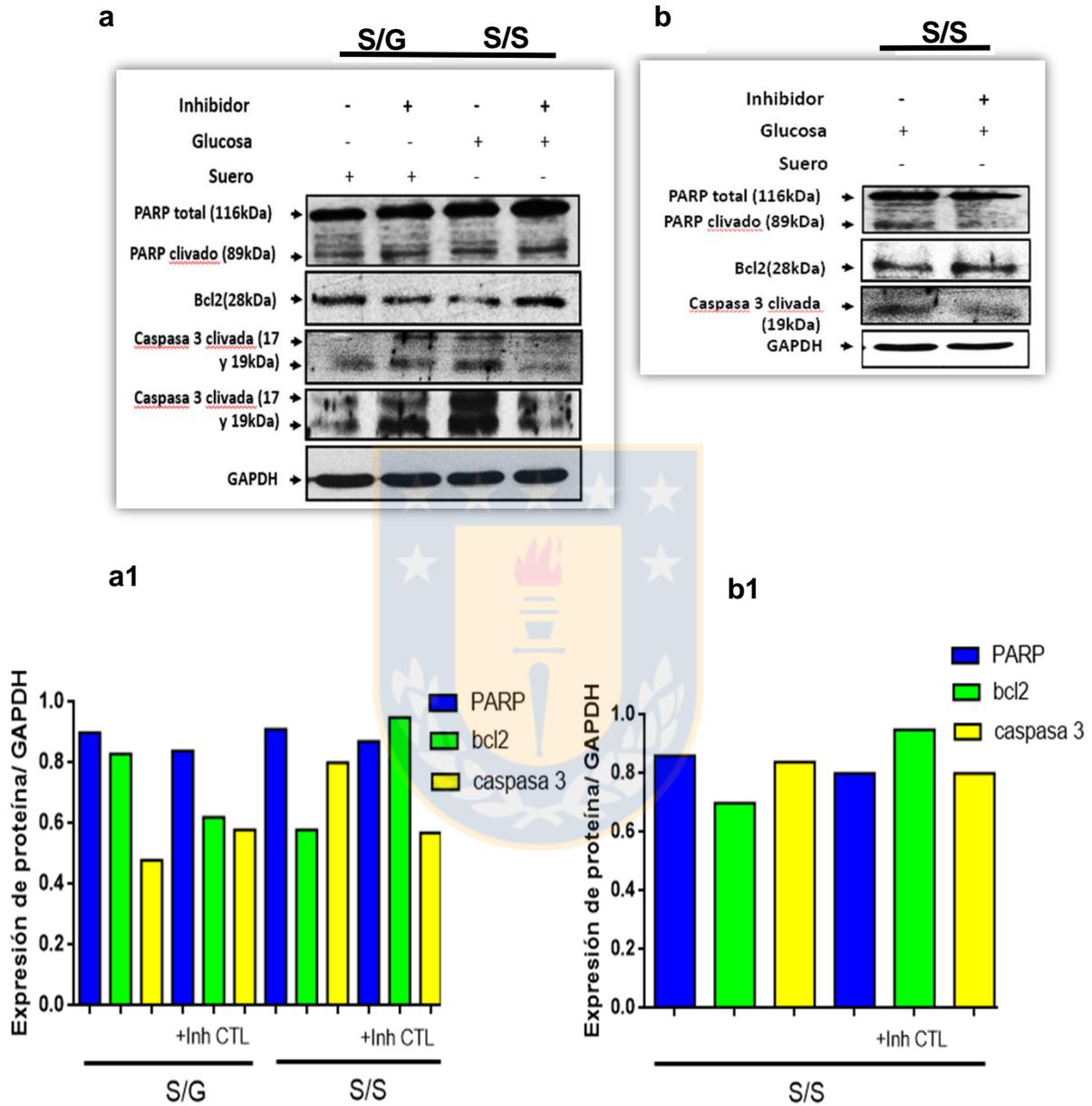


Figura 12: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la apoptosis celular. Las células COLO320 (a,) y SW620 (b) se estresaron con medio libre de glucosa (S/G) y libre de suero (S/S) por 24 horas. Por otra parte, además del estrés, las células se trataron con el inhibidor I de catepsina L (25 μ M). Posteriormente los extractos se utilizaron para determinar la expresión de marcadores apoptóticos como Bcl-2, PARP y caspasa 3 clivada (a y b); como control de carga se utilizó GAPDH. El gráfico a1 y b1 representan las densitometrías respectivas de los marcadores de apoptosis con respecto al control de carga GAPDH.

Figura 13

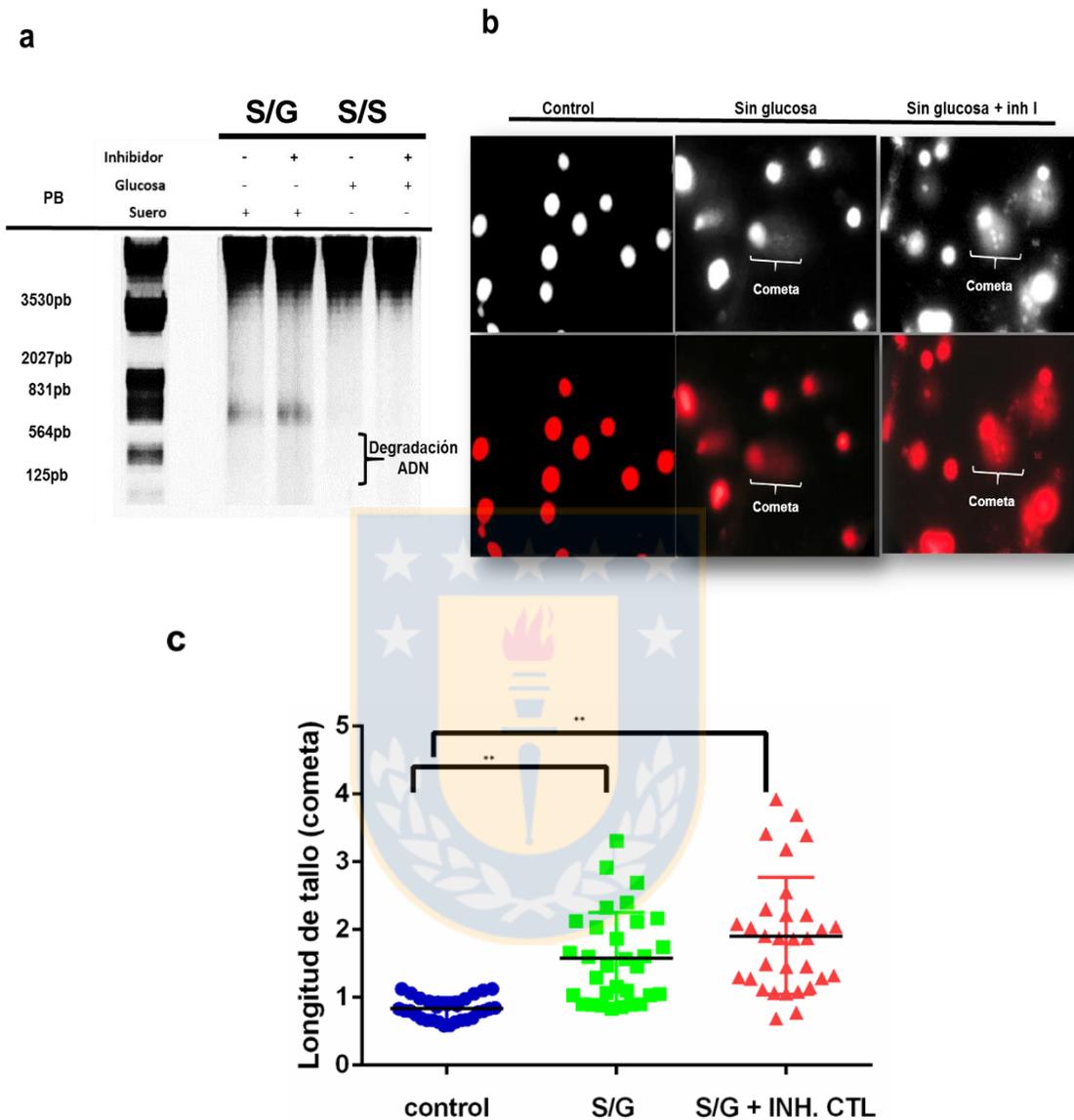


Figura 13: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la apoptosis celular. Las células COLO320 se estresaron con medio libre de glucosa (**S/G**) y libre de suero (**S/S**) por 24 horas. Por otra parte, además del estrés, las células se trataron con el inhibidor I de catepsina L (25 μ M). Luego, se determinó el efecto de la inhibición de catepsina en la integridad del ADN en un gel de agarosa al 1% (**a**) e integridad nuclear mediante la técnica del cometa (**b**). La longitud de los tallos o colas de 50 cometas se utilizaron para graficar el efecto del tratamiento en la apoptosis celular (**c**).

Figura 14

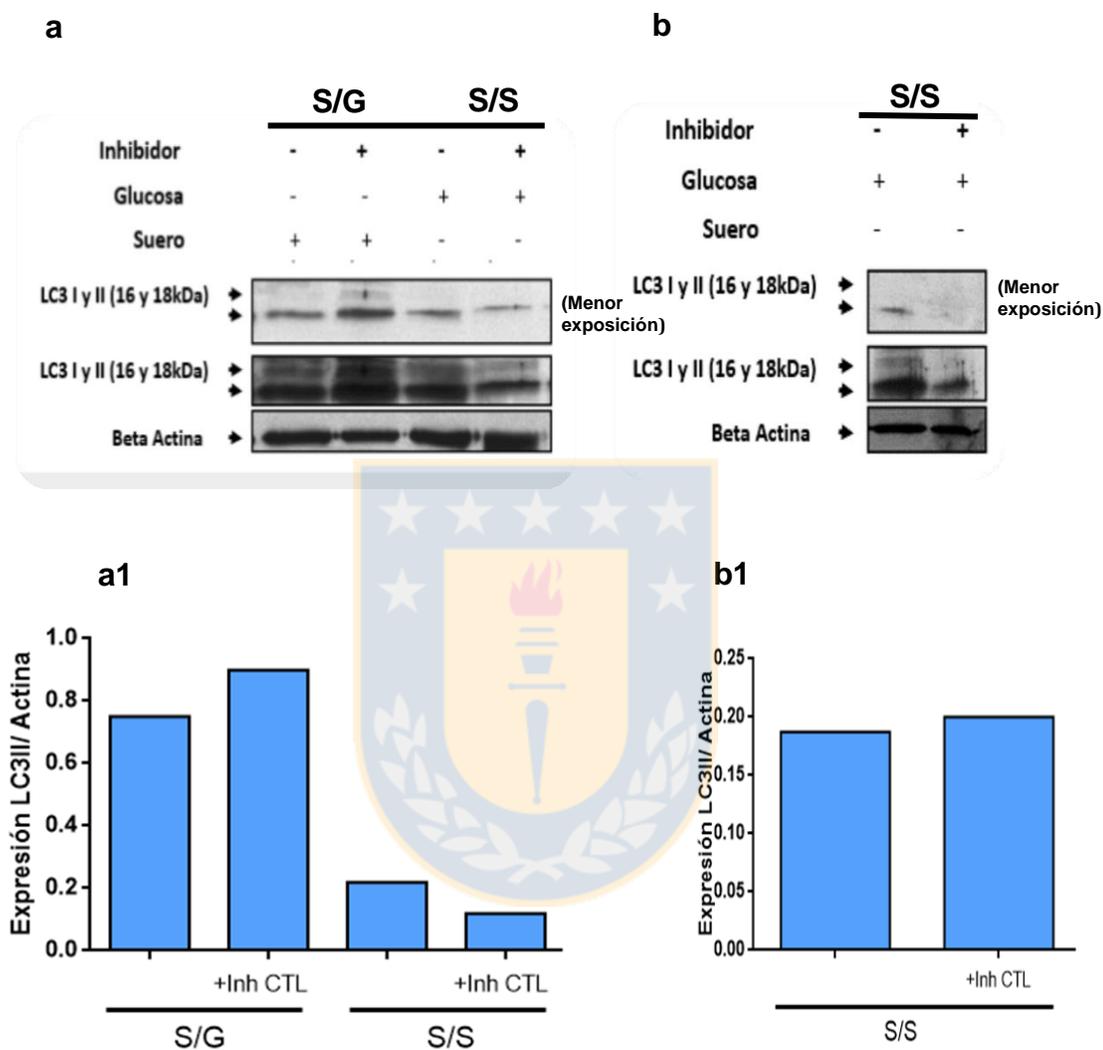
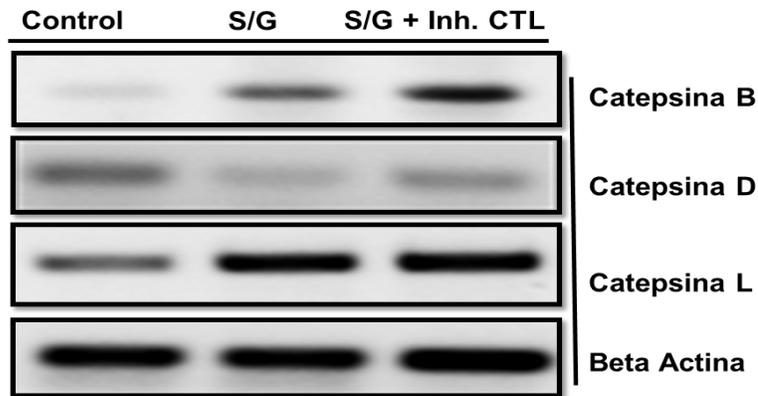


Figura 14: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la autofagia celular. Las células COLO320 (a) y SW620 (b) se estresaron con medio libre de glucosa (S/G) y libre de suero (S/S) por 24 horas. Por otra parte, además del estrés, las células se trataron con el inhibidor I de catepsina L (25 µM). Posteriormente, los extractos se utilizaron para determinar la expresión del marcador de vesículas autofágicas LC3II, como control de carga se utilizó beta actina. El gráfico a1 y b1 representan las densitometrías respectivas de la expresión de LC3II con respecto al control de carga beta actina.

Figura 15

a



b

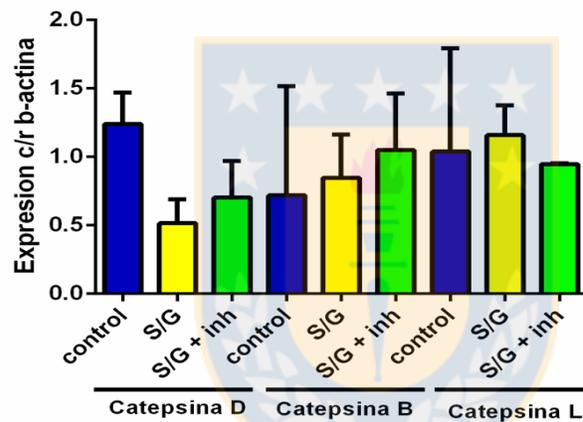


Figura 15: Efecto del estrés metabólico e inhibición de catepsina L en la expresión de otras catepsinas. Las células COLO320 se estresaron con medio libre de glucosa por 24 horas (**S/G**). Por otra parte, además del estrés, las células se trataron con el inhibidor I de catepsina L (25 μ M). Posteriormente se realizó una extracción de ARN, el cual se utilizó para realizar un RT-PCR, donde se usaron partidores específicos de catepsina L, B y D, como control de carga se utilizó beta actina (**a**). El gráfico **b** representa las densitometrías respectivas de la expresión con respecto al control de carga beta actina.

DISCUSIÓN

En este estudio, se utilizaron dos líneas celulares de adenocarcinoma colorectal, las líneas COLO320 y SW620, ambas presentaron una sobreexpresión de catepsina L en una situación control, lo cual coincide con lo descrito en células con fenotipo cancerígeno (Sullivan y col., 2009). Por otra parte, en cuanto a la localización de catepsina L, esta es principalmente lisosomal, lo cual es lógico, ya que su principal función es degradativa (Tobin y col., 2002). Las otras localizaciones observadas de catepsina L, como la nuclear o citoplasmática, se podrían asociar a procesos de síntesis o a procesos proliferativos como lo descrito por Goulet y col. (2007). Defectos en el proceso de síntesis de catepsina L se han observado en diversos tipos de cáncer, la principal alteración observada, es el transporte de la forma inmadura de catepsina L, por medio de vesículas específicas a la membrana, donde es liberada al medio extracelular para participar en procesos invasivos del tumor (Bromme y Wilson, 2011). Por otra parte, se ha comprobado que existen diversas isoformas inmaduras de catepsina L, debido a alteraciones en el proceso de transcripción, principalmente en el proceso de corte y empalme, o a la presencia de varios sitios de inicio de la traducción (Caserman y col., 2006; Bromme y Wilson, 2011; Brik y col., 2015; Muntener y col., 2004; Itoh y col., 1999).

Al tratar las líneas celulares con un medio reducido de nutrientes y/o glucosa, se observó una reducción del nivel de expresión, como también la aparición de diversas formas de catepsina L, las cuales coinciden con las formas descritas por Tamhane y col., (2016); Tournu y col., (2001), y Goulet y col., (2007); que han descrito a catepsina L inmadura o procatepsina de aproximadamente 40 a 48kDa. A este respecto, la forma simple de catepsina L, está escindida de una región regulatoria que se encuentra hacia la región N-terminal, por lo que tiene un tamaño cercano a los 30kDa, y por último la madura, que tiene un tamaño relativo de 25kDa. Tournu y col., (1998), sugieren que la aparición de estas formas se vería influenciada por la alteración de los niveles de glucosa, los cuales influyen tanto en la expresión como

en la maduración de catepsina L. Tournu y col., (1998), vinculan la variación de los niveles de glucosa con la inducción de la síntesis de las catepsinas y no de otras proteasas celulares. Para corroborar lo observado Tournu y col., (2001); utilizando fibroblastos transformados con el oncogén RAS sometidos a un estrés con alta glucosa, observaron la aparición de ciertas formas no procesadas de catepsina L, las cuales a su vez se presentan activas; los autores sugieren que el mecanismo involucrado se ha asociado a un control postraducciona, ya que no observaron cambios a nivel de expresión. De esta forma, los autores propusieron que la glucosa, por un mecanismo desconocido, promueve el traslado de las formas inmaduras de catepsina L o procatepsina L, que se encuentran en los endosomas, al lisosoma donde terminan de madurar, surgiendo de esta forma variantes de distinto peso molecular. Con respecto, a la aparición de formas intermedias a los tamaños descritos, autores como Goulet y col. (2001), demostraron que corresponden a formas inmaduras de catepsina L con distintos niveles de glicosilación.

Por otra parte, los resultados muestran que las formas citosólicas de catepsina L, observadas en condiciones de estrés sin glucosa, presentan una disminución de su actividad, lo cual se corroboró también al evaluar la actividad total de la proteasa al utilizar un sustrato específico de ésta, este resultado coincide con lo planteado por Tournu y col., (2001). La explicación a lo sucedido podría asociarse a que las formas de catepsina L detectadas durante el estrés sin glucosa, son formas citoplasmáticas inactivas o que al no ser parte de la membrana celular ni lisosomal, no representan la totalidad de las catepsinas presentes en las células. Esta hipótesis toma más fuerza al analizar la inmunocitoquímica obtenida mediante microscopía confocal, donde se evidencia una clara disminución de la expresión de catepsina L en la condición sin glucosa. En cuanto al estrés sin suero, hay una disminución de la actividad total de catepsina L, sin embargo no es considerada significativa. Bromme y Wilson, (2011), sostienen que los factores que podrían estar influenciando en la actividad de las catepsinas, se encuentran: el pH intracelular, la presencia de inhibidores endógenos o su autorregulación asociado a su prodominio, secuencia que se encuentra en la

región N-terminal que puede interactuar con el sitio activo de la catepsina impidiendo su actividad proteolítica.

Por otra parte, en la línea COLO320, se observó que en una situación control, catepsina L colocaliza con alfa tubulina. Collon y col., (1984) sugieren que esta colocalización podría deberse a la asociación de los lisosomas con el citoesqueleto, que utilizan para moverse. Johnson y col., (1991) sugieren que las catepsinas podrían participar en el ensamblaje de microtúbulos, ya que se tiene como antecedente que catepsina D puede degradar a la proteína asociada a microtubulos 2 (MAP2). Al estresar las células con medio sin suero o sin glucosa, se observó un cambio morfológico, apreciable principalmente en la línea celular COLO320. Wada y col., (2011) destacan que la morfología celular en condiciones proliferativas es distinta que en condiciones de estrés. Mengual y col., (2010) creen que esta morfología podría deberse a cambios en la densidad celular o que las células se encuentran principalmente en otro estadio celular, como la senescencia en el caso de células sometidas a estrés sin suero.

La colocalización de catepsina L con la proteína asociada a lisosoma (LAMP-1) se observó en todas las condiciones utilizadas, lo cual es lógico, ya que el lisosoma contiene principalmente a las catepsinas. Sin embargo, en la condición sin glucosa, se observó un mayor número de formas de catepsina L que no colocalizaban con LAMP-1, lo cual sería un indicativo que esta proteasa se encontraba fuera del lisosoma. Por una parte, estas podrían ser formas inmaduras de catepsina L en proceso de síntesis, o bien podrían estar a nivel citosólico cumpliendo alguna función específica. A este respecto, varios autores como Jaakkola y Tschopp, (2003) han sugerido que la aparición de catepsinas a nivel citosólico podría deberse a una permeabilización lisosomal, en tal caso las proteasas podrían participar en procesos apoptóticos. Kaasik y col., (2005) determinan que el uso de sondas de marcaje ácido como lysotracker, se hace efectiva para determinar cambios de pH debido a un rompimiento lisosomal. Los resultados sugieren que en la condición con medio sin

glucosa y con medio sin suero hay una mayor acidificación citosólica que en la situación control.

Cabe destacar que autores como Chen y col., (2009) sostienen que el estrés metabólico asociado a la falta de factores de crecimiento y nutrientes se asocia a la activación de vías de señalización como la de AMP quinasa que culminan en la autofagia. Para determinar la función que tendría catepsina L en el proceso de autofagia, se utilizó un inhibidor específico que es capaz de disminuir en un 80% su actividad. Los resultados en la línea celular COLO320, muestran en una primera instancia, que en una condición de estrés con medio sin glucosa, la inhibición de catepsina L se asocia a una acumulación de vesículas autofágicas. Por otra parte, bajo estas mismas condiciones, se observó un aumento de la apoptosis celular, la cual se midió mediante el análisis de integridad del ADN, y el uso de marcadores de apoptosis. Para corroborar estos resultados, también se midió la supervivencia celular, los resultados obtenidos muestran que bajo condiciones de estrés con medio sin glucosa, catepsina L es importante para la supervivencia celular, por otra parte, resultados similares se obtuvieron al utilizar un inhibidor de la bomba de protones del lisosoma que favorece la alcalinización del lumen lisosomal y por lo tanto, la inactivación de muchas proteasas lisosomales. Todo esto, nos lleva a suponer que la función de catepsina L es fundamental en el proceso catalítico final de la autofagia, y que su inhibición traería como consecuencia una acumulación de vesículas con proteínas y organelos defectuosos, que finalmente culminaría con la activación de una vía de muerte celular (**figura 16**)

Cartledge y col., (2012) utilizando líneas celulares de neuroblastoma a las cuales se le agregaron inhibidores específicos de catepsina L y B, observaron la acumulación de vacuolas de autofagia que posteriormente llevaron a un proceso citotóxico. Por otra parte, Tatti y col, (2012) estudiando la enfermedad de Gaucher, uno de los desórdenes lisosomales, que consiste en la deficiencia de saposin C, una glicoproteína lisosomal encargada de la organización de la membrana lisosomal, trae

como consecuencia la acumulación de vesículas con material celular sin degradar, lo que lleva a cuadros clínicos severos. A este respecto, un modelo de fibroblastos con saposin C mutado, que sometieron a estrés con medio sin suero, presentó una autofagia aberrante debido a la deficiencia del autolisosoma, sin embargo al sobreexpresar a catepsina B y L, se recuperó el proceso degradativo o catalítico.

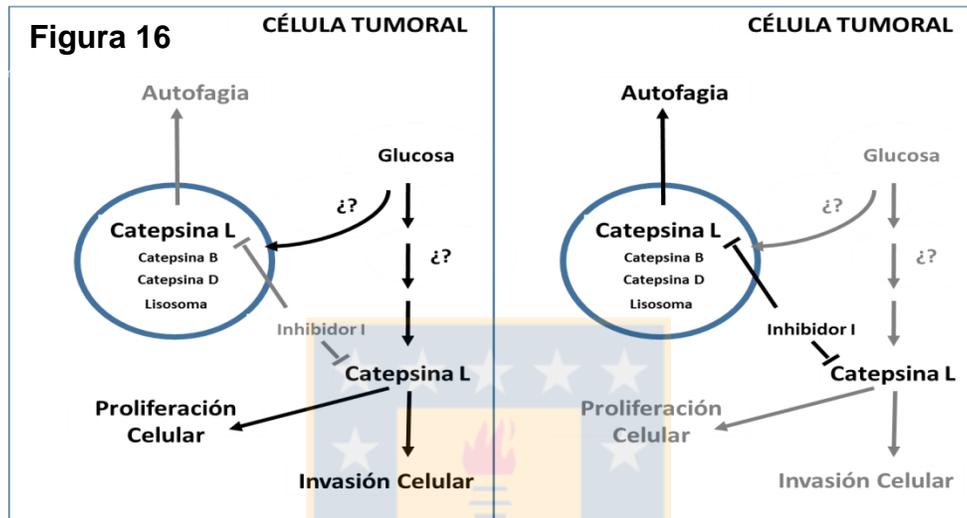


Figura 16: Posible mecanismo que asocia los niveles de glucosa con la función de catepsina L en la supervivencia celular. La glucosa por un mecanismo desconocido, podría promover la síntesis de catepsina L, la cual, en condiciones nutricionales favorables, participaría en procesos proliferativos e invasivos (**esquema izquierda**). Por otra parte, cuando las células son sometidas a estrés con medio sin glucosa, catepsina L participa en el proceso de autofagia celular, a pesar de que su expresión no lisosomal se ve afectada con el estrés realizado. Finalmente, en esas condiciones, la adición de un inhibidor de catepsina L afecta también la actividad de catepsina L lisosomal, impidiendo que participe en el proceso de autofagia, en consecuencia, la célula sintetiza a otras catepsinas, que no serían tan efectivas como catepsina L (**esquema derecha**). Esto finalmente podría converger en una autofagia aberrante que culminaría con la activación de la apoptosis celular.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la línea COLO320 sometida a estrés sin suero, muestran que la inhibición de catepsina L se asocia a un aumento de las vacuolas autofagicas. Por otra parte, en cuanto al análisis de apoptosis, se observó una disminución de la expresión de los marcadores apoptóticos. Al comparar estos resultados con los de supervivencia, no se observaron diferencias con la situación control, distinto fue el caso cuando se utilizó el inhibidor de la bomba de protones (bafilomicina), donde efectivamente hubo una disminución significativa de la

viabilidad celular. Hay varios factores que pueden estar influyendo en lo sucedido, uno de ellos es que al encontrarse catepsina L inhibida, otro tipo de catepsina podría sustituir o compensar su actividad, continuando de esta forma el proceso de autofagia y permitiendo la supervivencia celular. Hay antecedentes que ratones knockout para catepsina B y L, sobreviven debido a la compensación de otras 8 catepsinas (Cartledge y col., 2012). Por otro lado, en líneas celulares de cáncer, se ha observado que la actividad de catepsina L, generalmente es compensada por catepsina D y no por catepsina B (Dennemärker y col., 2010).

Para determinar si existe algún efecto compensatorio cuando la actividad de catepsina L estaba inhibida, en una condición sin glucosa; se analizó la expresión del mensajero de las catepsinas B y D. Los resultados muestran que al inhibir catepsina L, hay un aumento en la expresión principalmente de catepsina D. Sin embargo, esta catepsina, por alguna razón, no estaría sustituyendo la función degradativa de catepsina L; se cree que debido al estrés con medio sin glucosa podrían haber defectos en la glicosilación, lo que tendría consecuencia en el transporte de catepsina D al lisosoma. Schönthal, (2012) sostiene que el tratamiento con medio sin glucosa también genera un estrés reticular, el cual es asociado a defectos en la síntesis y en la distribución de proteínas. Por otra parte, Kagedal y col., (2001), proponen que catepsina D podría estar activando una vía de apoptosis de forma directa; ya que es considerada una proteasa proapoptótica bajo ciertas condiciones de estrés.

Con respecto a la línea celular SW620, se observaron resultados similares a los obtenidos en la otra línea celular, en cuanto al estrés sin suero, con la diferencia que se presentó una disminución significativa de la viabilidad celular cuando catepsina L se encontraba inhibida. No se realizaron análisis más profundos en esta línea celular, ya que tanto a nivel de expresión de catepsina L, como de morfología no se observaron grandes cambios entre la condiciones control con la condición de estrés.

CONCLUSIONES

La presente Tesis permitió demostrar que:

- **Catepsina L es fundamental para el proceso de autofagia, y la inhibición de la apoptosis frente a estrés energético, en células de cáncer colorectal.**
- **Catepsina L favorece la supervivencia de células de cáncer colorectal sujetas a estrés energético lo que podría explicarse por su función en la autofagia.**



PROYECCIONES

El estudio realizado confirma una vez más la relación entre la expresión de la proteasa “catepsina L” y la supervivencia de líneas celulares de colon. Los estudios posteriores deben ir dirigidos hacia la búsqueda de posibles vías de señalización que asocien la expresión de Catepsina L con el estrés energético, para ello se hace necesario el uso de líneas celulares no cancerígenas como modelo de estudio, además del silenciamiento estable de catepsina L. Posteriormente, el próximo paso a seguir, sería la utilización de animales de experimentación para la obtención de conclusiones más certeras.



BIBLIOGRAFÍA

Abudula A, Rommerskirch W, Weber E, Gunther D, Wiederanders B.(2001). Splice variants of human cathepsin L mRNA show different expression rates. *Biol Chem.*;382(11):1583–1591.

Apel A, Zentgraf H, Buchler MW, Herr I. (2009). Autophagy-A double-edged sword in oncology. *Int J Cancer.*125:991–995.

Brech A., Ahlquist T., Lothe R.A., Stenmark H.(2009). Autophagy in tumour suppression and promotion. *Molecular Oncology* 3. 366-375.

Boya P. and Kroemer G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27; 6434-6451.

Bohley P, Seglen PO. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia.* 15;48:151-157.

Bromme D. and Wilson S. (2011). Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis *Biology of Extracellular Matrix 2*, chapter 2, Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.

Caserman S., Kenig S., Sloane BF., Lah TT. (2006). Cathepsin L splice variants in human breast cell lines. *Biol Chem.* 387: 629-634

Cartledge DM., Colella R., Glazewski L., Lu G., Mason RW. (2013). Inhibitors of cathepsins B and L induce autophagy and cell death in neuroblastoma cells. *Invest New Drugs.* 31:20-29.

Cockle SM., Dean RT. (1984). Distinct proteolytic mechanisms in serum-sufficient and serum-restricted fibroblasts. Transformed 3T3 cells fail to regulate proteolysis in relation to culture density only during serum-sufficiency. *Biochem J.* 1; 221:53-60.

Chen N., Karantza-Wadsworth V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica en Biophysica Acta* 1793. 1516-1523.

Crichton D., Wilkinson S., O'Prey J, Syed N., Smith P., Harrison PR., Gasco M., Garrone O., Crook T., Ryan KM.(2006). DRAM a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126:121–134.

Chambers AF., Colella R., Denhardt DT., Wilson SM.(1992). Increased expression of cathepsin L and B and decreased activity of their inhibitors in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 Cells. *Mol. Carcinogen* 5: 238-245.

Dennemärker J., Lohmüller T., Müller S., Aguilar SV., Tobin DJ., Peters C., Reinheckel T. (2010). Impaired turnover of autophagolysosomes in cathepsin L deficiency. *Biol Chem.* 391:913-22.

Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gelinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E.(2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell.*10:51–64.

Duncan EM., Muratore-Schroeder TL., Cook RG., Garcia BA., Shabanowitz J., Hunt DF., Allis CD. (2008). Cathepsin L Proteolytically Processes Histone H3 During Mouse Embryonic Stem Cell differentiation. *Cell* 135 (2): 284-294.

François A, Julian A, Ragot S, Dugast E, Blanchard L, Brishoual S. (2015). Inflammatory Stress on Autophagy in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Alzheimer's Disease during 24 Months of Follow-Up. PLoS ONE. 10: 0138326.

Fulda S., Gorman A.M., Hori O. and Samali A. (2010). Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. International Journal of Cell Biology. Article ID 214074, 23 pp.

Gocheva V, Joyce JA (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. Cell Cycle 6, 60-64.

Goulet B, Baruch A, Moon N, Poirier M, Sansregret L, Erickson A, Bogoy M, Nepveu A.(2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. Mol Cell. 14: 207-219.

Hiwasa T, Sakiyama S. (1996). Nuclear localization of procathepsin L/MEP in rastransformed mouse fibroblasts. Cancer Letters 99, 87-91.

Hoyer-Hansen M., Jaattela M. (2008). Autophagy: an emerging target for cancer therapy. Autophagy.4:574–580.

Hanahan D. and Weinberg R. A. (2000). The hallmarks of cancer. Cell 100, 57–70.

Itoh R., Kawamoto S., Wakako A., Shigeru k. and Kousaku O. (1999). Genomic Organization and Chromosomal Localization of the Human Cathepsin L2 Gene. DNA research 6, 137-140.

Jean D., Guillaume N., Frade R. (2002). Characterization of human cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF- κ B, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity. *Biochem J* 361:173–184.

Jaakkola, Tschopp, J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 4: 416–423.

Johnson G., Litersky J., and Whitaker J. (1991). Proteolysis of microtubule-associated protein 2 and tubulin by cathepsin d. *Journal of neurochemistry.* 57. 5:1577–1583

Jung CH., Jun CB., Ro SH., Kim YM., Otto NM., Cao J. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 20:1992–2003.

Kagedal K, Johansson U., Ollinger K. (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Differ.* 15: 1592-1594.

Kaasik A., Rikk T., Piirsoo A., Zharkovsky T., Zharkovsky A.. (2005). Up-regulation of lysosomal cathepsin I and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium. *European journal of neuroscience.* 22: 1023–1031.

Kolch W, Heidecker G, Lloyd P, Rapp UR. (1991). Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature* 349: 426–428.

Kenig S, Frangez R, Pucer A, Lah T. (2011). Inhibition of cathepsin L lowers the apoptotic threshold of glioblastoma cells by up-regulating p53 and transcription of caspases 3 and 7. *Apoptosis* 16:671-682.

Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2:1587–1643.

Richard D. J., Bolderson E., and Khanna K. K. (2009). Multiple human single-stranded DNA binding proteins function in genome maintenance: structural, biochemical and functional analysis, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 44:98–116.

Lozy Fred and Vassiliki Karantza. (2012). Autophagy and cancer cell metabolism. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 395-401.

M. Schröder and R. J. Kaufman. (2005). The mammalian unfolded protein response, *Annual Review of Biochemistry* 74:739–789.

Mengual Gómez DL, Belaich MN, Rodríguez VA, Ghiringhelli PD. (2010). Effects of fetal bovine serum deprivation in cell cultures on the production of Anticarsia gemmatalis multinucleopolyhedrovirus. *BMC Biotechnol* 15;10:68.

Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*; 5:649–662.

Muntener K., Zwicky R., Csucs G., Rohrer J., Baici A. (2004). Exon skipping of cathepsin B: mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death. *J. Biol. Chem.* 279:41012-41017.

Mason, R W., and Wilcox, D. (1993). Chemistry of lysosomal proteinases, in *Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes*. JAI Press 1:81-116.

Mach L1, Mort JS, Glössl J. (1994). Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem.* 269(17):13030-13035.

Menon S., Dibble C., Talbott G., Hoxhaj G., Valvezan A., Takahashi H., Cantley C. and Manning B.(2014).Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell* 156:771–785.

Milisav I. (2011). Cellular Stress Responses, *Advances in Regenerative Medicine*, Dr Sabine Wislet-Gendebien, ISBN: 978-953-307-732-1.

LoPiccolo J., Blumenthal GM., Bernstein WB., Dennis PA. (2008). Targeting the PI3K/Akt/ mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist* 11:32–50.

Rabinowitz PM., Scotch ML, Conti LA. (2010). Animals as sentinels: using comparative medicine to move beyond the laboratory. *ILAR J.* 51:262-267.

Seglen, P.O., Gordon, P.B., Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Seminars in cell Biology* 1:441-448.

Stoka V., Turk B. and Turk V.(2005). Lysosomal Cysteine Proteases: Structural Features and their Role in Apoptosis. *IUBMB Life*, 57: 347 – 353.

Schonthal AH. (2012). Endoplasmic reticulum stress: Its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica* 857516

Sullivan S., Tosetto M., Kevans D., Coss A., Wang L., O'Donoghue D., Hyland J., Sheahan K., Mulcahy H., O'Sullivan J.(2009) . Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer. *International Journal of Cancer.* 125: 54-61.

Turk, D., and Kos, J. (2002). Lysosomal cathepsins: Structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv. Enzyme Regul.* 42: 285–303.

Tatti M, Motta M, Di Bartolomeo S, Scarpa S., Cianfanelli V., Cecconi F., Salvioli R. (2012). Reduced cathepsins B and D cause impaired autophagic degradation that can be almost completely restored by overexpression of these two proteases in Sap C-deficient fibroblasts. *Hum Mol Genet.* 21:5159-73.

Tan, G.-J., Peng, Z.-K., Lu, J.-P., & Tang, F.-Q. (2013). Cathepsins mediate tumor metastasis. *World Journal of Biological Chemistry.* 4: 91–101.

Tamhane T., Llukumbura R., Lu S., Maelandsmo GM., Haugen MH., Brix K. (2016). Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells. *Biochimie.* 122:208-18.

Tourneau C., Obled A., Roux MP., Deval C., Ferrara M., Béchet DM. (1998). Glucose controls cathepsin expression in Ras-transformed fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.* 360:15-24.

Tobin DJ, Foitzik K, Reinheckel T, Mecklenburg L, Botchkarev VA, Peters C, Paus R. (2002). The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol.* 160:1807-21

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to the nitrocellulose sheets: procedure and some implications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.

Urbanelli L., Trivelli F., Ercolani L., Sementino E., Magini A., Tancini B., Franceschini R., Emiliani C.(2010). Cathepsin L increased level upon Ras mutants expression: the role of p38 and p44/42 MAPK signaling pathways. *Mol. Cell. Biochem* 343: 49-57.

Vasiljeva O.; Turk B.(2008). Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression Apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie* 90: 380-386.

Vafa O, Nishioka D. (1995). Developmentally regulated protease expression during sea urchin embryogenesis. *Mol Reprod Dev.* 40:36-47.

Wada Ken-Ichi, Kazuyoshi Itoga, Teruo Okano, Shigenobu Yonemura, Hiroshi Sasaki. (2011). *Development* 138: 3907-3914.

Wong C, Wu, Yu Q.(2013). CTSL2 is a pro-apoptotic target of E2F1 and a modulator of histone deacetylase inhibitor and DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 1–9.

Zheng X, Chu F, Mirkin BL, Sudha T, Mousa SA, Rebbaa A. (2008). Role of the proteolytic hierarchy between cathepsin L, cathepsin D and caspase-3 in regulation of cellular susceptibility to apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys.* 1783:2294-300.