

HOJA DE RESUMEN



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER

BIBLIOTECA EDUARDO COTE LEMUS

RESUMEN TRABAJO DE GRADO



AUTOR(ES):

NOMBRE(S): HELEN TATIANA

APELLIDOS: HERNÁNDEZ JÁUREGUI

FACULTAD: Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente

PROGRAMA ACADÉMICO: Ingeniería Biotecnológica

DIRECTOR(S)

NOMBRE(S): OMAR HUGO

APELLIDOS: PORRAS ESPINOZA

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS ENDOTELIALES VIVAS UTILIZANDO EL BIOSENSOR FLUORESCENTE HYPER

RESUMEN

Este proyecto se focalizó en la medición de la capacidad antioxidante en células vivas mediante el uso del biosensor HyPer. Para tales efectos, el manejo de técnicas de cultivo celular e *imaging* fue esencial. El biosensor está genéticamente codificado y fue usado en su forma adenoviral para introducirlo en dos líneas celulares endoteliales, EOMA y TIME, mediante infección. Su respuesta fue evaluada cinéticamente frente a pulsos de H₂O₂. Los resultados indican que las velocidades de incremento (v_i) y recuperación (v_r) frente a H₂O₂ (50 μM) fueron, $v_i=0.13\pm 0.02\text{min}^{-1}$ y $v_r=0.04\pm 0.004\text{min}^{-1}$ para EOMA y $v_i=0.14\pm 0.01\text{min}^{-1}$ y $v_r=0.03\pm 0.002\text{min}^{-1}$ para TIME. Los resultados del efecto de los tratamientos con antioxidantes, tales como ácido ascórbico (100 μM) y EUK-134 (10 nM, 100 nM, 1 μM y 10 μM), medidos con HyPer, indican que estos influyeron positivamente en la capacidad antioxidante intracelular, ya sea aminorando el impacto celular frente a un reto oxidativo o acelerando la reducción de proteínas oxidadas. Complementariamente, HyPer fue expresado y registrado en tres compartimentos subcelulares, citoplasma, mitocondrias y retículo endoplasmático, todos ellos con diferentes propiedades redox. Además, evaluamos el impacto de la inhibición farmacológica de las tiorredoxinas en la recuperación del biosensor y se demostró que la tasa de recuperación de HyPer era independiente del pH intracelular.

PALABRAS CLAVES: Biosensor, redox, H₂O₂, células vivas, antioxidantes.

CARACTERÍSTICAS

No De Páginas: 128

PLANOS: 0

ILUSTRACIONES: 20

MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS ENDOTELIALES
VIVAS UTILIZANDO EL BIOSENSOR FLUORESCENTE HYPER

HELEN TATIANA HERNÁNDEZ JÁUREGUI

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA

2015

MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS ENDOTELIALES
VIVAS UTILIZANDO EL BIOSENSOR FLUORESCENTE HYPER

HELEN TATIANA HERNÁNDEZ JÁUREGUI

Proyecto de grado para optar al título profesional de
Ingeniería Biotecnológica

Director

Omar Hugo Porras Espinoza

Bioquímico, PhD en Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
CÚCUTA

2015



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 11 DE NOVIEMBRE DE 2015

HORA: 11:00 A.M.

LUGAR: EDIFICIO LABORATORIO EMPRESARIAL LE 101

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA

TÍTULO: "MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS ENDOTELIALES VIVAS UTILIZANDO EN BIOSENSOR FLUORESCENTE HYPER"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: LADY YESENIA SUAREZ SUAREZ
MAYRA CONTRERAS ROJAS
JUAN JOSE ARIAS CHAMORRO

DIRECTOR: PhD. OMAR PORRAS ESPINOZA – INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS (INTA) UNIVERSIDAD DE CHILE

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CÓDIGO	CALIFICACIÓN
HELEN TATIANA HERNÁNDEZ JÁUREGUI	1610634	4.8

OBSERVACIONES:
MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Lady Yesenia Suarez Suarez Mayra Contreras Rojas Juan José Arias Chamorro

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

Resumen

Este proyecto se focalizó en la medición de la capacidad antioxidante en células vivas mediante el uso del biosensor redox, HyPer. Para tales efectos, el manejo de técnicas de cultivo celular e *imaging* fue esencial. El biosensor está genéticamente codificado y fue usado en su forma adenoviral para introducirlo en dos líneas celulares de endotelio, EOMA y TIME, mediante infección. Su respuesta fue evaluada cinéticamente frente a pulsos de H₂O₂. Los resultados indican que las velocidades de incremento (v_i) y recuperación (v_r) frente a H₂O₂ (50 μ M) fueron, $v_i = 0.13 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ y $v_r = 0.04 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$ para EOMA y $v_i = 0.14 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y $v_r = 0.03 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ para TIME. Los resultados del efecto de los tratamientos con antioxidantes, tales como ácido ascórbico (100 μ M) y EUK-134 (10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M), medidos con HyPer, indican que estos influyeron positivamente en la capacidad antioxidante del microambiente intracelular, ya sea aminorando el impacto celular frente a un reto oxidativo o acelerando la reducción de proteínas oxidadas. Complementariamente, HyPer se expresó y se registró en tres compartimentos subcelulares, citoplasma, mitocondrias y retículo endoplasmático, todos ellos con diferentes propiedades redox. Además, evaluamos el impacto de la inhibición farmacológica de las tiorredoxinas en la recuperación del biosensor y se demostró que la tasa de recuperación de HyPer era independiente del pH intracelular.

Palabras claves: Biosensor, redox, H₂O₂, células vivas, antioxidantes.

Summary

This project is focused on the measurement of antioxidant capacity in living endothelial cells using the redox biosensor, HyPer. For such purposes, the management of cell culture techniques and imaging were essential. The biosensor is genetically encoded and it was used in its adenoviral form for its expression in two endothelial cell lines, EOMA and TIME, by infection. Its response was evaluated kinetically against pulses of H₂O₂. The results indicate that rates of increase (v_i) and recovery (v_r) against H₂O₂ (50 μ M) were , $v_i = 0.13 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ y $v_r = 0.04 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$ for EOMA and $v_i = 0.14 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y $v_r = 0.03 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ for TIME. The results of the effect of the treatment with antioxidants, such as vitamin C (100 μ M) and EUK-134 (10nM, 100nM, 1 μ M y 10 μ M), measured with HyPer, indicate that these influenced positively the antioxidant capacity of the intracellular microenvironment, either diminishing the impact upon a oxidative challenge or accelerating the reducing activity on oxidized proteins. Complementarily, HyPer was expressed and was recorded in three subcellular compartments, cytoplasm, mitochondria, and endoplasmic reticulum, all of them with different redox properties. Furthermore, we evaluated the impact of pharmacological inhibition of the thioredoxins in the recovery of the biosensor and was demonstrated that the rate of recovery of HyPer was independent of the intracellular pH.

Keywords: Biosensor, redox, H₂O₂, living cells, antioxidants.

Agradecimientos

Quiero dedicar estas líneas para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda, han contribuido en la realización del presente proyecto de grado, en especial a mi director, el Dr. Omar Porras, quien con su valioso apoyo, orientación y supervisión ha contribuido grandemente en el desarrollo de mi formación profesional, ganándose todo mi respeto y admiración.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las enseñanzas recibidas por mi amiga, licenciada en bioquímica, Alejandra Parra Peña, con la que me encuentro en deuda por la instrucción y el ánimo infundido en mí.

También quiero dar gracias al Dr. Diego Varela, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo, y a todos los integrantes del laboratorio de biología celular del instituto de nutrición y tecnología de los alimentos (INTA) de la universidad de Chile, por toda su apreciada amistad y colaboración proporcionada.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y ayuda, tanto moral como económica, brindada por mis padres y toda mi familia, así como el aliento recibido por amigos, y la formación transmitida por mi alma mater, UFPS.

Tabla de contenido

Introducción.....	1
1. El problema	7
1.1 Título.....	7
1.2 Planteamiento del problema.....	7
1.3 Formulación del problema	9
1.4 Justificación	9
1.5 Objetivos	10
1.5.1 Objetivo general	10
1.5.2 Objetivos específicos	11
1.6 Delimitación	11
1.6.1 Alcances.	11
1.6.2 Limitaciones.	12
2. Marco referencial.....	13
2.1 Antecedentes	13
2.1.1 Empíricos.....	13
2.1.2 Bibliográficos	14
2.2 Marco teórico	17
2.2.1 Estructura electrónica del dióxigeno y del oxígeno singulete.....	18
2.2.2 Formación de las ERO.	20
2.2.3. Efectos de las ERO sobre las macromoléculas biológicas	24

2.2.3.1	<i>Efectos sobre el ADN</i>	25
2.2.3.2	<i>Efectos sobre los lípidos</i>	26
2.2.3.3	<i>Efectos sobre las proteínas</i>	26
2.2.4	El endotelio.....	27
2.2.4.1	<i>Capacidad de óxido/reducción del tejido endotelial</i>	28
2.2.4.2	<i>Disfunción endotelial</i>	30
2.2.5	Técnicas para la determinación de la capacidad antioxidante total.....	32
2.2.5.1.	<i>La necesidad de nuevas pruebas redox</i>	33
2.2.6	Biosensor HyPer.....	34
2.2.6.1	<i>Estudios cinéticos de la respuesta HyPer</i>	35
2.3	Marco legal.....	37
3.	Metodología.....	39
3.1	Tipo de investigación	39
3.2	Población y muestra	39
3.2.1	Población.....	39
3.2.2	Muestra.....	39
3.3	Hipótesis	40
3.3.1	Hipótesis nula.	40
3.3.2	Hipótesis alternativa.	40
3.4	Variables.....	40
3.4.1	Variables Dependientes.....	40
3.4.2	Variables independientes.....	40
3.4.3	Variables intervinientes.....	41

3.5 Fases de la investigación.....	41
3.5.1 Reactivos	41
3.5.2 Cultivo celular	41
3.5.3 Infección con Adeno-HyPer	42
3.5.4 Registro celular de HyPer.....	43
3.5.4.1 <i>Imaging</i>	43
3.5.4.2 <i>Registro del pH intracelular</i>	43
3.5.5 Análisis de datos.....	45
4. Resultados y discusiones.....	46
4.1 Resultados.....	46
4.1.1 Las células endoteliales expresan el biosensor HyPer.....	46
4.1.2 Análisis de la respuesta a H ₂ O ₂ del Biosensor HyPer en células EOMA y TIME.	48
4.1.3 Cuánto afecta el pH intracelular en las distintas fases de señal de HyPer?	51
4.1.3.1 <i>Razón de fluorescencia BCECF en función del pH</i>	51
4.1.3.1.1 <i>Efecto del H₂O₂ sobre el pH intracelular</i>	52
4.1.3.2 <i>Estudio de la respuesta del biosensor a pHs controlados por sujeción con la mezcla de ionóforos, Valinomycin/Nigericina</i>	53
4.1.4 Tratamientos con antioxidantes.....	58
4.1.4.1 <i>Ácido Ascórbico</i>	58
4.1.4.2. <i>EUK-134</i>	65

4.1.5 Qué aspecto de la señal HyPer es mejor reportera de la capacidad antioxidante del microambiente celular?.....	72
4.1.6 Recuperación de la señal HyPer: reporta actividad reductora de enlaces disulfuro.....	75
4.2 Discusión.	77
4.2.1 Impacto de compuestos con potencial antioxidante: el ácido ascórbico (natural) y el EUK-134 (sintético).....	82
Conclusiones.....	866
Recomendaciones.....	88
Bibliografía.....	899