



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



GLUTATIÓN TRANSFERASA M2-2 PREVIENE LOS  
EFECTOS TÓXICOS DE AMINOCROMO EN UNA LÍNEA  
CELULAR DE ASTROCITOS HUMANOS (U373MG).

**PATRICIO ZAVALA FIGUEROA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de patología animal.

PROFESOR GUÍA : GUSTAVO A. FARÍAS

PROFESOR CONSEJERO: JUAN SEGURA AGUILAR

PROFESOR CONSEJERO: ENZO BOSCO

**SANTIAGO, CHILE**

**2008**

*Dedicada a mis Padres*

*Patricio y Leonarda*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero dar mis más profundos agradecimientos en primer lugar a mis Padres, por su abnegada paciencia, comprensión y apoyo durante todos estos años de estudio, gracias por comprender que detrás de cada línea de llegada, hay una de partida, que detrás de cada logro, hay otro desafío, gracias por permitirme dar vida a las ilusiones de niño que hoy se hacen realidad, sin el apoyo de ustedes nada hubiese logrado.

Quiero agradecer al Dr. Juan Segura Aguilar por darme la oportunidad y confianza para desarrollar mi tesis en su laboratorio, gracias por entregarme todas las condiciones y materiales para que esta tesis pudiera ser finalizada.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio, especialmente a Jorge Lozano por su ayuda y paciencia en enseñarme todas las técnicas de biología molecular que he adquirido, por sus consejos, sus críticas y sus retos, los cuales me han ayudado enormemente en mi formación científica y a la realización de esta tesis.

Gracias a Carolina Pérez por haberme ayudado en la síntesis de aminocromo para la realización de los experimentos de citotoxicidad.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Gustavo Farias, por la oportunidad de ofrecerme ser mi profesor guía en un momento de desorientación, gracias por revisar con paciencia este trabajo, por su tiempo y por contribuir con sus clases a mi formación profesional.

Quiero agradecer muy especialmente a Andrea Morales, mi querida negra, que durante todo este tiempo tuvo la paciencia suficiente para apoyarme profundamente, para darme su comprensión, su cariño y su amor. Gracias por hacer de estos momentos un verdadero vivir.

Por último quiero dar las gracias a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos aquellos que me ofrecieron su ayuda en tiempos difíciles, a todos aquellos que han puesto de su parte para que el trajín diario sea más llevadero y muy en especial a la vida y a Dios por permitirme cumplir todos mis anhelos.

## **FINANCIAMIENTO.**

El presente trabajo de tesis fue financiado por los siguientes proyectos y becas de investigación.

Proyecto FONDECYT 1061083, Dr. Juan Segura Aguilar

Estudios acerca del mecanismo molecular de la enfermedad de Parkinson: posible rol neuroprotector de la DT-Diaforasa y Glutation transferasa M2-2 en cultivos celulares y asociación de coexistencia de polimorfismo de DT- Diaforasa y alfa-sinucleína con la enfermedad de Parkinson.

Beca Fogarty Internacional Research Collaboration Award (FIRCA), RCA R03 TW07044-01. Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile.

## **CONTENIDOS.**

<b>1.- RESUMEN.</b>	<b>2</b>
<b>2.- INTRODUCCIÓN.</b>	<b>4</b>
<b>3.- REVISIÓN BIBLIOGÁFICA.</b>	<b>5</b>
<b>3.1.- Enfermedad de Parkinson.</b>	<b>5</b>
<b>3.2.- Importancia de los astrocitos en el sistema Nervioso central.</b>	<b>7</b>
<b>3.3.- Oxidación de la dopamina.</b>	<b>9</b>
<b>3.4.- Glutación transferasas.</b>	<b>11</b>
<b>3.5.- GST M2-2 y su función neuroprotectora.</b>	<b>11</b>
<b>4.- HIPOTESIS.</b>	<b>14</b>
<b>5.- OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>14</b>
<b>5.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>14</b>
<b>6.- MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>15</b>
<b>6.1.- Características del modelo celular empleado.</b>	<b>15</b>
<b>6.2.- Cultivo celular.</b>	<b>15</b>
<b>6.2.1.- Caracterización de la Glutación transferasa M2-2 en la línea celular U373MG utilizando RT-PCR.</b>	<b>16</b>
<b>6.2.1.1.- Extracción del RNA.</b>	<b>16</b>
<b>6.2.1.2.- Control de concentración y pureza del RNA.</b>	<b>17</b>
<b>6.2.1.3.- Transcripción reversa.</b>	<b>17</b>
<b>6.2.2.- Cuantificación de la expresión del gen GST M2-2.</b>	<b>17</b>
<b>6.3.- Caracterización de la línea celular U373MG utilizando Inmuno Western Blot.</b>	<b>18</b>
<b>6.3.1.- Preparación de extractos de proteína para su análisis por Inmuno Western Blot.</b>	<b>18</b>
<b>6.3.2.- Inmunodetección mediante Western Blot.</b>	<b>18</b>
<b>6.3.2.1.- Resumen de anticuerpos y condiciones de incubación en Inmuno Western Blot.</b>	<b>19</b>
<b>6.4.- Ensayos de Inhibición de la enzima GST M2-2.</b>	<b>19</b>
<b>6.4.1.- Descripción del vector usado.</b>	<b>19</b>

6.4.2.- Descripción del plasmidio y alineamiento de los oligonucleótidos (siRNA).	20
6.4.2.1.- Clonamiento de los oligonucleótidos en el vector.	21
6.4.2.2.- Preparación de bacterias competentes.	21
6.4.2.3.- Trasformación de bacterias.	21
6.4.2.4.- Purificación de plasmidios y secuenciación.	22
6.5.- Ensamblaje de Retrovirus.	23
6.5.1.- Fugene HD.	24
6.5.2.- Transducción de células U373MG.	24
6.5.3.- Selección con antibióticos.	24
6.6.- Purificación de aminocromo.	25
6.6.1.- Evaluación de muerte celular.	25
Análisis estadístico.	25
7.- RESULTADOS.	26
7.1.- Estudios sobre la GST M2-2 en la línea celular U373MG.	26
7.2.- Ligamiento de los RNA interferentes (siRNA) al plasmidio pSUPERretro.	27
7.3.- Comprobación de la eficacia del sistema de RNA interferente.	28
7.4.- Creación de líneas celulares estables.	30
7.4.1.- Determinación de la concentración mínima letal del antibiótico de selección para la línea celular U373MG.	30
7.5.- Resultados de Inhibición de la enzima GST M2-2.	30
7.6.- Resultados de los ensayos de toxicidad con aminocromo en la línea celular U373MG.	32
8.- DISCUSIÓN.	36
8.1.- El modelo celular U373MG.	37
8.2.- Sobre el sistema de RNA interferente (siRNA).	37
8.3.- Citotoxicidad inducida por aminocromo en la línea celular U373MG	39
8.4.- La función de los astrocitos en la neurodegeneración en C <sup>o</sup> nsideración a los resultados obtenidos	40

<b>9.- CONCLUSIONES.</b>	<b>41</b>
<b>10.- REFERENCIAS.</b>	<b>43</b>
<b>11.- ANEXOS.</b>	<b>49</b>
<b>Anexo 1.- Reactivos químicos.</b>	<b>49</b>
<b>Anexo 2.- Reactivos de biología molecular.</b>	<b>50</b>
<b>Anexo 3.- Anticuerpos, enzimas y reactivos relevantes.</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS.

<b>Figura 1. Ubicación del sistema nigroestriatal.</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2. Expresión del RNA mensajero de la GST M2-2 en la línea celular U373MG.</b>	<b>26</b>
<b>Figura 3. Caracterización de la expresión de la enzima GST M2-2 en células U373MG mediante Inmuno Western Blot.</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4. Ligamiento de los RNA interferentes (siRNA) al plasmidio pSUPERretro</b>	<b>28</b>
<b>Figura 5. Comprobación de la eficacia del sistema de RNA interferente</b>	<b>29</b>
<b>Figura 6. Caracterización de la inhibición de la enzima GST M2-2 en la línea de astrocitos U373MG mediante Inmuno Western Blot</b>	<b>31</b>
<b>Figura 7. Caracterización de la inhibición de la enzima GST M2-2 en la línea de astrocitos U373MG mediante RT-PCR</b>	<b>31</b>
<b>Figura 8. Representación gráfica de los ensayos de inhibición de la GST M2-2 en las células U373MG</b>	<b>33</b>
<b>Figura 9. incubación de células U373MG con una concentración fija de aminocromo.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 10. Experimentos de citotoxicidad con aminocromo en la línea celular U373MG.</b>	<b>35</b>
<b>Esquema 1. La oxidación de la dopamina.</b>	<b>9</b>
<b>Esquema 2. La reducción del aminocromo con un electrón.</b>	<b>10</b>
<b>Esquema 3. Conjugación de dopamina-<math>\alpha</math>-quinona y aminocromo con glutatión por la enzima GST M2-2.</b>	<b>12</b>
<b>Esquema 4. Mapa del plasmidio p SUPERretro.</b>	<b>20</b>



## 1.- RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue demostrar que la glutatión transferasa M2-2 humana (GST M2-2), protege a los astrocitos de los efectos tóxicos del aminocromo, ya que en estudios *in vitro* utilizando la enzima recombinante, se demostró que esta enzima conjuga aminocromo con glutatión reducido (GSH), formando un metabolito resistente a agentes oxidativos biológicos, bloqueando de esta forma los efectos neurotóxicos generados por aminocromo. GST M2-2 está presente en la sustancia *nigra* y en astrocitos. Para demostrar la función protectora de esta enzima, se infectó la línea celular de astrocitos humanos U373MG con retrovirus (*Gammaretroviridae*), los cuales llevan en su genoma un plasmidio con los RNA interferentes (siRNA), necesarios para generar una disminución total o parcial de la expresión de esta enzima. Se utilizaron tres siRNA, los cuales van dirigidos a distintas zonas del RNAm, con el fin de producir secuencias erróneas que impidan la síntesis de la proteína funcional. De los tres interferentes utilizados, todos ellos generaron una disminución de la expresión de la enzima GST M2-2 en diferente magnitud, uno de ellos, el denominado arbitrariamente siGST 6, logró una disminución de la expresión de la enzima de un 82%, siendo éste el mayor nivel alcanzado.

Para los ensayos de toxicidad se sintetizó y purificó aminocromo y se agregó a la línea celular de astrocitos humanos U373MG. Se realizó una curva de toxicidad utilizando diferentes concentraciones de aminocromo, (0, 50, 100, 200, 300 y 500 uM) y se evaluó su toxicidad tanto en la línea celular U373MG *wild type* como en la línea celular U373MG infectada con los distintos interferentes.

Los resultados sugieren que la línea celular U373MG *wild type* es más resistente a los efectos tóxicos generados por aminocromo, debido principalmente a la presencia de la enzima GST M2-2. En aquellas células infectadas con los interferentes se produjo una mayor mortalidad, directamente proporcional al grado de inhibición de la enzima GST M2-2, lo que demuestra y comprueba que esta enzima conjuga aminocromo y bloquea los efectos tóxicos de este.

## ABSTRACT

The aim of this work was to demonstrate that glutathione transferase human M2-2, protects the astrocytes of the toxic effects of aminochrome, since in vitro studies, using recombinant enzyme it was shown that this enzyme aminochrome combined with reduced glutathione forming a metabolite resistant to oxidative biological agents, thus blocking the neurotoxic effects generated by aminochrome.

GST M2-2 is present in the substance *nigra* and astrocytes. To demonstrate the protective function of this enzyme, the cell line was infected by human astrocytes U373MG with retroviruses (*Gammaretroviridae*), which carried in its genome with a plasmid interfering RNA (siRNA), a decrease needed to generate all or part of the expression of this enzyme. It used three siRNA, which are aimed at different parts of RNAm, with the aim of producing erroneous sequences that prevent protein synthesis functional. Of the three interfering used, all of them generated a decrease in the expression of the enzyme GST M2-2 in different magnitude, one of them, called arbitrarily siGST 6, achieved a reduction in the expression of the enzyme by 82%, being it reached the highest level.

For toxicity tests are synthesized and purified aminochrome and was added to the cell line of human astrocytes U373MG. We conducted a curve toxicity using different concentrations aminocromo, (0, 50, 100, 200, 300 and 500 uM) and assessed for toxicity in the cell line U373MG wild type as in the cell line U373MG infected with the various interfering.

The results suggest that the cell line U373MG wild type is more resistant to the toxic effects generated by aminochrome, mainly due to the presence of the enzyme GST M2-2. In those cells infected with interfering there was a higher mortality, directly proportional to the degree of inhibition of the enzyme GST M2-2, which shows and found that this enzyme combines aminochrome and blocks the toxic effects of this.

## 2.- INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la degeneración del sistema dopaminérgico nigro-estriatal, el cual tiene un importante rol en el control de funciones motoras y asociativas. Cada vez es más aceptada la participación del estrés oxidativo en el desarrollo de esta enfermedad. Se ha evidenciado ampliamente que la dopamina (DA) puede ser la causante de fuertes elevaciones en el estrés oxidativo, generando aminocromo, una quinona que pueden ser altamente tóxica si no se polimeriza formando neuromelanina.

Aunque es generalmente aceptado que los radicales libres están implicados en los procesos neurodegenerativos, que ocurren en las neuronas dopaminérgicas del sistema nigro-estriatal en la enfermedad de Parkinson, el mecanismo exacto de la neurodegeneración *in vivo*, es aún desconocido. En esta tesis se propone que la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigro-estriatal se debe entre otros factores, a la reducción de aminocromo con un electrón, generándose de esta forma el radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona, el cual es altamente reactivo con oxígeno. El posible mecanismo bajo el cual este radical induce la neurodegeneración del sistema dopaminérgico nigro-estriatal, puede deberse a una disminución del NADH o NADPH, desactivación de enzimas por oxidación de aminoácidos u oxidación de grupos thiol, desactivación de Ca-ATPasa, daño de membranas celulares por remoción de hidrógenos de membrana, lipoperoxidación y formación de radical superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Se propone además, que la enzima glutatión transferasa M2-2 previene los efectos tóxicos antes descritos, pues conjuga aminocromo con glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes presente en las células, evitando de esa forma la reducción de aminocromo con un electrón.

### **3.- REVISION BIBLIOGRAFICA.**

#### **3.1.- ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

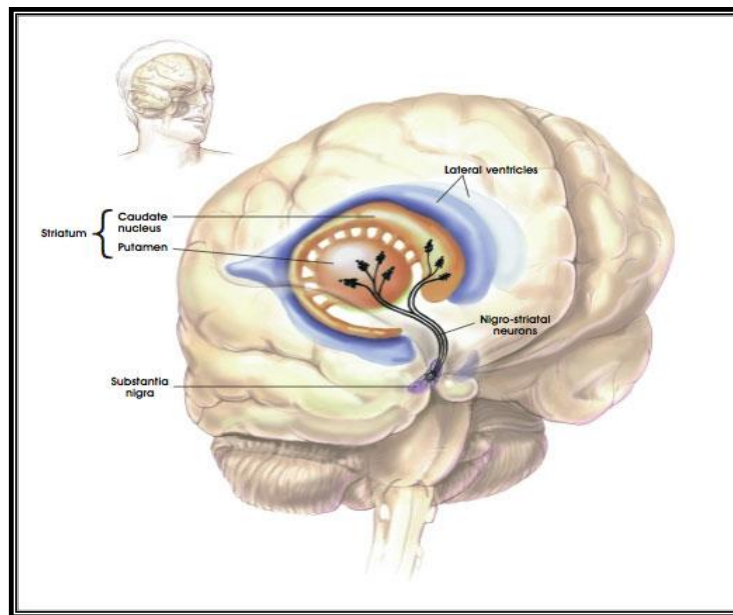
La enfermedad de Parkinson (EP), es un síndrome neurodegenerativo idiopático, descrito en 1817 por el médico inglés James Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la degeneración progresiva, de las neuronas que forman el sistema dopaminérgico nigro-estriatal, el cual está compuesto por la región compacta de la sustancia *nigra* (SN) y la región dorsal del cuerpo estriado del cerebro humano, (Figura 1). Este sistema participa en la coordinación y control de movimientos motores y para su normal funcionamiento necesita de la presencia de dos neurotransmisores; dopamina (DA) y acetilcolina, que actúan de modo antagonista. A su vez, este sistema está conectado con el globo pálido y el tálamo, participando de forma conjunta en la actividad motora originada en la corteza cerebral. Los pacientes con EP tienen un déficit primario de DA y al contrario, un aumento de acetilcolina, que provoca la inhibición del globo pálido y por lo tanto, una disminución de los estímulos a la corteza motora, que resulta finalmente en aquinesia o falta de movimiento.

Las neuronas dopaminérgicas del sistema nigro-estriatal de pacientes con EP presentan, además de neuromelanina, inclusiones citoplasmáticas eosinófilas denominadas cuerpos de Lewy, las cuales están formadas principalmente por una proteína llamada  $\alpha$ -sinucleína (Kahle *et al.*, 2002). La EP es asintomática por varios años, apareciendo los síntomas motores en el estado avanzado de la enfermedad, cuando están degeneradas aproximadamente el 80% de las neuronas del sistema dopaminérgico nigro-estriatal (Marsden, 1990); estos síntomas motores incluyen: rigidez muscular, temblores involuntarios, bradiquinesia, dificultad en el equilibrio y coordinación de los movimientos, aquinesia o falta de movimiento. Secundariamente pueden aparecer: depresión, trastornos emocionales y demencia.

En la actualidad, la EP es uno de los desórdenes neurodegenerativos más comunes en el mundo y afecta sobre un millón de personas en los EE.UU. (Olanow y Tatton, 1999).

En Chile, la prevalencia de la EP es de 1,9 casos por cada mil habitantes, lo que corresponde a un número aproximado de 30 mil personas afectadas, el 90% de las cuales tiene sobre 60 años de edad.

Las cifras indican que el 1% de las personas mayores a 60 años padecen la enfermedad y es infrecuente en personas menores de 40 años (Oficina de comunicaciones, Facultad de Medicina-Universidad de Chile).



**Figura 1. Ubicación del sistema nigroestriatal.**

El sistema nigro-estriatal se localiza a nivel del mesencéfalo, tiene su origen en la región compacta de la sustancia *nigra*, desde donde se proyectan fibras nerviosas hacia el núcleo caudado y el putamen. Este sistema es fundamental para la coordinación y control de movimientos motores.

El origen de la EP es desconocido. Sin embargo, mediante estudios epidemiológicos se han logrado identificar factores de riesgo asociados a la enfermedad, que pueden ser de tipo ambiental o genético (Tanner y Langston, 1999). Son factores de riesgo ambientales algunos pesticidas, herbicidas, productos químicos industriales, metales (manganeso, hierro y cobre), toxinas exógenas como cianuro, monóxido de carbono, disulfuro de carbono, solventes orgánicos, diluyentes y toxinas endógenas como tetrahidroisoquinolinas y beta-carbolinas (Olanow y Tatton, 1999).

Mediante estudios de ligamiento y de genética molecular, se han identificado mutaciones en genes que están asociados al desarrollo de EP, estos factores de riesgo de tipo genético, inducen el desarrollo de EP en un 10% del total de los pacientes afectados.

Se postuló que podría haber mutaciones que afecten genes que codifican enzimas que participan en la síntesis y metabolismo de DA. Los genes estudiados fueron para las enzimas: tirosina hidroxilasa, dopa descarboxilasa, glutatión peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa y los receptores dopaminérgicos D2, D3 y D4, donde no se encontraron mutaciones en pacientes con EP.

A pesar de los grandes esfuerzos de muchos grupos de investigación, la EP solo tiene tratamiento paliativo con L-Dopa, un fármaco precursor de DA, sin embargo sus beneficios solo duran 5 años; posteriormente los pacientes comienzan a experimentar efectos secundarios relacionados con alteraciones en la respuesta motora. También se han desarrollado otras terapias paliativas con agonistas dopaminérgicos y antagonistas colinérgicos. En la actualidad se investiga una posible terapia de reemplazo neuronal en la sustancia *nigra* utilizando neuronas fetales (stem cell).

### **3.2.- Importancia de los astrocitos en el sistema nervioso central.**

Los astrocitos son el grupo celular más abundante en el sistema nervioso central, con una variedad de funciones fisiológicas que aportan a la homeostasis del sistema (Dong y Benveniste, 2001). Por mucho tiempo se suponía que las neuronas actúan como unidades funcionales independientes (Bullock *et al.*, 2005), sin embargo estudios recientes revelan la existencia de comunicaciones intercelulares entre neuronas y astrocitos, indicando que existe un intercambio de moléculas a través de una conexión directa entre ambos tipos celulares (Alvarez-Maubecin, 2000).

Los astrocitos participan en la nutrición de las neuronas (Dringen *et al.*, 2001). Además en fenómenos de protección, excitación y modulación del crecimiento neuronal (Travis, 1994). En este contexto, es importante considerar las “*gap junctions*” (GJ) entre astrocitos y neuronas, que representan la forma más común de comunicación entre ambas células.

Las GJ están conformadas por proteínas de membrana, las cuales forman un canal permeable para iones y moléculas pequeñas que conectan los citoplasmas de células adyacentes (Goldberg *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2004). Se sabe que disturbios en las GJ entre astrocitos y neuronas, influyen en desordenes neurológicos tales como isquemia cerebral, neurodegeneración, migraña, edema cerebral (Benarroch, 2005).

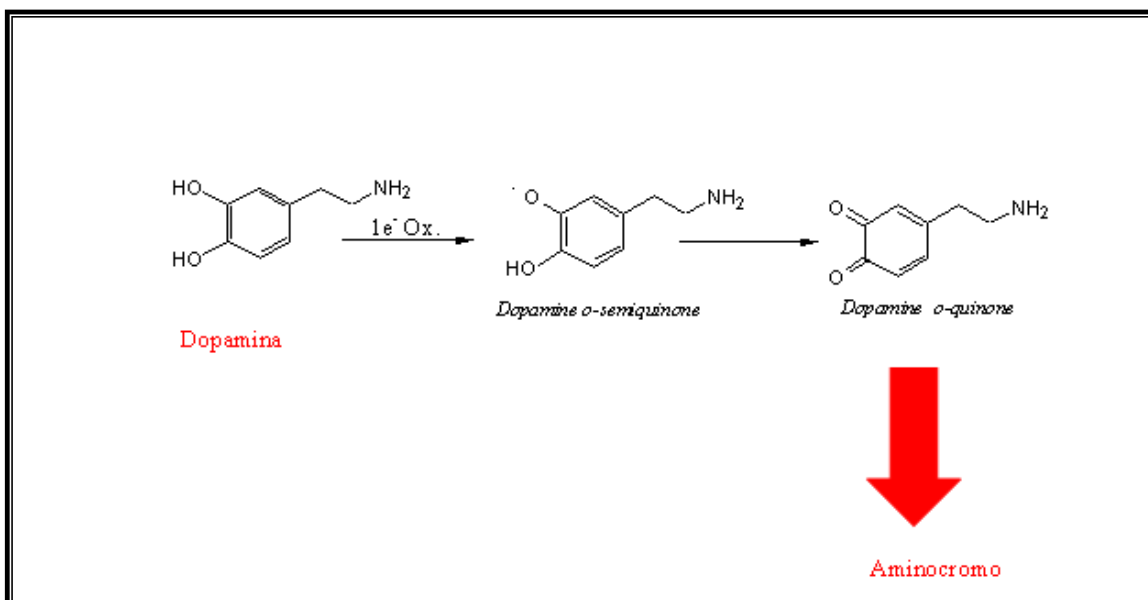
La formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el sistema nervioso central, es generalmente aceptado como una de las causas relacionadas a los procesos neurodegenerativos, debido a que el cerebro es más susceptible que otros órganos a un daño mediado por EROs durante el metabolismo aeróbico celular debido a: (I) alto consumo de oxígeno; (II) alto contenido en hierro; y (III) altos niveles de lípidos insaturados (Bharat *et al.*, 2002); además, se ha visto que uno de los principales agentes antioxidantes presente en las células, el Glutati6n reducido (GSH), varía su concentraci6n en las diferentes regiones del cerebro, siendo la sustancia *nigra*, la regi6n con las concentraciones m1s bajas (cortex > cerebellum > hipocampo > estriado > SN). Adem1s se sabe que las células gliales resisten m1s que las neuronas al estr1s inducido con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peroxinitrito, probablemente porque poseen concentraciones m1s elevadas de Glutati6n que las neuronas (Bolaños *et al.*, 1995).

Por el contrario, las neuronas dependen de precursores aportados por los astrocitos para sintetizar Glutati6n (Chen *et al.*, 2001). Existen varios trabajos que indican la funci6n protectora de los astrocitos en el cerebro y la importancia que tienen 1stos en el funcionamiento normal de las neuronas (Dringen *et al.*, 1999; Dringen *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2001.). Se ha observado que: (I) los niveles de EROs que dañan a neuronas, se ven disminuidos cuando se realiza un co-cultivo de neuronas y astrocitos (Dringen *et al.*, 2000); (II) la concentraci6n de GSH es aparentemente m1s alta en astrocitos que en neuronas (Dringen *et al.*, 2000); (III) se ha observado que neuronas en presencia de astrocitos aumentan significativamente su sntesis de GSH, lo cual sugiere un aporte de precursores desde los astrocitos a las neuronas, como los amino1cidos cisteina y glicina (Sagara *et al.*, 1993).

### 3.3.- Oxidación de la dopamina.

Experimentos *in vitro* han demostrado que la dopamina se oxida a un pH fisiológico, ya sea: (I) de manera espontánea en la presencia de oxígeno, (II) catalizada por metales de transición y/o (III) por enzimas con actividad peroxidasa. La dopamina se oxida a aminocromo, uno de los precursores de la neuromelanina (Zecca *et al.*, 2001). Esquema 1.

La oxidación de dopamina a aminocromo y su posterior reducción con un electrón, es una de las posibles fuentes de formación de radicales libres durante el proceso neurodegenerativo que ocurre en la enfermedad de Parkinson (Baez *et al.*, 1995; Segura-Aguilar *et al.*, 1998; Arriagada *et al.*, 2000; Segura-Aguilar *et al.*, 2001).



#### Esquema 1. La oxidación de la dopamina

La dopamina se oxida espontáneamente a dopamina *o*-semiquinona formando un intermediario inestable, dopamina *o*-quinona. La ciclización de la dopamina *o*-quinona a aminocromo es un proceso espontáneo e irreversible a pH fisiológico.

Existen resultados *in vitro* que demuestran que la formación de EROs en el metabolismo oxidativo de la dopamina, se relaciona con la reducción de aminocromo con un electrón al radical leucoaminocromo *o*-semiquinona (Baez *et al.*, 1995; Segura-Aguilar *et al.*, 1998; Arriagada *et al.*, 2000; Segura-Aguilar *et al.*, 2001.), que se ha descrito como una potente neurotoxina endógena (Esquema 2).

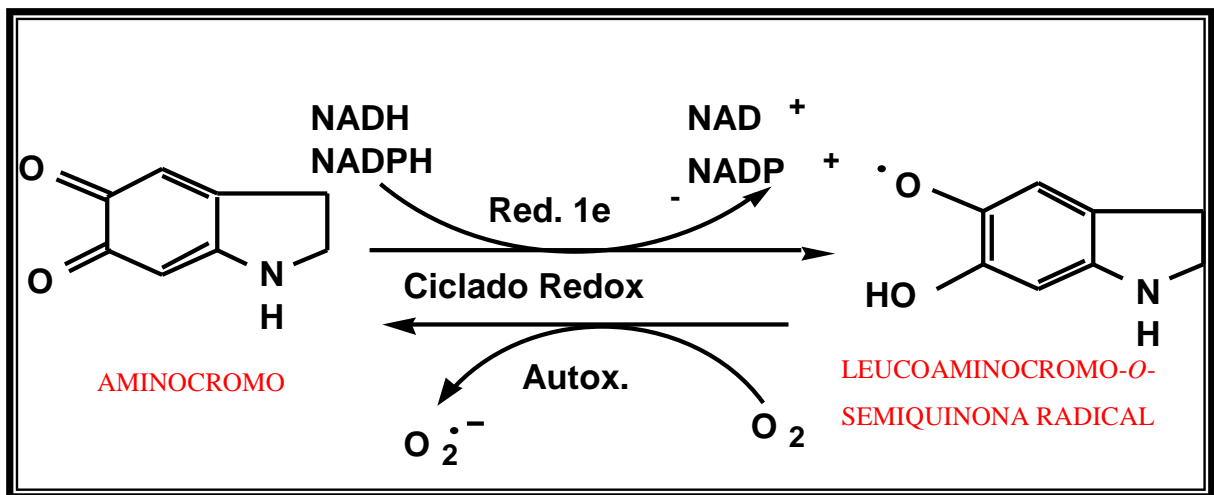


El aminocromo es reducido a leucoaminocromo-*o*-semiquinona por flavoenzimas, que transfieren un electrón como NADH citocromo P450 reductasa (Segura-Aguilar *et al.*, 1998).

El radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona es extremadamente reactivo, debido a que se autooxida a aminocromo reduciendo oxígeno a radical superóxido; en este proceso de redox cíclico, cantidades insignificantes de aminocromo pueden producir grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno.

El superóxido, se dismuta de forma enzimática o espontánea formando peróxido de hidrógeno, que es un precursor para la formación de radical hidroxilo, que es capaz de reaccionar con todas las biomoléculas (Graham, 2001).

La oxidación total del NADH, impide su utilización en la cadena respiratoria para generar energía (ATP), provocando efectos tóxicos como consecuencia de una crisis energética en la célula afectada.



**Esquema 2. La reducción del aminocromo con un electrón.**

El aminocromo es reducido con un electrón por flavoenzimas, con formación del radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona, que se oxida en presencia de oxígeno, generando gran cantidad de EROs en la célula afectada, depletándose por esta razón el NADH y/o NADPH.

### **3.4.- Glutación transferasas.**

Las glutación transferasas (GSTs), pertenecen a una familia de enzimas que catalizan la detoxificación de una variedad de endobióticos y xenobióticos, incluyendo carcinógenos, contaminantes ambientales, agentes anticarcinogénicos, antibióticos y productos de procesos oxidativos (Mannervik *et al.*, 1995), mediante la conjugación con Glutación reducido (GSH) y la formación de tioester. Los beneficios que traen las Glutación transferasas para el organismo corresponden a: en el caso de las sustancias hidrofóbicas, los productos de la conjugación son generalmente más solubles y menos tóxicos y por otra parte, la conjugación con Glutación, hace que el producto se transforme en un sustrato para enzimas de degradación y/o eliminación (Ishikawa, 1992).

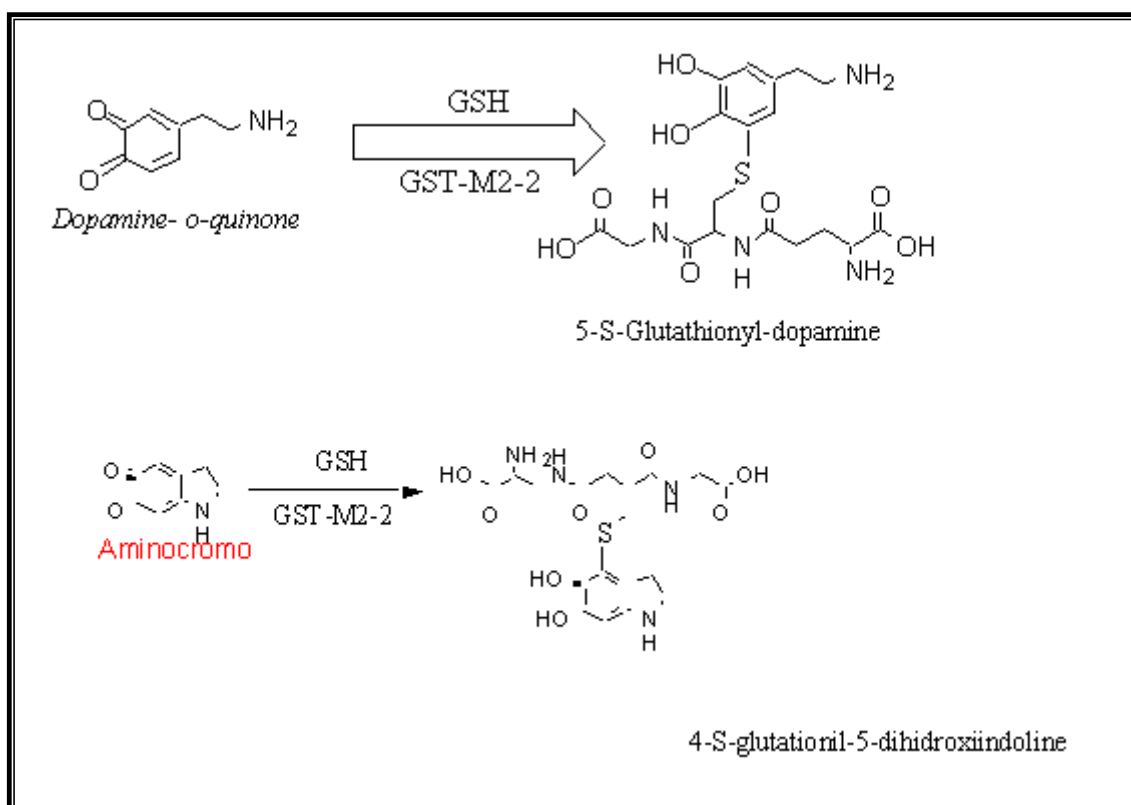
Se distinguen varias clases de GSTs citosólicas: *alfa*, *mu*, *pi*, *teta* y *sigma*. Además se ha descrito una clase de GSTs microsomal (Sheehan *et al.*, 2001). Todas las enzimas de la familia de la GSTs son diméricas y comparten una topología similar en el ensamblaje proteico, sin embargo, sus monómeros son funcionalmente independientes. Las glutación de la clase *mu* se caracterizan por un alto grado de homología; un ejemplo importante son las enzimas GST M1-1 y GST M2-2 humanas que tienen 84% de homología en sus secuencias nucleotídicas, pero las estructuras terciarias de los monómeros no son idénticas.

### **3.5.- GST M2-2 y su función neuroprotectora.**

Estudios *in vitro* usando las isoformas humanas de las GSTs, GSTM1-1 y GSTM2-2 de la clase *mu*, A1 y A2 de la clase *alfa* y P1-1 de la clase *pi* han demostrado que en particular, la isoforma GSTM2-2 humana, cataliza la conjugación de aminocromo con GSH con alta afinidad y eficiencia. A pesar de una homología en la secuencia nucleotídica de un 84% entre GSTM2-2 y GSTM1-1, exhiben una diferencia de afinidad de 100 veces por el sustrato aminocromo; en el caso del sustrato universal de las GSTs, el 1-cloro-2,4-dinitrobenzono (DCNB), se observó la misma tendencia, aunque no con una diferencia tan marcada. Por lo tanto, la catalización de GSTM2-2 en la reacción de conjugación de GSH y aminocromo, inhibe el proceso redox cíclico anteriormente descrito, evitando la formación del radical leucoaminocromo (Baez *et al.*, 1997; Segura-Aguilar *et al.*, 1997).

El producto que se forma, es un conjugado estable que es resistente a moléculas oxidantes como  $O_2$  y  $H_2O_2$  (Segura-Aguilar., *et al* 1997). Además, se ha demostrado la conjugación del precursor de aminocromo, la dopamina *o*-quinona, catalizada por la hGST M2-2 a 5-glutationil dopamina. Esta reacción de conjugación inhibe la formación de aminocromo. La 5-glutationil dopamina se metaboliza por la enzima gamma-glutamyl transpeptidasa ( $\gamma$ GGT) seguida por cisteinilglicinasa, formando 5-S-cisteinildopamina (Shen *et al.*, 1996). Se ha encontrado la presencia de 5-S-cisteinildopamina en el líquido cefalorraquídeo en el cerebro humano y también en zonas ricas en dopamina como el núcleo caudado, putamen, glóbulo pálido y sustancia nigra (Carstam *et al.*, 1991).

De esta manera, la hGST M2-2 sería importante para evitar la formación de EROs, porque conjuga dos productos primarios durante el proceso de oxidación de dopamina (Esquema 3).



**Esquema 3. Conjugación de dopamina-*o*-quinona y aminocromo con glutatión por la enzima GST M2-2.**

Las moléculas formadas producto de esta conjugación son depositadas en la neuromelanina o bien, eliminadas por la célula hacia el líquido cefalorraquídeo.

La hGST M2-2 se ha clonado a partir de una librería de genes de la sustancia *nigra* indicando su presencia en esta región del cerebro (Baez *et al.*, 1997b). Sin embargo la presencia de la enzima GSTM2-2 se ha demostrado principalmente en astrocitos de rata (Segura-Aguilar, comunicación personal).

Considerando la incidencia actual de las enfermedades neurodegenerativas, en específico la enfermedad de Parkinson, queda en evidencia que la búsqueda de una causa solamente en las neuronas es una simplificación de los hechos de su entorno biológico; el cual consiste en varios tipos celulares. Se sabe que los astrocitos responden específicamente en enfermedades neurodegenerativas y lesiones, a través de la limpieza de restos celulares, la liberación de factores tróficos y la formación de cicatrices.

Se ha propuesto que el rol neuroprotector de los astrocitos en la enfermedad de Parkinson dependería de la liberación de factores tróficos. (Unsicker, 2000). Sin embargo, en esta memoria de título se propone que el rol neuroprotector del astrocito esta dado por la presencia de la enzima GSTM2-2 y su capacidad detoxificante de metabolitos de la oxidación de la dopamina como aminocromo y dopamina-*o*-quinona. La acción protectora de GSTM2-2 permite que el astrocito sobreviva a agentes tóxicos como el aminocromo y pueda así, liberar factores tróficos que protegen a la neurona.

Todos estos antecedentes llevan a plantearse la siguiente hipótesis:

**4.- HIPOTESIS:** La Glutación transferasa M2-2 evita los efectos tóxicos del aminocromo en cultivo de astrocitos humanos U373MG.

**5.- OBJETIVO GENERAL.**

- Demostrar el papel neuroprotector de la Glutación transferasa M2-2 frente a los efectos tóxicos del aminocromo, disminuyendo la expresión de esta enzima a través de la utilización de siRNA (Short interferent RNA).

**5.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Producir una línea estable de astrocitos humanos que presenten una baja o nula expresión de Glutación transferasa M2-2, mediante la transducción de retrovirus que expresen siRNA para silenciar la expresión de GST M2-2.
- Realizar estudios de toxicidad con aminocromo, para demostrar el papel neuroprotector de GST M2-2 y el efecto inhibitor específico de siRNA contra GST M2-2 en cultivos celulares de astrocitos.

## **6.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **6.1.- Características del modelo celular empleado.**

Como modelo experimental se utilizó la línea celular U373MG, una línea celular humana proveniente de un astrocitoma maligno anaplásico grado III. El laboratorio cuenta con dicha línea celular gracias a una donación de la Universidad de Berkeley, California, USA. Esta línea celular fue eliminada de la “American Type Culture Collection” (ATCC) debido a similitudes genéticas con otra línea celular, sin embargo se continúan utilizando en estudios para comprobar la función y/o funcionalidad de astrocitos. Por ser una línea celular de origen tumoral avanzado, tiene características malignas, como por ejemplo una mutación del gen supresor de tumor p53 (Perego *et al.*, 2002). A pesar de las desventajas genéticas del modelo para la funcionalidad del ciclo celular, este modelo permite extrapolar los resultados a astrocitos normales.

### **6.2.- Cultivo celular.**

El cultivo de líneas celulares generalmente se realiza en condiciones estándar, que implican un control de temperatura a 37° C, un ambiente de humedad relativa de 100% y un mecanismo que ajusta la concentración CO<sub>2</sub> al 5%. En el laboratorio donde se realizó esta memoria, las incubadoras cumplen con las condiciones estándares antes señaladas. La línea celular de astrocitos U373MG fue cultivada en medio RPMI-1640 (ATCC), el cual contiene: 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 1mM piruvato de sodio, 4500 mg/L glucosa, y 1500 mg/L bicarbonato de sodio; suplementado con los siguientes compuestos: 10% de suero fetal bovino (Fetalclon III, Hyclon), penicilina G sódica 10 U/mL, sulfato de estreptomina 100 U/mL (Gibco<sup>tm</sup>) y el antimicótico anfotericina B 0,25 mg/mL. Las células crecieron y fueron subcultivadas en frascos plásticos T-25 ó T-75 (Nunc).

La línea celular Phoenix GP son derivadas de riñón embrionario humano (HEK 293), estas células presentan genes para Gag y Pol y permite incorporar un plasmidio para sintetizar la proteína env, necesaria para la formación de la envoltura del retrovirus.

Esta línea fue cultivada en DMEN (Invitrogen<sup>™</sup>), 4,5 g/L glucosa y 110 g/L piruvato sódico, se utilizaron los mismos antibióticos, las mismas concentraciones y condiciones que el medio antes descrito.

### **6.2.1.- Caracterización de la Glutación transferasa M2-2 en la línea celular U373MG utilizando RT-PCR.**

#### **6.2.1.1.- Extracción de RNA.**

Las células crecieron en frascos plásticos T-25 hasta llegar a una confluencia de 90-100%. Después de eliminar el medio de cultivo, se inicio el protocolo, lavando las células dos veces con PBS, para eliminar los residuos de medio de cultivo, seguido por la resuspensión en Trizol. Se realizó una incubación con este reactivo durante 5 min a temperatura ambiente, para permitir la disociación completa de los complejos nucleoprotéicos.

Se agregó 0,2 mL de cloroformo por mL de Trizol usado y se agitó manualmente durante 15 seg. Luego se centrifugó durante 15 min a 4° C a 12.000x g. La fase acuosa superior que contiene el RNA se transfirió a otro tubo y se le agregó 0,5 mL de alcohol isopropílico, se mezcló y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min y luego se centrifugó a 12.000x g a 4° C durante 15 min; este paso permite que el RNA precipite y aparezca como un pequeño *pellet* transparente. Finalmente, se realizó dos lavados de este *pellet* con etanol 75% frío y se centrifugó por 5 min a 7.500x g. El *pellet* de RNA purificado se dejó secar a temperatura ambiente para liberar el etanol y posteriormente se resuspendió en agua DEPC (Santa Cruz) que elimina las nucleasas. La medición de la concentración se realizó en un espectrofotómetro (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) usando la razón 260/280, utilizando 5 µL de muestra en 195 µL de agua DEPC. La concentración final de RNA obtenido se calculó a través de la siguiente ecuación:

Valor absorbancia x 40 x factor de dilución (40) = concentración RNA µg/µL.

### **6.2.1.2.- Control de concentración y pureza del RNA.**

Para confirmar la integridad del RNA y determinar la exactitud de su concentración, se corrió las muestras en un gel de agarosa al 1% en el tampón TAE (0,8M Tris base, 0,4M acetato sódico, 0,02 M EDTA, pH 8). Este procedimiento es importante cuando se desea realizar una transcripción reversa, seguida por una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Para esto se usó 1 µg de RNA por carril, mezclado con 4 µL de buffer de carga. Todos los RNAs fueron evaluados por posible contaminación con DNA usando un PCR directo.

### **6.2.1.3.- Transcripción reversa.**

Con el propósito de obtener más información del modelo de estudio, se evaluó la expresión de algunos genes de interés para caracterizar la línea celular U373MG mediante RT-PCR. Para sintetizar el DNA complementario (cDNA) a partir del RNA obtenido, se realizó una transcripción reversa, utilizando 1µg de RNA total y partidores específicos para GST M2-2: Forward 5´ gcc atc ctg cgg tac att gct 3´ y Reward 5´cag gca gct ggg ctc aaa tac 3´, a una temperatura de 65° C en un termociclador (Thermotech). La reacción para obtener el cDNA, se realizó en una mezcla de tampón de transcripción (25mM Tris-HCl, 37,5mM KCl, 1,5mM MgCl, 5mM DTT) y 1µL de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). La reacción duró 1 h a 37° C y terminó con una reacción de 10 min para la desactivación de la enzima.

### **6.2.2.- Cuantificación de la expresión del gen GST M2-2.**

De los productos obtenidos por PCR se usó 5 µL de muestra para su cuantificación. Los productos se cargaron en un gel de agarosa al 1,5% junto a los mRNA de actina como control. Se realizó una corrida en un tampón TAE durante 40 min a 80 Volt. Al terminar, se visualizó el gel en un transiluminador y se fotografió el gel. Las bandas fueron cuantificadas usando el programa Scion Image (Scion Cooperation, Maryland, USA). Las bandas se expresan en relación a los pixeles del control, que en este caso fue la beta actina.



### **6.3.- Caracterización de la línea celular U373MG utilizando Inmuno Western Blot.**

#### **6.3.1.- Preparación de extractos de proteína para su análisis por Inmuno Western Blot.**

Las células una vez crecidas en placas T-25, fueron removidas con 500  $\mu$ L de tripsina-EDTA, luego fueron peleteadas y lavadas dos veces con PBS frío e incubadas en hielo con un tampón de lisis de proteínas citoplasmáticas durante 30 min (10mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0,1mM EDTA, 0,5mM DTT, 0,1mM PMSF, 2  $\mu$ g/mL aprotinina, 2 $\mu$ g/mL leupeptina y 0,1% Triton X-100). Luego se centrifugaron a 21.000x g a 4° C durante 10 min, eliminándose el precipitado. Se cuantificó las proteínas del sobrenadante usando albúmina de bovino (BSA; Sigma) como estándar de calibración, midiéndose la absorbancia a 595nm mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Una vez conocida la concentración de proteínas, las muestras fueron alicuotadas con un tampón de carga (250mM Tris pH 6,8, 5% SDS, 6,7% glicerol (v/v), 0,5mg/mL DTT y 13,33mg/mL azul de bromofenol) y hervidas a 95° C por 5 min para denaturarlas y posteriormente congeladas a -20° C.

#### **6.3.2.- Inmunodetección mediante Western Blot.**

La separación electroforética de proteínas se realizó en condiciones denaturantes en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15%. Para su realización se utilizó el sistema Miniprotean (Bio-Rad); las proteínas se descongelaron en hielo y se cargaron 50 $\mu$ g en cada pocillo del carril del gel y se corrieron en un tampón que contiene (Tris 2,5mM, SDS 10%, Glicina 19mM) a 100 volt durante 2 h. La electro-transferencia de las proteínas, se realizó en una membrana de nitrocelulosa de un poro de 0,2  $\mu$ m (Bio-Rad) durante 90 min y para verificar la calidad de esta transferencia se realizó una tinción de la membrana con el colorante rojo Ponceau. Para bloquear las uniones no específicas, se incubó la membrana en una solución de leche descremada (Nestle) al 5%, en un tampón TBS (Tris base salino) por 2 h a temperatura ambiente con agitación suave, luego se lavó la membrana en un tampón TBS/Tween20 0,1% 3 veces y se dejó incubando con el anticuerpo primario para GST M2-2 (Invitrogen) durante toda la noche a 4° C.

Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.

Al terminar esta incubación, se lavó 3 veces con el tampón TBS/Tween20 0,1% y se reveló usando un reactivo de quimioluminiscencia (Santa-Cruz) durante 1 min en oscuridad y se expuso a un film fotográfico (Kodak) para su visualización (Figura 3).

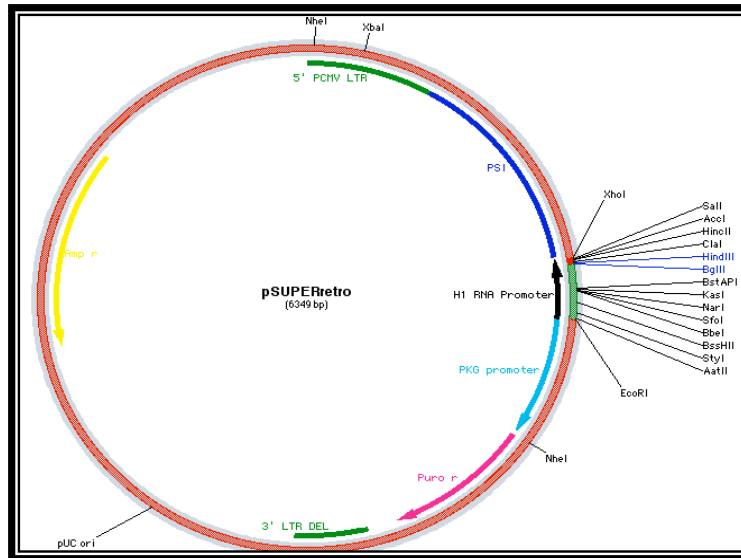
#### **6.3.2.1.- Tabla 1. Resumen de anticuerpos y condiciones de incubación en Inmuno Western Blot.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Tampón anticuerpo 1°</b>	<b>Tampón anticuerpo 2°</b>
<b>GST M2-2</b>	<b>Tampón TBS BSA 5%</b>	<b>Leche 5%, Tween20 0,1%</b>
<b>Actina</b>	<b>Tampón TBS BSA 5%</b>	<b>Leche 5%, Tween20 0,1%</b>

#### **6.4.- Ensayos de Inhibición de la enzima GST M2-2.**

##### **6.4.1.- Descripción del vector usado.**

Se utilizó como vector el plasmidio retroviral pSUPERretro (Invitrogen Corp. N° Catalogo VEC-PRT 0001), el cual posee un inductor fuerte de citomegalovirus río arriba cerca de la región promotora, que permite una transcripción del gen insertado en la región de clonamiento. El plasmidio posee elementos que son necesarios para su replicación episomal en mamíferos y posee un gen de resistencia a puromicina, que permite su selección en eucariontes y un gen de resistencia a ampicilina para su selección en bacterias (Esquema 4).



**Esquema 4. Mapa del plasmidio pSUPERretro.**

Representación esquemática del plasmidio pSUPERretro. Las características más relevantes se explican en el texto.

**6.4.2.- Descripción del plasmidio y alineamiento de los oligonucleótidos (siRNA).**

El método de introducción de un RNA doble hebra, ha demostrado en varios organismos ser un poderoso instrumento para reprimir la expresión de genes, a través de un proceso conocido como interferencia del RNA (siRNA). Para efectuar el silenciamiento de un gen concreto, el vector pSUPERretro, utiliza oligonucleótidos que entre otras características, poseen una única secuencia de 21 nucleótidos, los cuales son complementarios a los presentes en el RNAm durante la transcripción del gen, siendo éstos, el blanco para que actúen los oligonucleótidos clonados en el vector, generando de esta forma secuencias erróneas que llevarán a la degradación del RNAm formado y como consecuencia, la no producción de la proteína funcional, que corresponde en este caso a la enzima GST M2-2.

Para el alineamiento de los oligonucleótidos, (arbitrariamente denominados inserto 4, 5 y 6), se tomó una pareja de partidores de secuencia GGA AGC CTT GGC TTT TG y se agregó 1 µL de cada uno de ellos, más 48 µL de buffer de alineamiento para un volumen final de 50 µL, luego se llevaron al termociclador (Termotech) por 15 min y finalmente se dejaron los tubos en agua a una temperatura de 70° C hasta enfriar lentamente por 3 h.

#### **6.4.2.1.- Clonamiento de los oligonucleótidos en el vector.**

Para el clonamiento de los oligonucleótidos en el vector, se realizó la siguiente reacción: 4 µL de buffer de ligazón (Fermentas), 7,5 µL del inserto 4, 3 µL del vector pSUPERretro, 0,1 µL de la enzima ligasa (Promega) y 5 µL de agua libre de nucleasas. Se agitó la mezcla suavemente con pipeta y se dejó actuar a 4° C toda la noche. El mismo procedimiento se realizó para el inserto 5 y 6.

#### **6.4.2.2.- Preparación de bacterias competentes.**

Se incubó un inóculo estándar fresco de bacterias *E. coli* cepa DH5-α en un medio LB estéril (extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L, triptona 10 g/L) a 37° C con agitación orbital, hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,3 y 0,5 a 600 nm. Se centrifugaron a 4.100x g durante 5 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las bacterias en 0,5 volúmenes de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se centrifugaron nuevamente a 4.100x g durante 5 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante; luego se resuspendió cuidadosamente el sedimento obtenido en la mitad del volumen original de CaCl<sub>2</sub> 50 mM estéril y se incubó 30 min en hielo.

Se volvió a centrifugar a 4.100x g durante 5 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en un décimo del volumen original de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío y estéril. Las células competentes fueron usadas inmediatamente o bien almacenadas toda la noche a 4° C, para aumentar así su competencia. Para su conservación a -80° C se utilizó glicerol al 20%.

#### **6.4.2.3.- Transformación de bacterias.**

En un tubo de microfuga estéril, se mezclaron 50 a 100 ng de plasmidio pSUPERretro con el inserto, con 100 µL de células competentes y se incubó en hielo durante 30 min; se aplicó un *shock* térmico transfiriendo las bacterias a un baño de agua a 37° C durante 5 min y se devolvieron inmediatamente al hielo. Se transfirieron las células transformadas a un tubo de cultivo que contenía 900 µL de medio LB (sin antibióticos) y se incubaron durante 90 min a 37° C con agitación orbital (400 g).

Se sembraron entre 100 a 200 µL de células transformadas sobre una placa de medio LB sólido (Agar-Agar 15 g/L) con el antibiótico de selección ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron en estufa a 37° C durante 18 a 24 h.

Obtenidas las colonias, éstas se picaron y se inocularon en un tubo de cultivo con 10 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL).

#### **6.4.2.4.- Purificación de plasmidios y secuenciación.**

Para la purificación de los plasmidios se utilizó los *kits* Miniprep (Ultraclean, Mini Plasmid Prep *kit*) de Mo Bio Laboratory Inc. y (Hispeed Plasmid Midi *kit*) de Quiagen. Se centrifugaron las bacterias a 4.100x g a 4° C durante 10 min, se eliminó el sobrenadante de cada tubo y se centrifugaron a 4.100x g por 10 seg para eliminar todo el medio LB. El sedimento bacteriano obtenido de cada tubo, se resuspendió en 6 mL de tampón P1 de resuspensión (Tris base 3,72 grs, Na<sub>2</sub>EDTA 50 nM, pH 8, RNAasa 10 µg/mL), el cual entrega las condiciones para que ocurra la lisis.

Se llevó la solución a un tubo Falcon de 50 mL y se agregó 6 mL de tampón P2 de lisis (SDS 20%, NaOH 20nM), se incubó durante 5 min y se agregó el tampón P3 de neutralización (acetato de potasio 3,0 M, pH 5,5). A la solución resultante se le agregó 4 mL de tampón QBT, el cual entrega las condiciones para que la columna (Qi filter midi) retenga el DNA y se dejó actuar hasta que todo el líquido impregnó la columna, luego se agregó todo el lisado para que la columna retenga el DNA.

Se lavó con 20 mL de tampón QC, para limpiar el DNA de impurezas. Se eluyó con 5 mL de tampón QF. Se agregó 3,5 mL de isopropanol para precipitar el DNA y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.

Se colocó el Qi precipitador para recibir el DNA y se agregó tampón TE para que el DNA precipite, recolectándose finalmente en tubos y se cuantificó lo obtenido en un espectrofotómetro (Agilent 8453) a 260nm.

Se utilizaron enzimas de restricción específicas para el plasmidio, las cuales fueron Bgl II y Hind III. La utilización de estas enzimas de restricción tiene como propósito, determinar si el plasmidio aislado de la bacteria posee el inserto de interés, ya que el plasmidio al incorporar el inserto correctamente, pierde el sitio para BgLII, por lo tanto no corta con esta enzima. El producto obtenido de la digestión de estas enzimas se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

Para la secuenciación de los plasmidios, se enviaron dos muestras con una cantidad total de 200 ng a la Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

### **6.5.- Ensamblaje de Retrovirus.**

Para el ensamblaje de retrovirus se utilizó: Plasmidio pSUPERretro sin inserto que sirvió de control; Plasmidio pMDG que posee el inserto env que le permitirá al virus formar su envoltura; Plasmidio pSUPERretro que incorporó los oligonucleótidos para la formación del siRNA (short interfering RNA); Células empacadoras (Phoenix GP) que van a permitir el ensamble de todos los elementos necesarios para la formación del virus.

Previo a la transfección, se subcultivaron las células Phoenix GP hasta obtener una cantidad de  $1 \times 10^6$ , el recuento celular se realizó en la cámara de Neubauer.

Se mezclaron 6 µg de DNA plasmidial con el volumen necesario de medio sin suero, para un volumen final de 300 µL y se agregó 24 µL de reactivo Fugene HD (Roche).

Se mezcló la solución en vortex durante 2 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

Se recolectaron los sobrenadantes virales a las 24, 48 y 72 h post transfección y se filtraron en filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ ; se le agregó polibreno en una concentración final de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , el cual tiene como objetivo neutralizar las cargas negativas de la membrana plasmática del astrocito para que el virus ingrese más fácilmente. Se agregó el complejo viral-Fugene a la línea celular U373MG.

#### **6.5.1.- Fugene HD.**

El método de transfección con el reactivo Fugene HD consiste en un método lipídico catiónico. El protocolo del reactivo recomienda establecer primero la relación óptima entre Fugene y DNA plasmidial. Existen varias relaciones recomendadas: 3:2; 4:2; 5:2; 6:2; 7:2 y 8:2, siendo las cantidades de Fugene en  $\mu\text{L}$  y de DNA plasmidial en  $\mu\text{g}$ ; para el experimento se utilizó la relación 8:2, la transfección se realizó con células en fase proliferativa. Se sembraron las células en placas de 6 pocillos, se dejaron con la mitad de medio con suero (1 mL); se le agregó el complejo DNA plasmidial- Fugene, se incubó a 37° C por 1 h y luego se le agregó 1 mL de medio con suero.

#### **6.5.2.- Transducción de células U373MG.**

Se cultivó la línea celular U373MG en frascos T-75, hasta llegar a una confluencia aproximada de 40 a 50%; se agregaron 2 mL de cada sobrenadante viral obtenido a los diferentes tiempos. Luego de la transducción con el sobrenadante obtenido a las 48 h, se cambió el medio de cultivo con el propósito de que no se agote y se cultivaron por 24 h más.

#### **6.5.3.- Selección con antibióticos.**

Este método se usa para seleccionar aquellos astrocitos que han adquirido el virus y por ende, el plasmidio con el inserto. De esta forma, expresan la resistencia al antibiótico puromicina; así, todas las células que no fueron infectadas con el virus mueren, puesto que la puromicina es tóxica para las células eucariontes.

Se realizó una curva de sobrevivencia celular para probar varias concentraciones del antibiótico, en este caso se utilizaron 5 concentraciones diferentes (2; 4; 6; 8; 10 µg/mL), durante 48 h y posteriormente se cambiaron a un medio fresco.

Una vez realizada la curva de sobrevivencia, de aquellas células que fueron capaces de sobrevivir en la mayor concentración de puromicina, se tripsinizaron y se colocaron en pocillos más grandes para amplificar su número, hasta obtener la cantidad suficiente para realizar un Western Blot y así, caracterizar la inhibición de la enzima GST M2-2.

### **6.6.- Purificación de aminocromo.**

Para realizar los experimentos de toxicidad, se procedió a realizar la síntesis y purificación de aminocromo, para esto se incubó 5 mM de dopamina con 10 ng/mL de tirosinasa (Sigma) en distintos tampones acetato a temperatura ambiente por 4 h y se determinó espectroscópicamente la presencia de aminocromo y de melanina que es el producto de la polimerización de la dopamina, a una longitud de onda de 478 nm.

Se incubó la línea celular U373MG con este aminocromo en diferentes concentraciones (10, 50, 100, 200, 300, 500 µM). Como control, se utilizó células incubadas solamente con PBS.

#### **6.6.1.- Evaluación de muerte celular.**

Se determinó muerte celular, usando un *kit* de viabilidad/toxicidad (LIVE/DEAD de Molecular Probes), que consiste en un método fluorimétrico para diferenciar células vivas de muertas. Se agregó calceína AM y etídio homodímero-1 en una concentración de 0,5 µM y 5 µM respectivamente, se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La calceína se encuentra unida a un fluoróforo que le impedirá su salida de la célula otorgándole un color verde luego de su excitación, por su parte el etídio homodímero-1 ingresará solo al núcleo de células muertas entregando un color rojo, las células se visualizaron en un microscopio en fase contrastada y de fluorescencia. La muerte celular se midió como el porcentaje de células marcadas con etídio homodímero-1, a través de la siguiente fórmula: Muerte celular (%) =  $M * 100 / (M + V)$ , donde M es el número de células muertas y V el número de células vivas.



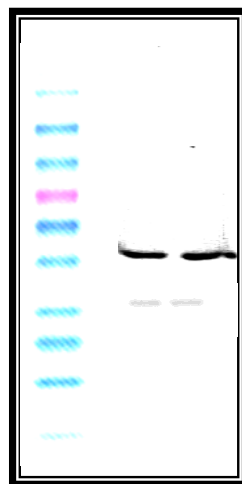
**Análisis estadístico.**

Los resultados se presentan como valores promedio estándar de la media. Todos los valores corresponden a un promedio de tres experimentos. La significancia estadística \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$  se determinó mediante el test de Student. Para el análisis estadístico se utilizó el programa computacional Sigma Plot. ([www.sigmaplot.com](http://www.sigmaplot.com)).

## 7.- RESULTADOS

### 7.1.- Estudios sobre la GST M2-2 en la línea celular U373MG.

La presencia de ésta proteína (enzima), se analizó utilizando dos técnicas de biología molecular; un RT-PCR y un Inmuno Wester Blot. Para determinar la presencia del RNAm de la enzima, se realizó en primer lugar una transcripción reversa de la polimerasa (RT-PCR) seguida de un PCR. Los resultados demuestran que la línea celular U373MG expresa la enzima GST M2-2, tal como se observa en la figura 2, donde se observa la presencia de su RNAm. La secuencia del producto del PCR, confirmó que corresponde en sentido y antisentido al cDNA de la GST M2-2. Para comprobar la presencia de la proteína GST M2-2, se utilizó la técnica de Inmuno Western Blot. Los resultados obtenidos demostraron la presencia de una banda, marcada con el anticuerpo específico para esta enzima, en la membrana de nitrocelulosa cargada con las proteínas extraídas de las células U373MG, sugiriendo por su tamaño y por la presencia de la enzima recombinante (control), la presencia de la enzima GST M2-2 en esta línea celular; resultado que es concordante con el obtenido del RT-PCR (Figura 3).



1 2 3

**Figura 2. Expresión del RNA mensajero de la GST M2-2 en la línea celular U373MG.** En un gel de agarosa al 1,5%, se cargó 5  $\mu$ L del producto del PCR, los carriles corresponden a lo siguiente: 1 marcador de peso molecular de 100bp, 2 y 3 arriba, dos muestras de la GSTM2-2; abajo, corresponde al control de beta actina (n = 2).

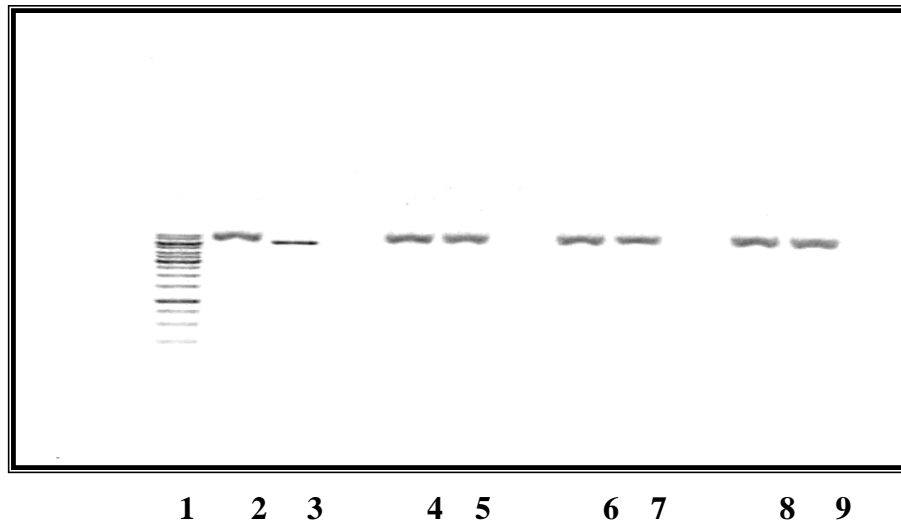


**Figura 3. Caracterización de la expresión de la enzima GST M2-2 en células U373MG mediante Inmuno Western Blot.**

Se muestra un gel de poliacrilamida al 15%. Los carriles corresponden a lo siguiente: 1 estándar de peso molecular de 1Kb; 2 proteína recombinante GSTM2-2. 3 extracto celular de la línea U373MG (40ug), correspondiente a la enzima GSTM2-2 (arriba) y al control de carga beta actina (abajo) (n = 2).

### **7.2.- Ligamiento de los RNA interferentes (siRNA) al plasmidio pSUPERretro.**

Con el propósito de determinar si el plasmidio pSUPERretro ha incorporado correctamente los oligonucleótidos de 21bp necesarios para la formación de los RNA interferentes, se realizó un corte de este plasmidio con la enzima de restricción Bgl II. Esta enzima de restricción tiene su sitio de acción en la región del plasmidio donde se insertan los oligonucleótidos; de esta forma si estos se incorporan correctamente al plasmidio, se pierde este sitio de restricción, por lo tanto al agregar la enzima Bgl II a la reacción, el plasmidio no cortará. Por el contrario si al aplicar esta enzima y el plasmidio corta, significa que el sitio de restricción se mantiene y por ende el plasmidio no incorporo los oligonucleótidos (Figura 4).



**Figura 4. Ligamiento de los RNA interferentes (siRNA) al plasmidio pSUPERretro.**

En un gel de agarosa al 1% se cargaron 3 $\mu$ L de cada plasmidio con los distintos siRNA, el orden de los carriles es el siguiente:

1: estándar peso molecular 1Kb; 2 y 3: control pSuper Retro vacío: carril 2 sin BgLI, carril 3 con BgLI; 4 y 5: short interferent 4: carril 4 sin BgLI, carril 5 con BgLI; 6 y 7: short interferent 5: carril 6 sinBgLI, carril 7 con BgLI; 8 y 9: short interferent 6: carril 8 sin BgLI, carril 9 con BgLI.

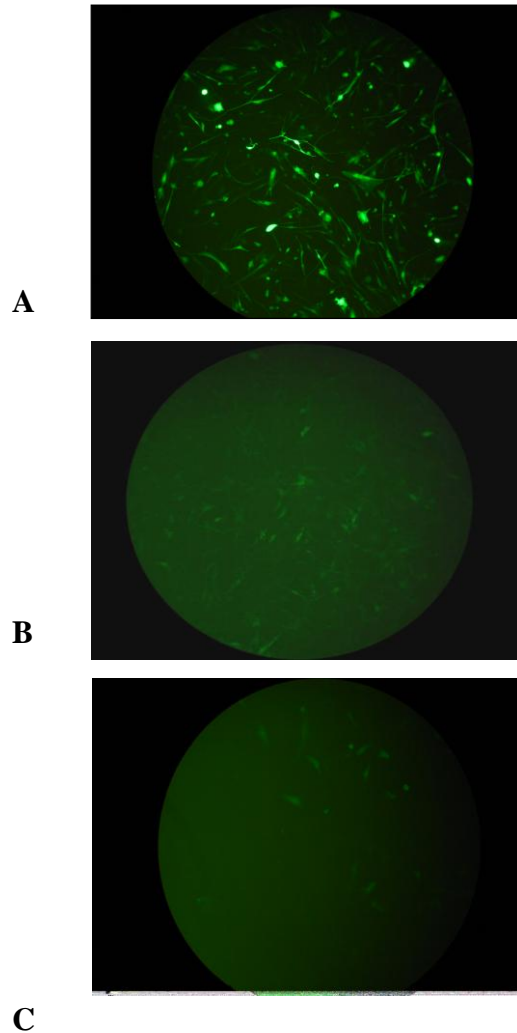
### 7.3.- Comprobación de la eficacia del sistema de RNA interferente.

Con el propósito de verificar la teoría y la eficiencia del sistema de RNA interferente, se creó una línea estable de astrocitos, con un plasmidio que codifica para una proteína fluorescente verde (GFP). Esta línea estable se logró a través de la utilización de retrovirus que llevan este plasmidio. Se recolectaron los sobrenadantes virales a las 24, 48 y 72 h y se infectaron los astrocitos, observando el resultado en un microscopio de epifluorescencia.

Una vez generada esta línea estable, se le agregó los sobrenadantes virales que llevaban en su genoma los oligonucleótidos (siGFP), necesarios para producir los interferentes contra esta proteína fluorescente verde. Los resultados demuestran que, de los sobrenadantes virales de las 24, 48 y 72 h, el de las 48 h presentó la mayor eficiencia para apagar la fluorescencia de esta línea celular (Figura 5).

Este experimento se realizó además, con el propósito de determinar la eficiencia de transfección de la línea celular U373MG, la cual a juzgar por los resultados obtenidos es de alrededor de un 60%, determinada por el número de células que expresan GFP.

Otro de los motivos fue extrapolar al experimento, el tiempo en que se produce la mayor inhibición de la proteína GFP.



**Figura 5. Comprobación de la eficacia del sistema de RNA interferente.**

A: Muestra la línea celular de astrocitos U373MG infectados con retrovirus que llevan el plasmidio con la proteína fluorescente verde (GFP).

B y C: Muestra la línea celular U373MG infectados con los retrovirus que llevan los interferentes para GFP (siGFP) obtenidos a las 24 y 48 h respectivamente.

#### **7.4.- Creación de líneas celulares estables.**

Para los estudios de inhibición de la enzima GST M2-2, se requiere de una línea de astrocitos que hallan sido infectados previamente con retrovirus y que lleven cada uno de los interferentes necesarios para producir una baja o nula expresión de la enzima,

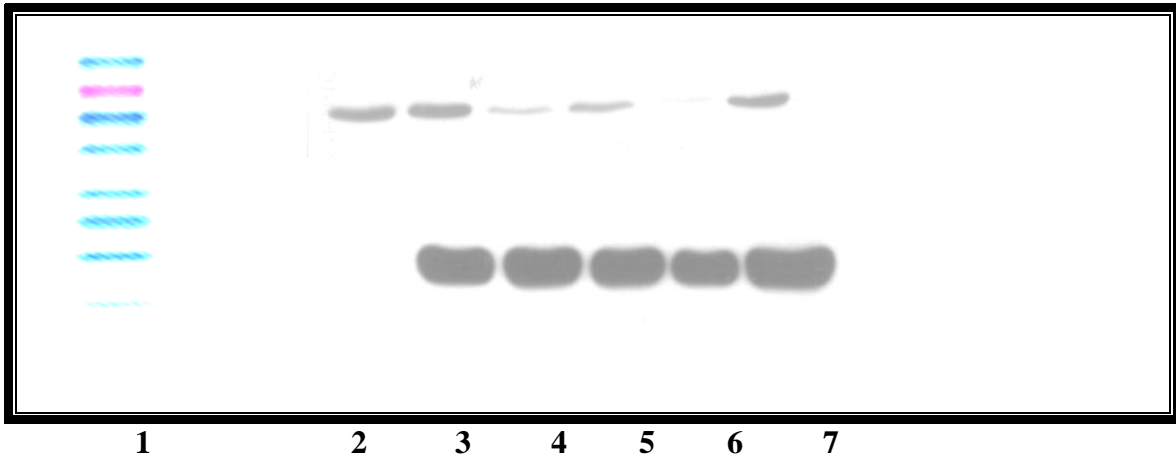
además de una línea celular con el plasmidio pSUPERretro vacío, que sirvió de control para determinar que este vector no interfiere por si mismo con la expresión de la enzima.

#### **7.4.1.- Determinación de la concentración mínima letal del antibiótico de selección para la línea celular U373MG.**

Para seleccionar aquellas células infectadas con los virus que contienen el plasmidio, se requiere establecer la concentración del antibiótico puromicina necesaria para matar la totalidad de las células *wild type*. Se realizó una curva de toxicidad usando concentraciones de 2; 4; 6; 8; 10 µg/mL durante 48 h. Después de 2 días de evaluación, se determinó que la concentración óptima de puromicina es de 6 µg. Las concentraciones inferiores no indujeron el resultado esperado.

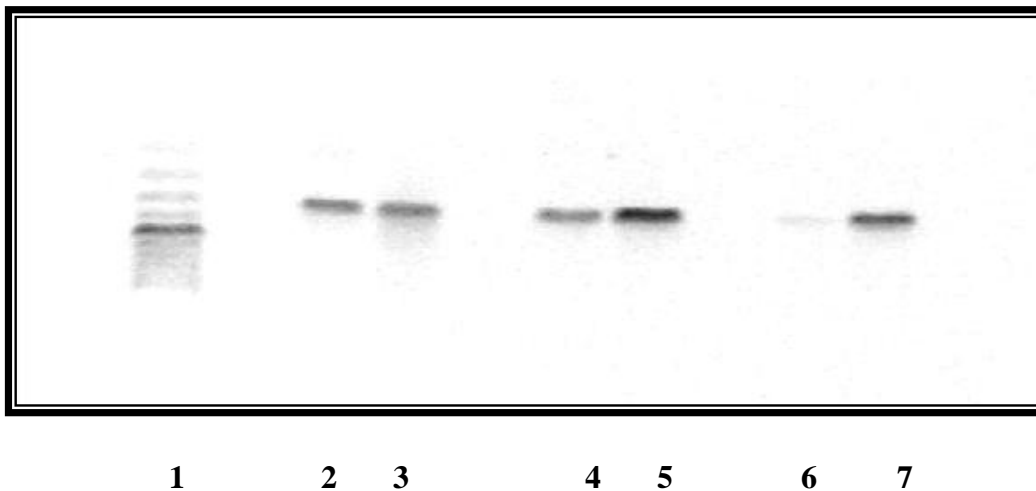
#### **7.5.- Resultados de Inhibición de la enzima GST M2-2.**

Una vez obtenidos los retrovirus a los diferentes tiempos, (24, 48 y 72 h), se realizó la infección de la línea celular U373MG a los mismos tiempos antes señalados. Luego de haber infectado la línea celular con el sobrenadante viral de las 72 h, se espero 24 h para la selección con el antibiótico puromicina. La caracterización de la inhibición de la enzima GSTM2-2, se determinó por Inmuno Western Blot y por RT-PCR. Los resultados obtenidos por Inmuno Western Blot demuestran que los tres interferentes utilizados produjeron una inhibición de la enzima, pero con diferencias entre ellos. El más eficiente en apagar la expresión de la enzima GSTM2-2, fue el denominado arbitrariamente siGST 6, el cual obtuvo una eficiencia de alrededor de un 82%, seguido por el siGST 4 con una eficiencia de alrededor de un 72%. Finalmente el siGST 5 fue el que logró el menor grado de inhibición con alrededor de un 45% de eficiencia (Figura 6). Los mismos resultados mencionados anteriormente fueron ratificados a través de un RT-PCR (Figura 7).



**Figura 6. Caracterización de la inhibición de la enzima GST M2-2 en la línea de astrocitos U373MG mediante Inmuno Western Blot.**

Gel de poliacrilamida al 15%, se cargaron 50ug de proteína en cada carril, los números corresponden a lo siguiente: 1 estándar de peso molecular de 1Kb; 2 recombinante GSTM2-2 (Control); 3 GST M2-2 en células U373MG sin interferentes; 4 células U373MG con siGST 4; 5 células U373MG con siGST 5; 6 células U373MG con siGST 6; 7 células con el plasmidio pSUPERretro. Abajo 3 al 7 beta actina.



**Figura 7. Caracterización de la inhibición de la enzima GST M2-2 en la línea de astrocitos U373MG mediante RT-PCR.**

Gel de agarosa al 1,5%, se cargaron 5uL de proteína en cada carril, los números corresponden a lo siguiente: 1 estándar de peso molecular de 100pb; 2 interferente siGST 4; 3 control U373MG; 4 siGST 5; 5 control U373MG; 6 siGST 6; 7 control U373MG.

### **7.6.- Resultados de los ensayos de toxicidad con aminocromo en la línea celular U373MG.**

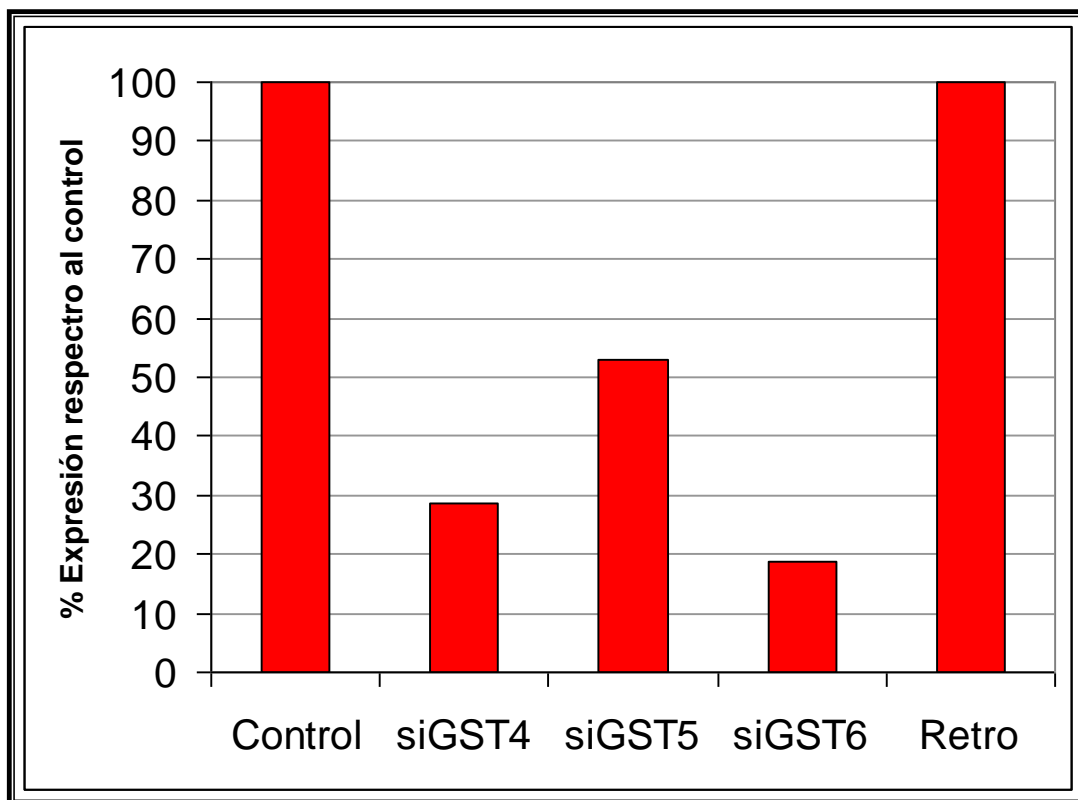
Para comprobar el efecto neuroprotector de la enzima GST M2-2 frente a los efectos tóxicos generados por aminocromo, se incubó la línea celular U373MG con aminocromo en diferentes concentraciones, (0, 50, 100, 200, 300 y 500  $\mu\text{M}$ ). Los resultados demuestran que el tratamiento de la línea celular U373MG sin interferentes (*wild type*) tuvo una baja mortalidad celular hasta los 200  $\mu\text{M}$  (11,9%), aumentando ésta considerablemente al ser incubadas a una concentración de 300  $\mu\text{M}$ . (89,5%) (no se muestra), esto puede ser explicado por una saturación del sistema enzimático. Debido a este resultado, se decidió proseguir con los experimentos de toxicidad con una sola concentración de aminocromo de 200 $\mu\text{M}$ , pues hasta esta concentración se demostró una baja mortalidad celular. Los resultados obtenidos al incubar la línea celular con el interferente siGST 4, demostraron una mortalidad de 43,4%, para el interferente siGST 5 demostraron una mortalidad de 28,9% y para el interferente siGST 6 de un 65,21% (Figura 9).

Estos resultados al ser analizados por el programa Sigma Plot, demostraron diferencias significativas entre las tres condiciones (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) y las *wild type*.

Al realizar los experimentos de toxicidad con aminocromo (200 $\mu\text{M}$ ), en la línea celular U373MG sin interferentes, demostraron un nivel de mortalidad celular muy cercano a los obtenidos en esta misma línea sin tratamiento con aminocromo (Control), estos resultados demuestran que, entre estas dos condiciones no existen diferencias significativas (\*  $p > 0,05$ ), lo que sugiere un efecto protector de la enzima GST M2-2 presente en las células sin interferentes. Por otra parte, se analizó el efecto del plasmidio pSUPERretro sobre la mortalidad celular, incubándose células sólo con este plasmidio.

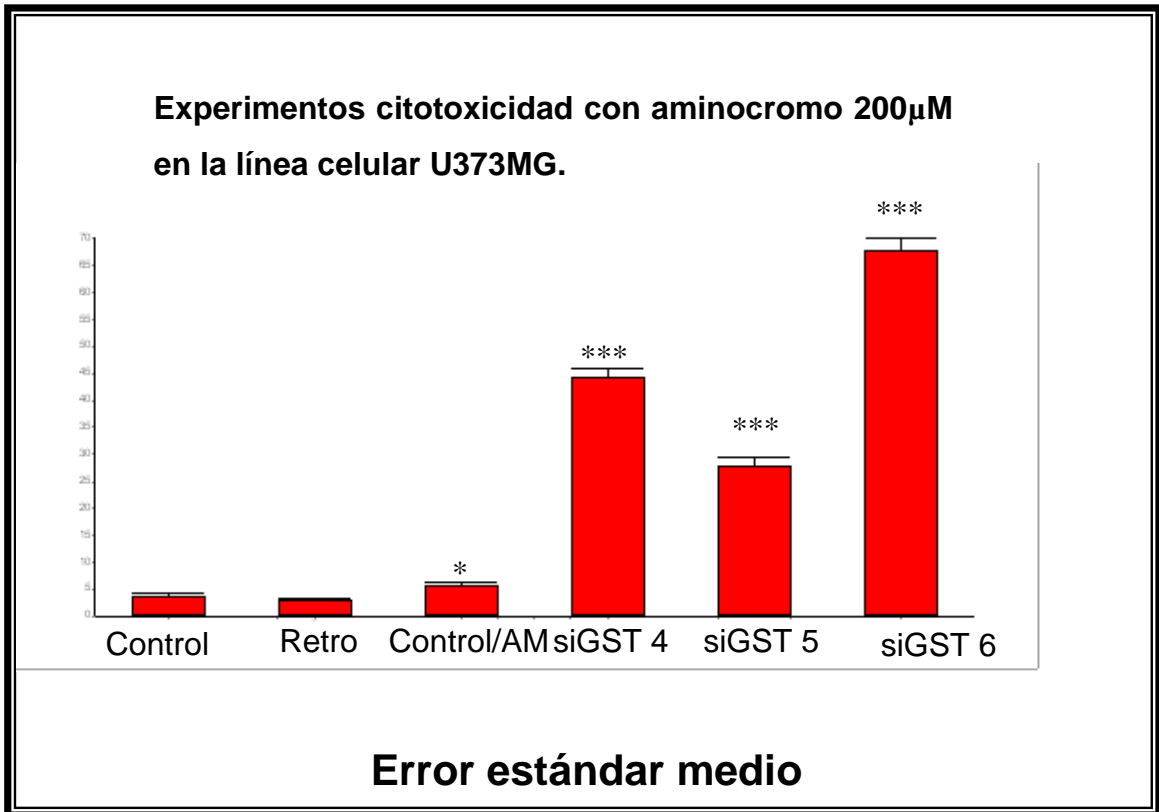
Los resultados demuestran una mortalidad de 2,89%, la cual al ser comparada con las células U373MG control, no presenta diferencias significativas entre ellas (\*  $p > 0,05$ ) (Figura 8). Este resultado demuestra que el plasmidio por si mismo, no tiene ningún efecto sobre la mortalidad de la línea celular U373MG.





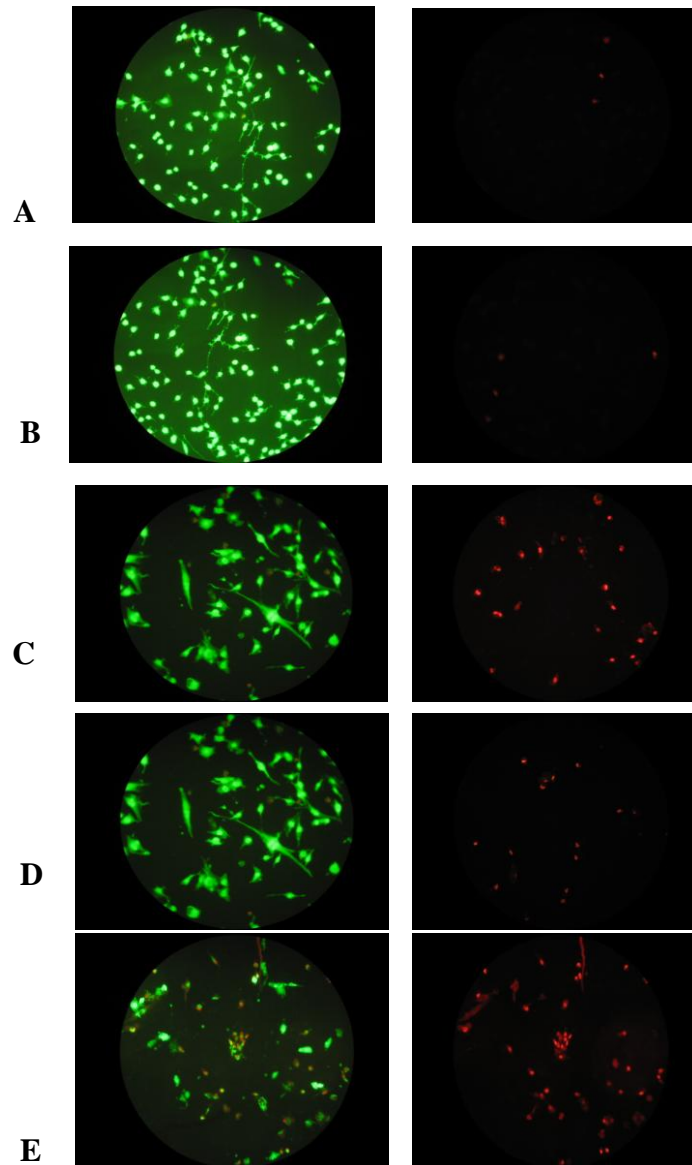
**Figura 8. Representación gráfica de los ensayos de inhibición de la GST M2-2 en las células U373MG.**

Nivel de expresión de la GST M2-2 respecto al control, infiriéndose por ende, el grado de inhibición alcanzado en cada condición (n = 3).



**Figura 9.** incubación de células U373MG con una concentración fija de aminocromo.

Células U373MG incubadas con aminocromo durante 24 h a 37° C y evaluadas con el método Live/Dead. Se muestran diferencias significativas ( $p^{***}<0,001$ ) entre los tratamientos con los distintos interferentes y el control ( $*p>0,05$ ). Los resultados corresponden a  $n = 3$  experimentos.



**Figura 10. Experimentos de citotoxicidad con aminocromo en la línea celular U373MG.**

Se incubaron los astrocitos con una concentración de 200 $\mu$ M de aminocromo, las figuras corresponden a lo siguiente: (verdes = vivas, rojas = muertas).

A: astrocitos sin interferentes (*wild type*).

B: astrocitos incubados con el plasmidio pSUPERretro vacío.

C: astrocitos con el interferente siGST 4.

D: astrocitos con el interferente siGST 5

E: astrocitos con el interferente siGST 6.

## 8.- DISCUSIÓN.

Dentro del grupo de las enfermedades neurodegenerativas, una de las más importantes es la enfermedad de Parkinson, causada por la pérdida de un grupo de neuronas que sintetizan el neurotransmisor dopamina. Las neuronas dopaminérgicas representan un grupo pequeño de todas las neuronas del cerebro (Iversen, 2007), pero debido a la especificidad de este sistema, estas pocas células tienen una influencia fundamental en el control de movimientos motores.

El neurotransmisor dopamina, es una molécula fácilmente oxidable a pH fisiológico frente a la presencia de oxígeno y el producto de esta oxidación, aminocromo es el precursor de la neuromelanina (Spencer *et al.*, 1998), sin embargo, aminocromo puede bajo ciertas condiciones, inducir efectos tóxicos. Este hecho explica porque su metabolismo está estrictamente controlado.

La presencia de neuromelanina, es una de las características específicas de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la sustancia *nigra*. La neuromelanina es el depósito de productos derivados de la oxidación de dopamina formada al interior de la neurona, en la cual, las concentraciones de glutatión son bajas (Zoccarato *et al.*, 2005).

Las GSTs son las principales responsables de la conjugación de dopamina-*o*-quinona y del aminocromo con glutatión. Por lo tanto, de alguna manera el metabolismo de la dopamina, debe ser uno de los factores más relevantes en precondicionar a las neuronas a su vulnerabilidad.

En el cerebro hay una variedad de diferentes células que conviven en un espacio reducido, con una estrecha dependencia de una célula con la otra; este hecho explica, por qué en los últimos años las células gliales, sobre todo los astrocitos han adquirido mucho interés en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas (Shih *et al.*, 2003). En esta memoria, se estudió principalmente la función neuroprotectora de la GST M2-2 humana, en el metabolismo oxidativo de la dopamina.

### **8.1.- El modelo celular U373MG.**

Como modelo de estudio se utilizó una línea celular de un astrocitoma maligno grado III. Esta línea se usa generalmente para investigaciones vinculadas a la oncología, sobre todo en estudios sobre el tratamiento de astrocitomas invasivos. La información publicada sobre las condiciones de cultivo de estas células, se estandarizó para ser usada en nuestro laboratorio, pues éste cuenta con un sistema de ventilación de CO<sub>2</sub> al 5%, siendo el requerimiento de estas células de un sistema de ventilación de CO<sub>2</sub> al 10%. A pesar de esta diferencia, las células una vez que se adherían a la placa de cultivo, comenzaban su crecimiento proliferativo sin inconvenientes.

### **8.2.- Sobre el sistema de RNA interferente (siRNA).**

El campo del siRNA ha crecido de forma exponencial. El descubrimiento de la compleja cascada de mensajeros involucrados con el siRNA, ha permitido desenmascarar una novedosa forma de regulación génica, mediada por el RNA de doble hebra. Este descubrimiento ha permitido posicionar al RNA, como una molécula mucho más versátil de lo que inicialmente se pensó. La introducción de un RNA de doble hebra en una célula u organismo, inicia una compleja cascada de eventos, los cuales culminan con la degradación del RNA mensajero de secuencia homóloga al RNA de doble hebra originalmente introducido. La primera fase del complejo de silenciamiento, está a cargo de una ribonucleasa tipo 3 denominada DICER, esta ribonucleasa, fragmenta el RNA doble hebra en pequeños fragmentos de 21-25 nucleótidos de longitud, los denominados siRNA. Estos siRNA inducen la formación de un complejo proteico denominado RISC (RNA Induced Silencing Complex), RISC posee una helicasa, la cual se encarga de separar las dos hebras del siRNA. Durante este paso, RISC puede quedarse con la hebra sentido o anti-sentido, de quedarse con la hebra sentido no ocurrirá la degradación de RNA mensajero, de hecho es esta la razón de que muchas secuencias de siRNA no inducen interferentes. El mecanismo por el cual RISC determina con cual hebra quedarse es complejo, pero estudios parecen indicar que la helicasa de RISC se queda con la hebra del siRNA que sea más fácil de abrir en el extremo 5', es decir con el extremo que presente la menor cantidad de Guaninas, en sus últimas 4 bases apareadas.

Una vez que RISC se queda con la hebra antisentido, una proteína homóloga a DICER que posee actividad de nucleasa, se encarga de degradar el RNA mensajero, cuyo resultado es la disminución de la proteína en particular.

En esta memoria, con el fin de lograr la inhibición total o parcial de la enzima GST M2-2, no se introdujo a la línea celular U373MG un RNA doble hebra, como lo señala la teoría del siRNA anteriormente descrita, sino que se ligaron al plasmidio pSUPERretro los pequeños fragmentos de oligonucleótidos de 21pb de longitud, necesarios para producir la degradación del RNA mensajero. Estos oligonucleótidos fueron diseñados por TAG Copenhagen A/S, este diseño no permitía saber a priori a que regiones exactas del RNA mensajero iban dirigidos estos oligonucleótidos, lo único que sabíamos era que cada siRNA iban dirigidos a diferentes zonas del RNA mensajero, por lo tanto, esto no permite saber de antemano la eficiencia y el éxito de cada uno de ellos. Se diseñaron tres siRNA, denominados arbitrariamente siGST 4, siGST 5 y siGST 6; todos ellos lograron una disminución en la expresión de la enzima GST M2-2 en diferente magnitud. Las razones exactas de estas diferencias, no las sabemos con seguridad, pero pueden ser explicadas, debido al complejo mecanismo de traducción que tienen las proteínas al salir del núcleo hacía el citoplasma, específicamente hacía los ribosomas.

En términos simples, el RNA mensajero que sale del núcleo celular no es una estructura lineal, sino por el contrario, la secuencia de aminoácidos que presenta un RNA mensajero va a determinar su estructura primaria, secundaria o terciaria. El RNA mensajero de la GST M2-2 posee una estructura terciaria compleja no lineal, probablemente el siGST 5, que fue el que logró una menor eficiencia de inhibición, los oligonucleótidos blancos para este interferente, se encontraban en zonas menos expuestas de la cadena del mensajero, impidiendo de esta forma un buen acoplamiento de los interferentes y por ende, lograron una degradación parcial del mensajero formado. Por el contrario, el siGST 6 logró la mayor inhibición de la enzima, probablemente este interferente tenía sus oligonucleótidos homólogos en regiones mas expuestas del mensajero, lo que permitió una mayor acoplamiento de estos interferentes a su secuencia homóloga, generando de esta forma un mayor grado de inhibición.

### **8.3.- Citotoxicidad inducida por aminocromo en la línea celular U373MG.**

La mayoría de los trabajos realizados en astrocitos, tienen como objetivo determinar la importancia que tienen estas células en la mantención del estado redox, con la participación de la glutatión, el cual es uno de los principales agentes antioxidantes presente en diversas células. El glutatión aporta precursores esenciales a las neuronas que no tienen las enzimas necesarias para su síntesis (Bharat *et al.*, 2002).

El glutatión es un tripéptido, que existe intracelularmente en un estado reducido (GSH) u oxidado (GSSG). Para la célula es crítico mantener el estado redox de GSH:GSSG en una razón óptima, una concentración deficitaria de GSH significa la muerte de la célula. No sorprende por lo tanto, que exista una variedad de enfermedades que se caracterizan por una deficiencia de GSH, como los desordenes neurodegenerativos y el proceso fisiológico del envejecimiento (Townsend *et al.*, 2003). Existen varias investigaciones que asocian una disminución en los niveles de GSH con la progresión de enfermedades neurodegenerativas, debido a que la cantidad remanente de GSH es sobrepasada por los EROs formados, por ejemplo en la enfermedad de Parkinson. Es probable que el astrocito se proteja a si mismo, de los productos citotóxicos de la dopamina (aminocromo) y los elimine a través de las GSTs, depletando cantidades importantes de GSH. Además en condiciones de estrés oxidativo, el astrocito libera GSSG al exterior de la célula. Seguramente en este contexto, será importante estudiar a futuro el estado redox de los astrocitos en condiciones experimentales con aminocromo, puesto que, experimentos realizados en nuestro laboratorio, sugieren que hay formación de radicales hidroxilos al ser incubados con cobre solo, con dopamina sola y con ambos.

Generalmente se acepta que las enfermedades neurodegenerativas se relacionan con procesos apoptóticos. Uno de los factores de transcripción inducido por estrés oxidativo, es el factor nuclear Kappa B (NF-kB), en base a estos antecedentes Hunot *et al.*, (1997), demostró un aumento de NF-kB en los núcleos de células neuronales provenientes de pacientes con Parkinson. A futuro y en este contexto, será importante realizar estudios de microscopia electrónica, con el fin de determinar con certeza el tipo de muerte celular que ocurre en esta línea de astrocitos, al ser incubadas con aminocromo, como así mismo, daño mitocondrial, presencia de vacuolas autofágicas, lipoperoxidación, entre otros.

#### **8.4.- La función de los astrocitos en la neurodegeneración en consideración a los resultados obtenidos.**

El sistema nervioso se compone de neuronas y células gliales, de las cuales un 90% corresponde a la glia. En varios estudios se ha observado un aumento en el número de los astrocitos y microglia (los macrófagos del cerebro), en la sustancia *nigra* de

pacientes con enfermedad de Parkinson. Se acepta que la microglia por su potencial inmunológico, aporta al proceso destructivo por su activación y posterior liberación de factores neurotóxicos como el factor de necrosis tumoral (TNF).

Por otra parte, los astrocitos contribuyen a la protección y supervivencia de las neuronas, esto significa que, una disfunción del astrocito tiene consecuencias importantes para la supervivencia de la neurona.

La neurodegeneración de la vía nigro-estriatal en la enfermedad de Parkinson, según los resultados obtenidos en el laboratorio donde se realizó esta memoria, sugieren como un posible mecanismo, la oxidación de dopamina hacia aminocromo. La dopamina se oxida a aminocromo y su posterior polimerización origina la neuromelanina, en un proceso normal, ya que estos pigmentos se encuentran en la sustancia *nigra* de personas normales. Sin embargo, aminocromo puede ser reducido con un electrón por flavoenzimas como NADPH, transformando el aminocromo en leucoaminocromo *o*-semiquinona radical, el cual ha sido postulado como el responsable de los procesos neurodegenerativos que ocurren en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal. Esta reacción puede ser prevenida por la enzima GST M2-2, la cual cataliza la conjugación de GSH con aminocromo, impidiendo de esta forma la reacción antes descrita. Los estudios de toxicidad con aminocromo en la línea celular de astrocitos U373MG, demostraron un efecto protector hasta los 200 $\mu$ M, concentración muy alta si la comparamos con las concentraciones existentes *in vivo*.

Esta protección según los estudios realizados, es atribuida a la presencia de la enzima GST M2-2, pues al realizar los experimentos de toxicidad en aquellas células donde logramos su silenciamiento a través del uso de los RNA interferentes, se evidenció un aumento significativo en la mortalidad celular, con lo cual queda demostrado que esta enzima, presenta un rol protector frente a los efectos citotóxicos generados por aminocromo.



## 9.- CONCLUSIONES.

Las principales conclusiones de esta memoria son las siguientes:

### 1.-Sobre el modelo de estudio, la línea celular U373MG, se puede afirmar que:

- La línea celular U373MG expresa GST M2-2 a nivel del RNA mensajero.
- La línea celular U373MG expresa GST M2-2 a nivel de la proteína
- La línea celular U373MG presenta una eficiencia de transfección por sobre el 60%, al ser transfectadas con GFP.
- La transfección de la línea celular U373MG mediante el uso del reactivo Fugene HD, no significó una muerte de las células, permitiendo generar una línea estable con el plasmidio pSUPERretro.

### 2.- Los resultados sobre los ensayos de inhibición de la GST M2-2 en la línea celular U373MG sugieren que:

- El interferente siGST 6, fue el que demostró mayor eficiencia en apagar la expresión de la enzima GST M2-2, con una eficiencia de alrededor de un 82 %.
- El interferente siGST 5, fue el que demostró una menor eficiencia en apagar la expresión de la enzima, con una eficiencia de alrededor de un 47 %.
- El interferente siGST 4, demostró una eficiencia en apagar la expresión de la enzima en alrededor de un 72 %.

### 3.- Los resultados de citotoxicidad inducidos por aminocromo en la línea celular de astrocitos llevaron a las siguientes observaciones:

- La línea celular U373MG protege *in vitro* hasta una concentración de 200 $\mu$ M de aminocromo.
- La línea celular U373MG sin tratamiento con aminocromo, presentó una mortalidad celular de un 3,73 %.

- Los astrocitos sin interferentes (*wild type*), al ser incubados con una concentración de 200µM de aminocromo, presentaron una mortalidad de 5,73%, resultado no significativo (\*p>0,05) con el anterior, lo que sugiere un efecto protector de la enzima GST M2-2.
- La incubación con 200µM de aminocromo, en los astrocitos con los distintos interferentes, demostraron una mortalidad de un 43,3% para el siGST 4, un 28,9% para el siGST 5 y de un 65,21% para el siGST 6, resultando concordante con el grado de inhibición de la enzima.
- Los astrocitos al ser incubados solo con el plasmidio pSUPERretro, produjeron una mortalidad en la línea celular de un 2,89%, lo que sugiere que el plasmidio no tiene efecto sobre la mortalidad celular.

## 10. - REFERENCIAS

Álvarez-Maubecin, V. 2000. Functional coupling between neurons and glia. *Neuroscience* 20: 491-498.

Arriagada, C.; Dagnino-Subiabre, A.; Segura-Aguilar, J. 2000. Studies of aminocromo toxicity in a mouse derived neuronal cell line: is this toxicity mediated via glutamate transmisión?. *J. Biochem. Mol. Med.*18: 363-373.

Baez, S.; Segura-Aguilar, J.; Widersten, M.; Mannervik, B. 1997a. Glutathione transferases catalyze the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *J. Biochem. Mol. Med.* 342: 25-28.

Baez, S.; Segura-Aguilar, J.; Linderson, Y. 1997b. Interact superoxide dismutase and catalase prevent the formation of reactive oxygen species during redox cycle of dopa orto-quinone by Glutation transferase. *J. Chem. Biol.* 342: 10-25.

Baez, S.; Linderson, Y.; Segura-Aguilar, J. 1995. Superoxide dismutase and catalase enhance autoxidation during one –electron reduction of aminochrome by NADPH-cytochrome P-450 reductase. *J. Biochem.* 112: 15-22.

Bharat, S.; Hsu, M.; Kaur, D.; Andersen, J. 2002. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 64: 1037-1048.

Benarroch, E. 2002. New findings on the neuropathology of multiple system atrophy. *Neuroscience* 96: 59-62.

Bolaños, J.; Medina, J. M. 1995. Evidence of stimulation of de peroxinitrite in neonatal rat brain. *Pharmacology* 44: 485-492.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bullock, T.; Bennet, M.; Johnston, D.; Josephson, R.; Marder, E.; Fields, R. 2005. The neuron doctrine. *Science* 310: 791-793.

Carstam, R.; Brinck, C.; Hindemith-Augustsson, A.; Rorsms, H.; Rosengren, E. 1991. The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochem. Biohys. Acta* 225: 152-160.

Chen, Y.; Vartiainen, N.; Ying, W.; Chan, P.; Koistinaho, J.; Swanson, R. 2001. Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Neurochemistry* 77: 1601-1610.

Dong, Y.; & Benveniste, T. 2001. Immune function of astrocytes. *Biol. Chem.* 36: 180-190.

Dringen, R.; Gebhardt, T.; Hambrecht, B. 1999. Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res.* 623: 208-214.

Dringen, R.; Kussmaul, L.; Gutterer, J.; Hirrlinger, J. 2000. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *Neurochemistry* 72: 2523-2530.

Dringen, R.; Gutterer, J.; Hirrlinger, J. 2000. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against oxygen species. *Biochemistry* 267: 4912-4916.

Dringen, R.; Pawlowski, P., Hirrlinger, J. 2001. Peroxide detoxification by brain cells. *Neurosc. Res.* 79: 157-165.

Goldberg, G.; Lampe, P.; Nicholson, B. 1999. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat. Cell Biol.* 1: 457-459.

Goldberg, G.; Valiunas, V.; Brink, P. 2004. Selective permeability of gap junction channels. *Biochem. Biophys. Acta* 1662: 96-101.

Graham, D.G. 2001. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic Quinones. *Mol. Pharmacol.* 14: 633-643.

Hunot, S.; Brugg, B.; Ricard, D.; Michel, P.; Muriel, M.; Ruberg, M. 1997. Nuclear translocation of NF-kappa B is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 235-244.

Ishikawa, T.; Yamazaki, T. 1992. One electron reactions in biochemical systems. Difference in the mechanisms of quinone reduction by the NADH dehydrogenase and NADPH dehydrogenase (Glutathione transferase) *Biochem. Biophys. Acta* 216: 280-291.

Iversen, S. 2007. Dopamine: 50 years in perspective. *Neuroscience* 33: 188-193.

Iwata, I.; Kondo, Y.; Miyasaki, I.; Owana, N. 1999. Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the Glutathione synthesis. *Neurochemistry* 72: 2334-2344.

Khale, P.; Olsen, M.; Larsson, O. 2002. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev. Neurosc.* 30: 855-865.

Mannervik, B, A.; Johansson, A.; Baez, S.; Segura-Aguilar, J. 1995. Glutathione transferase prevents formation of neurotoxic aminochrome and dopachrome by catalyzing the conjugation of dopamine and dopa *ortho* quinone. *Mov. Disord.* 274: 32-36.

Marsden, P.; Falsig, L.; Van Beek, J.; Dringen, R.; Brundun, P. 1990. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress. *Neuroscience* 27: 6329-6342.

Murphy, P.; Conejo, N.; Cimadevilla, J.; Vallejo, G. 2001. Maturation of astrocytes in the rat hippocampus: potential implications. *Neurochemistry* 15: 216-222.

Olanow, C.; and Tatton, W. 1999. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev. Neurosc.* 22: 123-144.

Perego, C.; Vanoni, C.; Massari, S.; Pola, S.; Pietrini, G. Invasive Behavior of glioblastoma cell lines is associated with altered of the cadherin-catenin adhesion system. *J. Cell. Sci.* 115: 331-340.

Sagara, J.; Miura, K.; Bannai, S. 1993. Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *Neurochemistry* 61: 1672-1676.

Segura-Aguilar, J.; Baez, S.; Widersten, M.; Welch, C.; Mannervick, B. 1997. Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyzes detoxication of the dopamine to aminochrome. *Biochem. Mol. Med.* 272: 5727-5731.

Segura-Aguilar, J.; Metodiewa, D.; Welch, C. J. 1998. Metabolic activation of dopamine *o*-quinones to *o*-semiquinones by NADPH cytochrome P450 reductase may play an important role in oxidative stress and apoptotic effects. *Biochem. Biophys. Acta* 1381: 1-6.

Segura-Aguilar, J.; Metodiewa, D.; Baez, S. 2001. The possible role of one-electron reduction of aminochrome in the neurodegenerative process of the dopaminergic system. *Neurotox. Res.* 3: 157:165.

Sheehan, D.; Meade, G.; Foley, V. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non- mammalian members of superfamily. *J. Biochem.* 360: 1-16.

Shen, F.; Kuo, J. S.; Chia, L. G.; Dryhurst, G. 1996. Gamma Glutathionyl Transpeptidase catalize the autoxidation of dopamine in the presence of L-cysteine: Possible insights into iron mediated dopaminergic neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 103: 433-446.

Spencer, J.; Jenner, P.; Daniels, S.; Lees, A.; Marsden, D. 1998. Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *Neurochemistry* 21: 12-22.

Shih, A.; Jhonson, D.; Wong, G.; Kraft, A.; Jiang, L. 2003. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2 expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *Neuroscience* 23: 3394-3406.

Tanner y Langston. 1999. Treatment of advance Parkinson's disease. *Rev. Neurother.* 8: 1181-1197.

Travis, J. 1994. Glia: the brain and his cells. *Neurochem. Mol. Cell.* 87: 455-470.

Towsend, D.; Tew, K.; Tapiero, H. 2003. the importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacoter.* 57: 145:155.

Unsicker, S. 2000. Metabolism of cultured astroglial cells: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 82: 456:464.

Zecca, J.; Baptiste, A.; Martin, M.; Hawn, J. 2001. Neuromelanin associated redox-activite iron is increased in the substancia nigra of patients with Parkinson disease. *Biochem. Mol. Med.* 34:67-81.

Zoccarato, F.; Toscazo, P.; Alexandre, A. 2005. Dopamine-derived dopaminochrome promotes release at mitochondrial complex I: stimulation by rotenone, control by calcium, and relevante to Parkinson's disease. *Biol. Chem.* 280:1587-1594.

## 11.- ANEXOS.

### Anexo 1.

#### Reactivos químicos:

<b>Reactivo</b>	<b>Proveedor</b>
Triptona-peptona	Difco (Kansas city, Missouri, USA)
Agar	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Extracto de levadura	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Glicerol	Gibco BRL (Gaithersburg, MD, USA)
Metanol (Grado técnico)	TCL (Santiago, Chile)
Etanol (Grado técnico)	TCL (Santiago, Chile)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, Alemania)
Cloruro de sodio	Merck (Darmstadt, Alemania)
Hidróxido de sodio	Merck (Darmstadt, Alemania)
Ácido clorhídrico	Merck (Darmstadt, Alemania)
Persulfato de amonio	Merck (Darmstadt, Alemania)
Ácido acético glacial	Merck (Darmstadt, Alemania)
Tween 20	Winkler (Santiago, Chile)
Tampón Tris-base	Winkler (Santiago, Chile)
Sulfato amonio	Sigma-Aldrich co. (St. Louis, USA)
Formaldehído	Sigma-Aldrich co. (St. Louis, USA)
Ponceaou S	Sigma-Aldrich co. (St. Louis, USA)
Ácidoetilendiaminotetraacético (EDTA)	Sigma-Aldrich co. (St. Louis, USA)
Albúmina de suero de bovino (BSA)	Sigma-Aldrich co. (St. Louis, USA)
Acrilamida	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
bis-acrilamida	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
Temed	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
coomasie brilliant blue G-250	Biorad Laboratories (Hercules, CA, USA)
azul de bromofenol	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)



## Anexo 2.

### Reactivos de biología molecular:

Taq polimerasa	Promega Inc. (Madison, WI, USA)
agarosa	Invitrogen Corp. (California, USA)
bacterias DH5 $\alpha$	Invitrogen Corp. (California, USA)
Plasmidio pSUPERretro	Invitrogen Corp. (California, USA)
kit UltraClean <sup>TM</sup> Mini Plasmid prep	MoBio Lab. Inc., (Solana Beach, USA)
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Qbiogen Inc. (Irvine, CA, USA)
Tampón Tris	Winkler (Santiago, Chile)

## Anexo 3.

### Anticuerpos, enzimas y reactivos relevantes:

Reactivo	Proveedor
anticuerpo policlonal anti GST M2-2 preparada en cobayo	Oncogene Res. Prod. (San Diego, USA)
anticuerpo policlonal anti GSTM2-2 preparada en cabra	Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA)
IgG anti-goat-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA)
IgG anti-actin-HRP	Sigma-Aldrich co. (St. Louis, USA)