



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



**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL DE
CLORURO CFTR EN RESPUESTA
AL ESTRÉS OXIDATIVO**

NATALIA MOYANO RUGIERO

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas**

PROFESOR GUIA: ANDRÉS STUTZIN SCHOTTLANDER

SANTIAGO, CHILE
2006



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



**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL DE
CLORURO CFTR EN RESPUESTA
AL ESTRÉS OXIDATIVO**

NATALIA MOYANO RUGIERO

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Biológicas**

NOTA FINAL:

PROFESOR GUIA: ANDRÉS STUTZIN SCHOTLANDER

PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS

PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ LUIS ARIAS

SANTIAGO, CHILE
2006

Agradecimientos.

A mi profesor Andrés Stutzin, por su tiempo, y disposición a aceptarme en su gran equipo de trabajo.

A todos los alumnos del centro de estudios moleculares de la célula CEMC de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en especial a Pablo, Bendelin, Oscar, Elias y Felipe, por su gran disposición y ayuda.

A Eli, Jeannette, Panchito y Juan Carlos por brindarme su ayuda siempre.

Y en especial a Ana Luisa, por ser el pilar fundamental de la realización de esta memoria y por ser mi compañera siempre. Nunca olvidare todo lo que hiciste por mí. Gracias.

Dedico esta memoria:

A mi familia por darme todo el apoyo incondicional durante mi carrera y mi vida, en especial a mi madre, por ser mi ejemplo de vida para siempre.

A mis amigos Yenni, Nancy, Karem, Baco por hacer de mis años de universidad los mejores y por el apoyo y cariño constante.

A ti Rodrigo, por ser mi compañero en la vida que pasó y la que empieza hoy. Por todo tu amor, apoyo y generosidad.

Y a mi hija Julieta, por ser lo que eres hoy y por que por ti hoy soy una mejor persona.

Los amo a todos, por siempre.

INDICE

PÁGINA

ÍNDICE	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
I) INTRODUCCIÓN	1
II) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
III) OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICO	12
IV) MATERIAL Y MÉTODO	13
V) RESULTADOS	20
a) Expresión del canal “CFTR”: evaluación en clon 1 y clon 4	20
b) Discriminación del efecto directo del peróxido de hidrógeno y/o del radical hidroxilo	22
c) Evaluación de mortalidad celular	24
d) Análisis computacional	25
VI) DISCUSIÓN	31
VII) CONCLUSIÓN	38
VIII) BIBLIOGRAFÍA	39
IX) ANEXOS	42

RESUMEN

La fibrosis quística es la enfermedad genética letal más común en la población de origen caucásico y es causada por la mutación en el gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística, CFTR (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **R**egulator) el cual forma un canal de cloruro en la membrana celular.

En los pacientes con fibrosis quística el sistema más afectado, en la mayoría de los casos, es el respiratorio donde el microorganismo aislado con mayor frecuencia es ***Pseudomona aeruginosa*** cuya infección produce una gran infiltración neutrofílica, la cual se caracteriza por la liberación de especies reactivas de oxígeno tales como peróxido de hidrógeno, anión superóxido y ácido hipocloroso. El daño tisular es una consecuencia directa de este ambiente oxidativo creado por la respuesta inflamatoria.

Se ha demostrado que CFTR frente a este estrés oxidativo aumenta su actividad donde además de conducir cloruro, mediaría el flujo del antioxidante glutatión al ser estimulado por H₂O₂ y que la salida de glutatión desencadenaría la apoptosis celular. Este mecanismo sería relevante para prevenir la injuria por estrés oxidativo en el caso de la infección por ***P. aeruginosa***, así como para iniciar la apoptosis y evitar la muerte por necrosis que resulta perjudicial para la mantención de la homeostasis del epitelio.

Antecedentes anteriores demuestran que CFTR actuaría además como receptor bacteriano de ***P. aeruginosa*** con la consiguiente descamación de la

célula infectada y que juega un papel primordial en la regulación de la viscosidad del mucus de las vías aéreas.

Todos estos mecanismos se ven afectados en los pacientes con fibrosis quística, donde se observa hiperviscosidad del mucus, muerte necrótica con la liberación de detritus celulares que llevan a una respuesta inflamatoria exagerada y un aumento del estrés oxidativo.

Para examinar la hipótesis de que frente al estrés oxidativo las células responderían aumentando la cantidad de proteína total CFTR, se seleccionaron dos clones de células HEK 293, establemente transfectadas con CFTR (HEK-CFTR), clon 1 y clon 4, los cuales se sometieron a cuatro concentraciones distintas de peróxido de hidrógeno 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM durante 16 horas. Se realizaron además experimentos de discriminación del efecto directo del H_2O_2 y/o del radical $\cdot\text{OH}$ (hidroxilo) coincubando las placas con H_2O_2 a las mismas concentraciones anteriores y MCI - 186 un atrapador específico de radicales hidroxilo a una concentración de 500 μM . La proteína total CFTR se determinó mediante "inmunoblot" y análisis computacional de las bandas.

Finalmente se evaluó el porcentaje de muerte celular por conteo de células de muestras a 100 μM , 400 μM y 500 μM .

En los experimentos de clon 1 y clon 4 se determinó que existía un aumento en la expresión del canal a bajas concentraciones de estrés oxidativo, pero este aumento no fue estadísticamente significativo. Además se determinó que el exceso de oxidantes en el medio afecta la funcionalidad celular demostrándose esto con una menor expresión génica basal

En los experimentos con el uso del atrapador de radicales hidroxilo, se observó una tendencia similar a los experimentos anteriores donde la expresión de la proteína aumentaba en relación a la concentración de agente oxidante, por lo que se concluyó que el efecto observado se debía en gran parte al peróxido de hidrógeno y no al radical hidroxilo.

Finalmente en la evaluación de la mortalidad celular, se encontró que ésta aumentaba en forma directamente proporcional al aumento de la concentración del agente oxidante, pero que no influía en términos absolutos en la expresión final de la proteína.

SUMMARY

Cystic fibrosis is the most common lethal genetic disease in caucasian population and is caused by a mutation in the regulator gene for membrane conduction of Cystic Fibrosis, CFTR (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **R**egulator) which forms a chloride channel in the cellular membrane.

Most commonly affected system in patients with cystic fibrosis is the respiratory system, where the most frequently isolated organism is ***Pseudomonas aeruginosa***, whose infection produces a substantial neutrophilic infiltration which is characterized by the liberation of ROS (reactive oxygen species) such as superoxide, hydrogen peroxide, and hypochloride acid. Tissue damage is a direct consequence of this oxidative environment created by the inflammatory response.

It has been demonstrated that CFTR faced by this oxidative stress increases its activity where in addition to conducting chloride, would mediate the efflux of the antioxidant glutathione upon being stimulated by H_2O_2 and the exit of glutathione would trigger cellular apoptosis. This mechanism would be relevant for preventing injury by oxidized stress in case of infection by ***P. aeruginosa***, as well as to initiate apoptosis and avoid death by necrosis which results prejudicial to the maintenance of epithelial homeostasis.

Previous studies show that CFTR would act as well a bacterial receptor for ***P. aeruginosa***, with the resulting death of the infected cell, and which plays a primordial role in the regulation of the viscosity of the mucus in the airways.

All these mechanisms are seen to be affected with the cystic fibrosis, where hyperviscosity of the mucus is observed, necrotic death with liberation of cellular debris which lead to an exaggerated inflammatory response and an increase of

oxidative stress.

In order to examine the hypothesis that feeder with oxidative stress the cells would respond by incrementing the quantity of total CFTR protein, two clones HEK 293 cell were selected, stably transfected with CFTR (HEK-CFTR), clone 1 and clone 4, which were submitted to 4 different concentrations of hydrogen peroxide 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM during 16 hours. Experiment of discrimination of the direct effect of the hydrogen peroxide and/or the hydroxyl radical $\cdot\text{OH}$ (hydroxilo) were done, coincubating the plates with H_2O_2 with the same concentrations previously listed, and MCI-186, a specific trapper of hydroxyl radicals at a concentration of 500 μM . The total CFTR protein was determined via immunoblot and computational analysis of the bands.

Finally, we evaluated the percentage of cellular death by all counting of samples at 100 μM , 400 μM y 500 μM .

In experiments with clone 1 and clone 4 the existence of an increase with channel expression was determined at low concentrations of oxidative stress, but this was not statistically significant. That the excess of oxidants in the medium affected the cellular functionality was also determined, this was demonstrated by a lower gene expression.

In the experiments in which we used the hydroxyl radical trapper, it was observed that the protein expression did increase, to what was observed in the experiments that did not use MCI. For which we concluded that the hydrogen peroxide plays a fundamental role in the expression of this protein.

Finally cell death, was found to increase directly proportionally to the increase of oxidant agent concentration, but this it didn't influence in absolute terms the final expression of protein.

1) **INTRODUCCIÓN**

La fibrosis quística se define como un desorden genético de tipo autosómico recesivo, que se manifiesta en un individuo cuando sus dos progenitores portan el gen defectuoso. La fibrosis quística se considera la enfermedad genética más común en la población de origen caucásico donde 1 de cada 25 individuos son portadores del gen. Su prevalencia a nivel mundial se desconoce, pero la incidencia se ha estimado en alrededor de 1 cada 2000 individuos de raza blanca, 1 cada 17.000 individuos de raza negra y se estima muy baja en personas de origen asiático. No existen diferencias en la incidencia por sexo, afectando por igual a niños y niñas.

En 1989, Lap Chee Tsui y cols. descubrieron en Toronto el gen responsable de la fibrosis quística, el que fue ubicado en un locus simple del brazo del séptimo cromosoma. Este gen está constituido por alrededor de 6.500 bases o nucleótidos y codifica normalmente una proteína que pertenece al grupo de proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding-casette*). Esta proteína ha sido llamada CFTR (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **R**egulator) o Regulador de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística, el cual forma un canal de cloruro en la membrana celular de las células epiteliales.

Los individuos afectados por esta enfermedad pueden presentar una o más mutaciones en el gen CFTR. Se han descrito más de 1000 mutaciones en este gen siendo la más frecuente la delección de la fenilalanina en la posición 508 ($\Delta F508$). Sea cual sea la mutación presente en el individuo, el resultado es el mismo: el canal de cloruro CFTR no cumple correctamente su función y se

desarrolla la enfermedad.

Los pacientes que cursan con esta enfermedad muestran signos patológicos en varios órganos tales como el páncreas, hígado y pulmón entre otros. El sistema más afectado en la mayoría de los casos es el respiratorio, en el cual, debido a la formación de bronquiectasias se desarrolla una fibrosis pulmonar secundaria que conduce a una insuficiencia respiratoria. Estas alteraciones producen una inflamación bronquial crónica, colonización bacteriana e infecciones recurrentes por diversos tipos de microorganismos de los cuales el más frecuente es ***Pseudomonas aeruginosa***. Los mecanismos de defensa de un individuo sano responderán a esta infección con una respuesta inflamatoria y muerte celular programada mediada por células del sistema inmune. Dentro de estas células cobra especial importancia la llegada masiva de neutrófilos a la zona, característica de la infección por ***P. aeruginosa***. Estas células producen una cantidad importante de especies reactivas de oxígeno tales como: peróxido de hidrógeno, anión superóxido y ácido hipocloroso, especies que actúan como mecanismo de defensa frente a la infección, pero que a su vez son altamente dañinas para las células epiteliales del individuo. Este estrés oxidativo induce una serie de cambios en las células epiteliales dentro de los cuales CFTR juega un rol fundamental. CFTR actúa como un canal de cloruro y como tal está implicado en la regulación de la viscosidad del mucus que recubre las células epiteliales, a través de la regulación del flujo de agua transmembranal. En el caso del epitelio pulmonar, un aumento en la viscosidad del mucus, tal como ocurre en los individuos afectados con esta patología, no permitiría una adecuada eliminación de los patógenos, afectando así la defensa del pulmón contra una eventual

infección bacteriana. Se ha demostrado además la participación de CFTR en la regulación de la salida de glutatión un importante antioxidante hacia el compartimiento extracelular, proceso que tendría como función amortiguar el daño oxidativo producido indirectamente por la llegada masiva de neutrófilos para así lograr un balance entre oxidantes-antioxidantes en el medio. Además existen evidencias de que ésta salida de glutatión de la célula desencadenaría la apoptosis celular. Así en los pacientes que cursan con esta enfermedad este antioxidante se encuentra en una menor proporción donde se ve favorecida la necrosis celular. CFTR ha sido descrito además como participador de un mecanismo de defensa antibacteriano adicional donde actuaría como receptor bacteriano específico de *P. aeruginosa*, Proceso que sería deficiente en los individuos con fibrosis quística Existen por otra parte evidencias de que CFTR frente al estrés oxidativo aumenta su actividad en forma general.

Con los datos anteriormente planteados se ha formulado la pregunta de si el efecto del estrés oxidativo influye o no en términos absolutos en la cantidad final de proteína CFTR de las células. Para responder a esta pregunta se evaluó la expresión del canal de cloruro CFTR en muestras sometidas a la acción de un agente oxidante, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las muestras se incubaron durante 16 horas a distintas concentraciones del agente oxidante. Se procedió a realizar también experimentos de discriminación del efecto directo del peroxido de hidrógeno y/o del radical hidroxilo ($\cdot OH$). En ambos experimentos las muestras fueron posteriormente sometidas a “inmunoblot” y analizadas en forma computacional. Finalmente se determinó el porcentaje de mortalidad celular de las muestras.

II) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I - Fisiopatología de la fibrosis quística y CFTR

La fibrosis quística es una enfermedad genética recesiva, causada por mutaciones en un gen de 230 Kb. ubicado en el cromosoma 7 (Ratjen y Doring, 2003). Este gen codifica una proteína de 1480 aminoácidos llamada CFTR, **C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **C**onductance **R**egulator, que ha sido tradicionalmente descrita como un canal de cloruro (Riordan et al., 1989). CFTR es un miembro de las proteínas transportadoras ABC (**A**TP **B**inding **C**asette), las que se caracterizan por poseer dos dominios de membrana (TMD) compuestos putativamente por seis α -hélices cada uno, y dos dominios intracelulares de unión a nucleótidos (NBD: Nucleotide Binding Domain, Higgins 1995). Los NBD unen e hidrolizan ATP (Li et al., 1996) y cumplen un papel fundamental en la regulación de la apertura y cierre de los canales. En CFTR, el único miembro de esta familia que es un canal iónico, los dominios mencionados están arreglados en un sólo polipéptido en el cual dos porciones homólogas, compuestas cada una por un dominio de membrana y un NBD, están cocatenadas por un dominio regulatorio, el dominio R.

La fibrosis quística es la patología responsable del más alto número de muertes causadas por enfermedades genéticas en la población caucásica (Akabas, 2000). Se han descrito más de 1000 mutaciones en este gen, las cuales han sido clasificadas en seis grupos: (1) CFTR no es sintetizado, (2) el procesamiento es defectuoso, (3) la regulación del canal es defectuosa, (4) la conductancia del canal es menor de la normal, (5) defectos parciales en la producción o el procesamiento, (6) la regulación que CFTR ejerce sobre otros canales es defectuosa (Pilewski y Frizzell 1999; Ratjen y Doring, 2003). La

mutación más frecuente pertenece a la clase 2 y consiste en la supresión de la Fenilalanina 508 ($\Delta F508$), aunque su frecuencia varía dependiendo del grupo étnico. La proteína $\Delta F508$ es retenida y degradada en compartimentos intracelulares, razón por la cual sólo el 4% de la proteína sintetizada se inserta en la membrana plasmática. Así entonces, las células que expresan este mutante prácticamente no tienen canales funcionales. Experimentalmente se logra una recuperación parcial de la inserción en la membrana plasmática (MP) de este mutante ($\Delta F508$ -MP+) si las células que lo expresan se incuban en glicerol 10% y a una temperatura de 26°C, aunque aún en estas condiciones el tiempo medio de residencia en la superficie celular es menor que el tiempo medio del canal silvestre (4h y 22h, respectivamente) (Sharma et al., 2001). El canal $\Delta F508$ que se inserta en la membrana plasmática ($\Delta F508$ -MP+) es un canal funcional (Dalemans et al., 1991). Otra mutación en fibrosis quística es la que presenta el cambio del residuo Glicina 551 a ácido aspártico (G551D). Esta proteína se inserta en la membrana plasmática, pero el canal no es funcional debido a una alteración en la unión del ATP al NBD1 (Pilewski y Frizzell, 1999)

En la fibrosis quística ocurren cambios patológicos en varios de los órganos que expresan CFTR, entre los que se encuentran las glándulas sudoríparas, el tracto reproductivo masculino, hígado, páncreas y el pulmón. Los cambios más radicales afectan a las vías respiratorias, donde se observa una inflamación crónica e infecciones bacterianas recurrentes con unos pocos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia* y ***Pseudomona aeruginosa***, la bacteria aislada con mayor frecuencia (Pilewski y

Frizzell, 1999). En la gran mayoría de los casos la causa de muerte es una insuficiencia respiratoria, secundaria a la fibrosis pulmonar, producto de los procesos inflamatorios y las infecciones recurrentes. Las hipótesis que tradicionalmente han intentado explicar la patología asociada a la mutación del canal de cloruro CFTR se centran en (a) el papel que juega CFTR en la regulación de la viscosidad del mucus de las vías aéreas o (b) un defecto en la capacidad de defensa antibacteriana asociado al defecto en CFTR (Pilewski y Frizzell, 1999). Ambas hipótesis están relacionadas, ya que el aumento en la viscosidad del mucus reduciría la movilidad ciliar, afectándose así la capacidad de eliminación de bacterias de las vías aéreas. En las regiones secretoras del epitelio respiratorio, como las células serosas de la glándula submucosa de la vía aérea, la disfunción de CFTR afectaría la secreción del ión cloruro y por lo tanto el movimiento paracelular del ión sodio, con una consecuente disminución en el arrastre de agua. Así entonces, el líquido de las superficies de las vías aéreas tiene un menor volumen en los pacientes con fibrosis quística, y el mucus que recubre los cilios de las vías aéreas es más viscoso en relación a los individuos sanos (Pilewski y Frizzell, 1999).

Los mecanismos de defensa en caso de inoculación bacteriana, por ejemplo con *P. aeruginosa*, en personas sanas involucran una respuesta inflamatoria y la muerte celular programada de las células epiteliales. Durante la inflamación del tracto respiratorio, los neutrófilos producen especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso y anión superóxido. Estas especies que actúan como un mecanismo de defensa frente a la infección, son también injuriantes para las células epiteliales, siendo el estrés oxidativo una de

las señales que inducen la muerte celular programada o apoptosis, posiblemente mediante la activación de PKC δ (Kikkawa et al., 2002). La salida (eflujo) del antioxidante glutatión hacia el lumen de las vías respiratorias tiene como objetivo contrarrestar la injuria por las especies reactivas de oxígeno (Jungas et al., 2002). Recientemente se sugirió que CFTR conduce glutatión además de cloruro (Linsdell y Hanrahan, 1998; Kogan et al., 2003), postulándose que este canal tendría un papel central en la mantención de la integridad del epitelio pulmonar en un ambiente oxidativo. En el caso de pacientes con fibrosis quística, la respuesta inflamatoria es exagerada y mantenida en el tiempo y se caracteriza por una llegada masiva de neutrófilos (Jungas et al., 2002). Se ha propuesto que un mecanismo de defensa adicional ante la infección es la internalización de *P. aeruginosa* por las células epiteliales. En esta respuesta CFTR actuaría como receptor del patógeno y mediaría su internalización, proceso que finalizaría con la descamación de las células infectadas (Pier et al., 1997; Cannon et al., 2003). La internalización es dependiente de CFTR presente en la membrana plasmática y por lo tanto la eficiencia es baja en los pacientes con fibrosis quística (Pier et al., 1997). Con estos antecedentes es claro que la regulación de la expresión de CFTR, está relacionada de alguna u otra forma con el ambiente oxidativo y su correcta función es fundamental para la mantención de la defensa antibacteriana de las vías respiratorias.

La regulación de la actividad (apertura y cierre) del canal CFTR se realiza mediante la unión e hidrólisis de ATP en sus dominios de unión a nucleótidos. Esta actividad tiene como prerrequisito absoluto la fosforilación del canal por PKA

(Riordan et al., 1989; Gadsby y Nairn 1999). Actualmente se concuerda que la proteína quinasa C (PKC) tiene un papel modulador adicional de la actividad de CFTR. El canal tiene varios sitios de consenso para fosforilación por PKC, estando la mayoría de ellos en el dominio regulatorio R. El papel modulador de PKC consiste en un rol estimulante de la activación mediada por PKA (Tabcharani et al., 1991). Sin embargo cual o cuáles de las isoformas de PKC que participan en la regulación directa o indirecta de CFTR no ha sido determinado actualmente.

ii.- El estrés oxidativo generado en respuesta a la infección por *P. aeruginosa*, induce el eflujo de glutatión dependiente de CFTR.

Mediante métodos electrofisiológicos y bioquímicos, en los últimos años se ha establecido que, además de la función iónica de canal de cloruro, CFTR puede conducir glutatión desde el medio interno al espacio extracelular. El primer antecedente fue aportado por Lindsell y Harahan (1998) quienes registraron corrientes de glutatión en células transfectadas con CFTR. Estas corrientes que corresponden al flujo de salida de los aniones, son dependientes de la fosforilación por PKA y fueron inhibidas por los bloqueadores de CFTR, glibenclamida y DNDS.

El transporte de glutatión estaría alterado en el caso de la fibrosis quística, pues se ha reportado que el contenido de este anión en el líquido de las superficies aéreas es menor en pacientes con fibrosis quística que en personas sanas (Pilewki y Frizzell., 1999; Gao et al., 1999; Velsor et al., 2001). Se demostró que el flujo de glutatión en líneas celulares derivadas de pacientes con fibrosis quística homocigotos $\Delta F508$ es menor que en células derivadas de individuos

sanos, y que éste se recupera al transfectar las células mutadas con CFTR silvestre (Gao et al., 1999). Estos autores determinaron que el líquido apical de los cultivos en monocapas de las células fibrosis quística $\Delta F508$ contenían un 55% menos de glutatión que el de células con CFTR silvestre, resultado que se comprobó también en ratones “*Knock-out*” para CFTR al medirse el contenido de glutatión del líquido superficial de las vías aéreas (Velsor et al., 2001). Sin embargo hay que destacar que el contenido celular de glutatión no estaba alterado en las líneas celulares de fibrosis quística (Gao et al., 1999) como tampoco en los ratones ““*Knock-out*” (Velsor et al., 2001). Dada la relevancia del glutatión en la protección contra la injuria celular producida por las especies reactivas de oxígeno (Wu et al., 2004) en el epitelio respiratorio (Jungas et al., 2002; Day et al., 2004) es posible proponer que los pacientes con fibrosis quística tendrían una menor tolerancia al estrés oxidativo. Los resultados mencionados sugieren además que posiblemente existe una o más entidades transportadoras de glutatión localizadas en la membrana apical del epitelio respiratorio, pues tanto los pacientes con fibrosis quística como los ratones CFTR “*Knock-out*” poseen niveles detectables de glutatión en el líquido de las superficies aéreas (Velsor et al., 2001; Hudson. 2001).

En la infección por ***P. aeruginosa*** se produce una llegada masiva de polimorfos nucleares neutrófilos (PMN) los cuales se degranulan liberando al medio una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, entre ellas H_2O_2 . En el lavado broncoalveolar de pacientes con fibrosis quística se han contado $3,8 \times 10^7$ neutrófilos por ml de fluido, y por otra parte se ha determinado que una

suspensión de 3×10^5 neutrófilos producen $15 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , por lo que se puede estimar que en el líquido de las superficies aéreas de pacientes con fibrosis quística habría una concentración superior a $1000 \mu\text{M}$ de H_2O_2 (Cowley y Linsdell., 2002) La relación entre el estrés oxidativo y el flujo de glutatión fue establecida por Cowley y Linsdell (2002), quienes demostraron que en monocapas de células Calu-3, línea celular de células serosas de glándula submucosa derivada de carcinoma de pulmón, el H_2O_2 activaba la secreción de aniones. Tomando en cuenta que esta secreción es inhibida por bloqueadores de CFTR, es dependiente de la actividad de la adenilato ciclasa y está demostrado que CFTR conduce glutatión, los autores propusieron que en respuesta al H_2O_2 se activaría la salida de glutatión mediada por CFTR de modo de neutralizar el estrés oxidativo y evitar el daño celular. En la patología de la infección por *P. aeruginosa* la inducción de la apoptosis de las células epiteliales se considera un mecanismo de defensa. En caso de no activarse la vía apoptótica el estrés oxidativo induce necrosis, proceso por el cual se liberan detritus celulares que inician una respuesta inflamatoria. Entre los restos se encuentran también DNA en fragmentos de gran tamaño (Jungas et al., 2002), los cuales aumentan la viscosidad del mucus, afectando la movilidad ciliar y su capacidad de eliminación de bacterias, observación que constituye la base del tratamiento de las pacientes con fibrosis quística mediante inhalaciones de DNA asa I.

Estos antecedentes han llevado a replantearse esta patología integrando el efecto en el transporte de glutatión como algo relevante. Hudson (2001) hizo una revisión detallada de la correlación que existe entre la fibrosis quística y otras

patologías con deficiencia de glutatión, resaltando que ambas comparten una larga lista de alteraciones tanto a nivel macroscópico como molecular.

En resumen los antecedentes aquí presentados muestran que CFTR es una vía de conducción para glutatión además de conducir cloruro y que la salida de glutatión puede ser estimulada por H_2O_2 . Este mecanismo sería relevante para prevenir la injuria por estrés oxidativo en el caso de la infección por *P. aeruginosa*, así como para iniciar la apoptosis y evitar la muerte por necrosis que resulta perjudicial para la mantención de la homeostasis del epitelio. Además el estrés oxidativo estimularía la función del canal, aumentando la secreción aniónica. Cabe entonces la pregunta de si, esta estimulación influye o no en términos absolutos en la cantidad final total de proteína CFTR.

III) OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS.

Objetivo general:

- Determinar el efecto del H_2O_2 sobre la expresión de CFTR.

Objetivos específicos:

- Determinar la expresión de CFTR en una línea celular expuesta a concentraciones de 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM de agente oxidativo (H_2O_2) durante un periodo de tiempo de 16 horas.
- Discriminar entre el efecto oxidativo directo del H_2O_2 y/o el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$ sobre la expresión de CFTR.
- Evaluar porcentaje de mortalidad en líneas celulares expuestas a concentraciones de 100 μM , 400 μM y 500 μM de agente oxidativo (H_2O_2)

IV) MATERIALES Y METODO

I- EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL CFTR EN CLON 1 Y CLON 4

CULTIVO CELULAR

Se utilizaron células HEK 293 de dos clones diferentes, clon 1 y clon 4, para determinar si existen diferencias en la expresión de la proteína. Estas líneas celulares son derivadas de tejido embrionario de riñón, se encuentran establemente transfectadas con el plásmido pIRES II con CFTR (HEK-CFTR) y fueron cultivadas en placas de 60 mm a confluencia a 37 ° C en una atmósfera de 5 % de CO₂, saturada con agua, en medio DMEM/F-12 (DMEM: Dulbecco' s Modified tagle médium. Low glucosa. F-12 Nutrient Mixture GIBCO) en partes iguales, complementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM) y antibióticos (penicilina/estreptomicina y fungizona). Con este stock de células se prepararon por cada uno de los clones: 1 placa con células HEK sin transfectar como control de la expresión, 3 placas de células HEK-CFTR como controles, las cuales no fueron sometidas a la acción del agente oxidante y 12 placas de células HEK-CFTR las cuales fueron sometidas a 4 concentraciones distintas de H₂O₂: 100 μM, 200 μM, 400 μM y 500 μM durante 16 horas. Con este fin se preparó una solución “*stock*” de peróxido de concentración 1M a partir de una solución al 30%.

Una vez terminado el tiempo de incubación, las células fueron lavadas con solución “*buffer*” fosfato a 4 ° C (ver anexo nº 1) y luego se agregó 1,5 ml de solución “*buffer*” fosfato para recolectar las células usando un policía de goma. Se obtuvieron las células por centrifugación a 4600 x g por 2,5 minutos. La pella se

resuspendió en un “*buffer*” de lisis (NaCl 150 mM) (ver anexo nº 2) al cual se le adicionó un cóctel de inhibidores de proteasas el cual contiene AEBSF, A Protinin, E-64, EDTA y Leupeptin. (Calbiochem). La mezcla obtenida se sonicó en hielo 2 veces por 10 segundos para producir la ruptura celular. De estas muestras se extrajeron 5 µl para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Mediante el método de Bradford y utilizando una curva estándar de concentración de proteínas con albúmina 2 mg/ml (Albumin Estándar: Pierce para: Protein Assay Reagent), se determinó la concentración de proteínas de las muestras. Las muestras y cada punto de la curva estándar fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 562 nm. Con los datos de la absorbancia de los puntos de la curva estándar se obtuvo la curva de calibración de proteínas a través del programa computacional Sigmaplot, de la cual se interpolaron las concentraciones de proteína de las muestras a partir de su absorbancia. La concentración adecuada para obtener una buena señal en el “*immunoblot*” fue estandarizada en un mínimo de 50 µg de proteína en la muestra para cargar el gel y todas las muestras fueron estandarizadas a una concentración de 60 µg de proteína.

GELES DE ACRILAMIDA E “IMMUNOBLOT”

Para la electroforesis se utilizaron geles de acrilamida denaturantes preparados a dos concentraciones distintas 12% y 6%. (anexo Fig. 1 y Fig. 2). Las muestras fueron preparadas agregándole a la solución de proteínas agua Nano pure y “buffer” de carga (ver anexo nº 3) Además se cargó uno de los carriles del gel con un estándar de pesos moleculares caleidoscopio (Biorad). Este contiene varios tipos de proteínas, de diferentes pesos moleculares conocidos, las cuales son marcadas por colores al correr en el gel. CFTR cuyo peso molecular es 168 KDa queda en el gel de 6% entre las marcas 199 KDa y 128 KDa del caleidoscopio y β -actina cuyo peso es de 40 KDa queda en el gel de 12 % entre las marcas de 45 y 31 Kda. El gel se corrió por aproximadamente 3 horas a 60 mV con buffer de corrida 1 X (ver anexo nº 4) en una mini cámara Bio-Rad.

Una vez finalizada la electroforesis el gel de acrilamida, una membrana de nitrocelulosa y dos papel de blot fueron humedecidos en un buffer de transferencia (anexo nº 5) con metanol al 10 % por 15 minutos. Luego se cargó la cámara de transferencia colocando la membrana en un “sándwich”. (ver anexo Fig. nº3) La cámara se conectó a una fuente de poder a voltaje constante de 21 mV por 25 minutos (Bio- rad Power- PAC- 200). Luego la membrana de nitrocelulosa (que contiene entonces las proteínas) fue dejada bloqueando en leche descremada al 5 %, para evitar reacciones inespecíficas del anticuerpo primario durante 1 hora aprox. a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la membrana fue retirada de la leche (la cual fue recuperada para preparar los anticuerpos primario y

secundario) y se le realizaron 5 lavados de 5 minutos c/u con el detergente TBS - Tween 0.1% (Tween: Sigma) (ver anexo N° 6). Luego la membrana de nitrocelulosa se dividió en dos partes correspondientes a los geles de 6 y 12 % para incubar con el respectivo anticuerpo primario. CFTR fue detectado usando un anticuerpo policlonal específico anti-CFTR dilución 1:1000 (por gentileza del Dr. Angus Nairn de la Universidad de Rockefeller) contra el dominio R de la proteína y se detectó además la proteína β - actina. Esta proteína se considera constitutiva de las células y está demostrado que no sufre mayores variaciones al ser sometida a tratamientos exógenos por lo que fue utilizada para normalizar la proteína CFTR con anticuerpo anti β - actina dilución 1:1000 (Sigma).

DETECCIÓN DE CFTR

Se prepararon 2 bolsas de plástico en las cuales se introdujo cada una de las membranas con su respectivo anticuerpo primario disuelto en la misma leche, las cuales fueron incubadas toda la noche a 4° C con agitación. Al día siguiente las membranas se volvieron a lavar con TBS Tween 0.1%, 5 veces por 5 minutos. Posteriormente se traspasaron las membranas a nuevas bolsas con el anticuerpo secundario de conejo que reconoce los anticuerpos primarios (*rabbit*). Este anticuerpo se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación y luego se repitieron los 5 lavados con TBS Tween 0.1 %.

REVELADO DE MEMBRANAS

Para este procedimiento se utilizó el reactivo SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) el cual se agregó a las membranas para ser incubado por cinco minutos, pasado este tiempo fue retirado el excedente de reactivo. Este reactivo se une al anticuerpo secundario emitiendo luz y a través de este mecanismo la película fotográfica es velada en estas zonas, la que al ser revelada, las muestra como bandas en la película. Las membranas se envolvieron en papel plástico para ser colocadas en un "casette" de revelado. En el cuarto oscuro se colocó una película fotográfica sobre las membranas y se procedió a cerrar el "casette" exponiendo la película a tres tiempos distintos 2 - 5 y 8 minutos con el fin de obtener la mejor imagen posible. Las películas fotográficas fueron reveladas y fijadas. La imagen obtenida se colocó sobre la membrana de nitrocelulosa expuesta en el "casette" para marcar los diferentes pesos moleculares del estándar usado. Luego la membrana fue digitalizada para poder analizarla mediante el programa computacional UN SCAN-IT el cual mide densidad de las bandas.

II-DISCRIMINACIÓN DEL EFECTO DIRECTO DEL H₂O₂ Y/O DEL RADICAL HIDROXILO

Posteriormente se realizaron los experimentos de discriminación del efecto directo del peróxido y/o del radical hidroxilo. Con este fin se llevaron a cabo experimentos utilizando exclusivamente el clon 4, el cual fue elegido por mostrar una mayor expresión de la proteína en la digitalización de los geles y utilizando los

mismos métodos mencionados anteriormente, se sembraron 1 placa con células HEK sin transfectar, 3 placas HEK-CFTR a las cuales se les adicionó exclusivamente MCI -186 (un atrapador específico de radicales hidroxilo) como control y 12 placas que fueron coincubadas con el peróxido a las mismas concentraciones anteriores y el MCI-186 a una concentración de 500 μ M, para lo cual se preparó una solución stock de MCI-186 a una concentración de 500 mM de la cual se extrajeron 4 μ l los cuales fueron agregados a cada una de las placas.

Las placas fueron mantenidas en estas condiciones durante 16 horas después de las cuales fueron procesadas de la misma manera que los experimentos anteriores.

III-EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD CELULAR

Con la finalidad de evaluar qué grado de cambio observado en la expresión del canal podía ser atribuible a mortalidad celular se realizó una estimación de viabilidad celular, en placas de HEK-CFTR incubadas a concentraciones de 100 μ M, 400 μ M y 500 μ M de peróxido de hidrógeno. Para esto se mantuvieron durante 16 horas 3 placas de cada una de las concentraciones mencionadas. Una vez finalizado este periodo de tiempo las células de cada placa fueron recolectadas por raspaje (utilizando un policia de goma) y centrifugación. La pella se resuspendió en 2 ml de PBS, de los cuales se extrajeron 20 μ l. A este volumen se le adicionó 2 μ l del reactivo de azul tripan para determinar viabilidad celular. Este volumen fue cargado en la cámara de Neubauer. Se contabilizaron células

viabiles y no viabiles de cada placa y posteriormente se obtuvieron los porcentajes de mortalidad promedio en cada una de ellas.

IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos en el programa UN-SCAN IT fueron analizados a través del software Statgraphics plus, en el cual se realizó un ANOVA donde se compararon todos los datos dentro de cada grupo y con su respectivo control.

En el análisis estadístico se obtuvieron los siguientes resultados:

Clon 1: No se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos, considerándose a todos estos homogéneos.

Clon 4: Existen diferencias estadísticas entre los grupos sometidos a 100 μM y 400 μM y entre los grupos sometidos a 200 μM y 400 μM de peróxido de hidrógeno. Sin embargo ninguna muestra es diferente estadísticamente al grupo control.

Clon 4 + MCI-186: Se encontraron diferencias estadísticas entre el grupo sometido a 100 μM con los respecto a los grupos 200 μM , 400 μM y 500 μM de peróxido de hidrógeno respectivamente. Sin embargo, al igual que el experimento anterior, ninguna muestra fue diferente estadísticamente al grupo control.

V) RESULTADOS

A) EXPRESIÓN DEL CANAL CFTR EVALUADO EN CLON 1 Y CLON 4

Se preparó para cada clon 1 placa con células HEK sin transfectar como control de la expresión, 3 placas de células HEK-CFTR como controles, las cuales no fueron sometidas a ningún tratamiento y 12 placas de células HEK-CFTR las cuales fueron sometidas a 4 concentraciones distintas de H₂O₂: 100 μM, 200 μM, 400 μM y 500 μM durante 16 horas. Las muestras fueron recolectadas y una vez realizada la reacción de Bradford a cada una de las muestras de ambos clones, los valores de absorbancia fueron obtenidos por espectrofotometría a una longitud de onda de 562 nm. A partir de estos datos por extrapolación se determinó la concentración de proteínas de las muestras originales.

Se tomaron distintos volúmenes de cada muestra de modo de estandarizar todas las muestras en 60 μg de proteína total para ser cargadas en el gel. Para obtener un volumen final a cargar de 25 μl se les adicionó agua Nano pure y un “*buffer*” de carga a las muestras.

Las muestras de proteínas preparadas fueron sometidas a una electroforesis en gel, transferidas e incubadas con los respectivos anticuerpos. Una vez concluido el proceso de revelado y fijación, se obtuvieron las imágenes de las bandas de proteína CFTR y las bandas de la proteína β-actina respectiva de cada muestra.

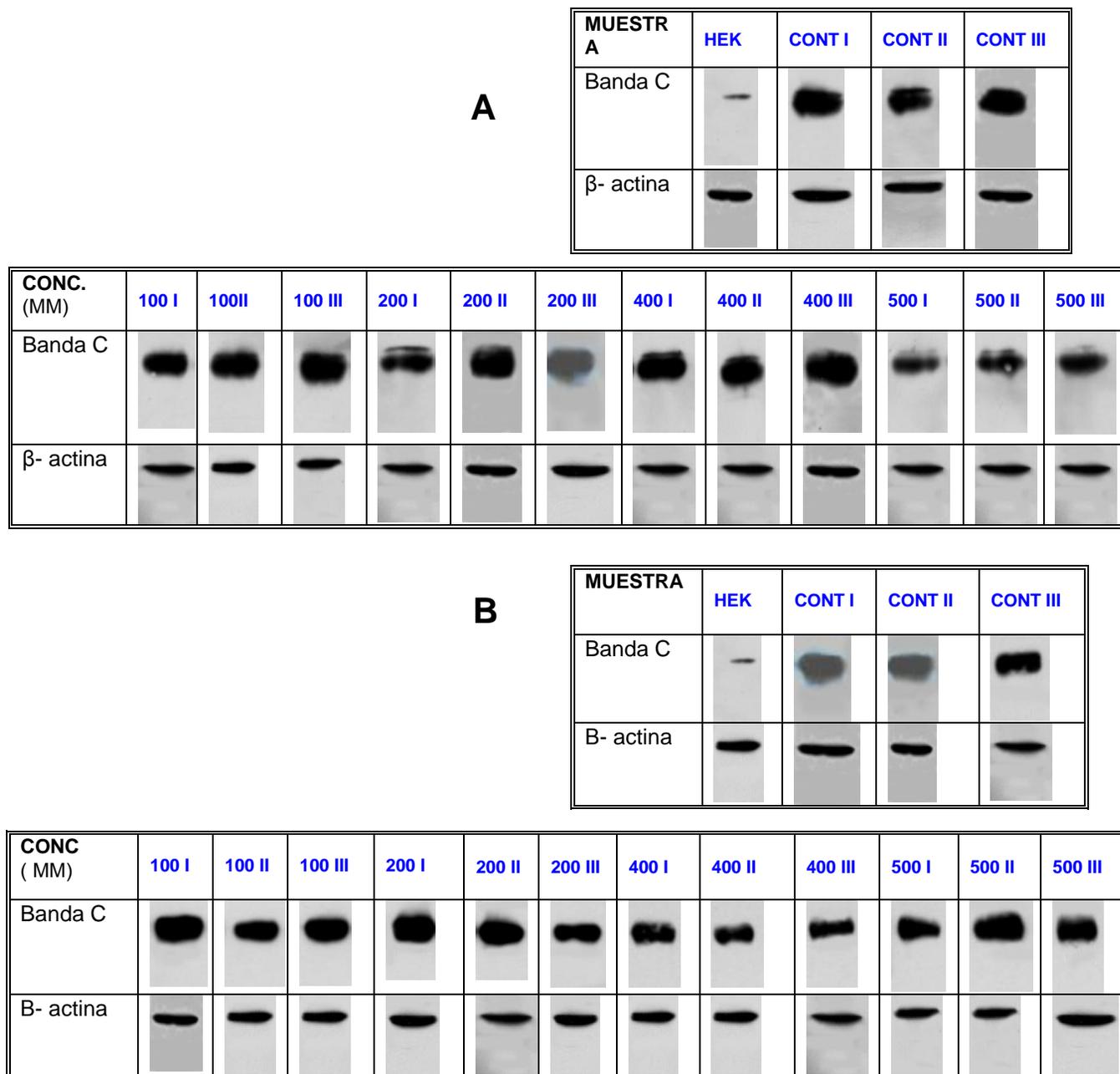


Fig. 1 Se muestra en la figura las bandas obtenidas mediante “western blot” para el clon 1(A) y el clon 4(B), luego del revelado de las membranas de nitrocelulosa. Para cada una de los clones se muestra el cuadro de los grupos controles (derecha arriba): células HEK sin transfección y 3 experimentos sin tratamiento: control I, II y III respectivamente y las bandas obtenidas en los tres experimentos realizados en células HEK-CFTR a 4 concentraciones distintas de peróxido de

hidrógeno 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM se muestran en el cuadro inferior. Para cada muestra se observa su respectiva banda C y su banda de β - actina.

B) DISCRIMINACIÓN DEL EFECTO DIRECTO DEL H_2O_2 Y/O DEL RADICAL HIDROXILO

Se realizaron los experimentos de discriminación utilizando el atrapador específico de radicales hidroxilos MCI - 186. Para este caso se utilizó exclusivamente el clon 4. Se preparó un control sin tratamiento, un segundo control al que solo se le adicionó el atrapador y 12 muestras que fueron sometidas a la acción del peróxido de hidrógeno a las concentraciones de 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM en coincubación con el atrapador MCI. La concentración del atrapador para todas las muestras en que se utilizó fue de 500 μM . Las muestras se estandarizaron de igual modo en 60 μg de proteína

A continuación se muestran las bandas obtenidas en los experimentos con clon 4 y MCI -186.

Muestra	Hek	cont I	cont II	cont III
Banda C				
β - actina				

Conc (μ M)	100 I	100 II	100 III	200 I	200 II	200 III	400 I	400 II	400 III	500 I	500 II	500 III
Banda C												
β - actina												

Fig. 2. Clon 4 + MCI - 186. Se muestra en la figura las bandas obtenidas mediante "western blot" para el clon 4 luego del revelado de las membranas de nitrocelulosa. Se muestra el cuadro de los grupos controles (derecha arriba): células HEK sin transfección y 3 experimentos sin tratamiento: control I, II y III respectivamente. Las bandas obtenidas en los tres experimentos realizados en células HEK-CFTR a 4 concentraciones distintas de peróxido de hidrógeno 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M se muestran en el cuadro inferior. Para cada muestra se observa su respectiva banda C y su banda de β - actina

C) EVALUACIÓN DE MORTALIDAD CELULAR

Los resultados de la evaluación del porcentaje de mortalidad evaluado en muestras sometidas a las concentraciones de 100 μM , 400 μM y 500 μM de peróxido de hidrógeno se muestran a continuación.

Tabla 1: Porcentaje de mortalidad celular. Se muestra en la tabla el porcentaje de mortalidad celular calculado para las muestras sometidas a 100 μM , 400 μM y 500 μM de peróxido de hidrógeno, obtenido mediante conteo celular directo en la cámara de “Neubauer”.

	Nº muestra	total V	total NV	población total	% NV	Promedio de % de Mortalidad
100 μM	1	187	18	205	8,8	7,6
	2	73	6	79	8	
	3	84	6	90	7	
400 μM	1	309	23	332	7	9,6
	2	83	14	97	14	
	3	221	18	239	8	
500 μM	1	212	42	254	17	11
	2	129	10	139	7	
	3	141	14	155	9	

V = Células viables

NV = Células no viables

D) ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS MUESTRAS

Las imágenes de las bandas fueron digitalizadas y posteriormente analizadas a través del programa computacional UN - SCAN IT, el cual mide densidad de las bandas.

Para el análisis se midió cada banda C con su respectiva banda de β -actina. Para cada una de estas bandas se calculó además su background el que fue restado de la banda principal. Posteriormente se realizó una normalización de las bandas mediante la razón banda C/ banda β -actina. Los datos obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 2. Resultados del análisis computacional de las muestras mediante digitalización y posterior densitometría de las bandas en clon 1, clon 4 y clon 4 + MCI - 186. Para cada banda se midió la densidad bruta de la banda C y de su respectiva banda β -actina. El "Background" de cada banda C y β -actina fue restado del valor bruto de ambas bandas para obtener el valor neto total. Los valores netos de la banda C fueron normalizados con los valores netos de β -actina mediante la razón final banda C / β -actina.

clon 1		clon 4		clon 4+ MCI-186	
MUESTRA	Banda C/ β-act	MUESTRA	Banda C/ β-act	MUESTRA	Banda C/ β-act
Cont. I	1,9	Cont. I	2,6	Cont. MCI I	2,9
Cont. II	2,5	Cont. II	1,2	Cont. MCI II	2,3
Cont. III	2,1	Cont. III	2,4	Cont. MCI III	2,9
100 I	1,7	100 I	1,9	100 I	2,3
100 II	1	100 II	2,3	100 II	4,1
100 III	1,5	100 III	1,7	100 III	4,7
200 I	1,8	200 I	2,7	200 I	3,3
200 II	1,9	200 II	1,8	200 II	1,3
200 III	1,2	200 III	4,2	200 III	1,5
400 I	1,1	400 I	2,6	400 I	2
400 II	0,8	400 II	2,5	400 II	2,1
400 III	1,2	400 III	1,7	400 III	0,8
500 I	1,4	500 I	1	500 I	1,5
500 II	1,4	500 II	2,7	500 II	1,5
500 III	1,3	500 III	1,9	500 III	1,3

Los resultados obtenidos en el programa fueron graficados utilizando los promedios de los tres experimentos realizados de cada concentración.

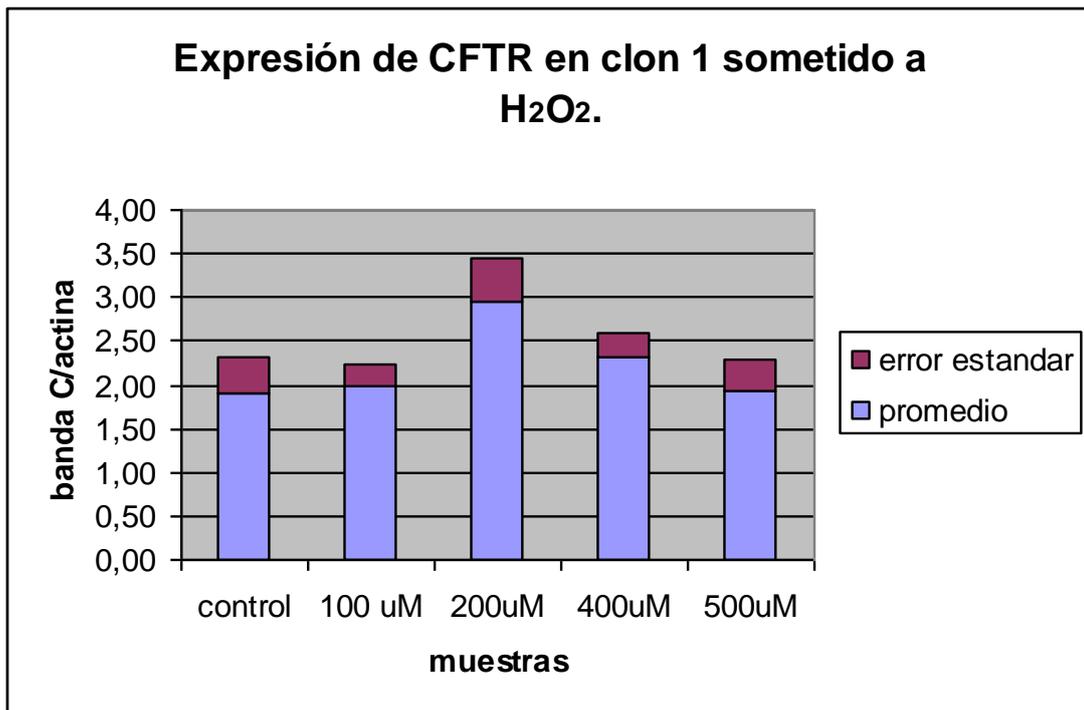


Fig. 5. Promedio de muestras de clon 1 sometidas a cuatro concentraciones de peróxido de hidrógeno 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M durante 16 horas. Se muestra en la figura el error estándar para cada una de las muestras. Al análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

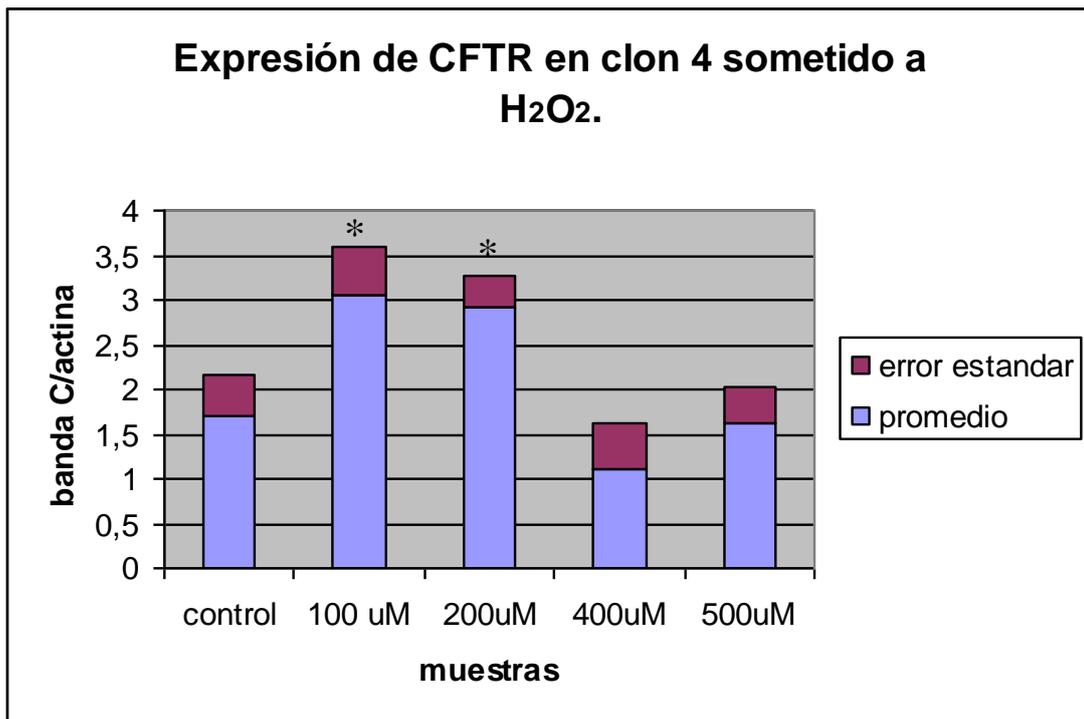


Fig. 6: Promedio de muestras de clon 4 sometidas a concentraciones de 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M de peróxido de hidrógeno. Se muestra en la figura el error estándar para cada una de las muestras. Al análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre los grupos sometidos a 100 μ M y 200 μ M versus 400 μ M. *: $p < 0.05$, versus 400 μ M solamente

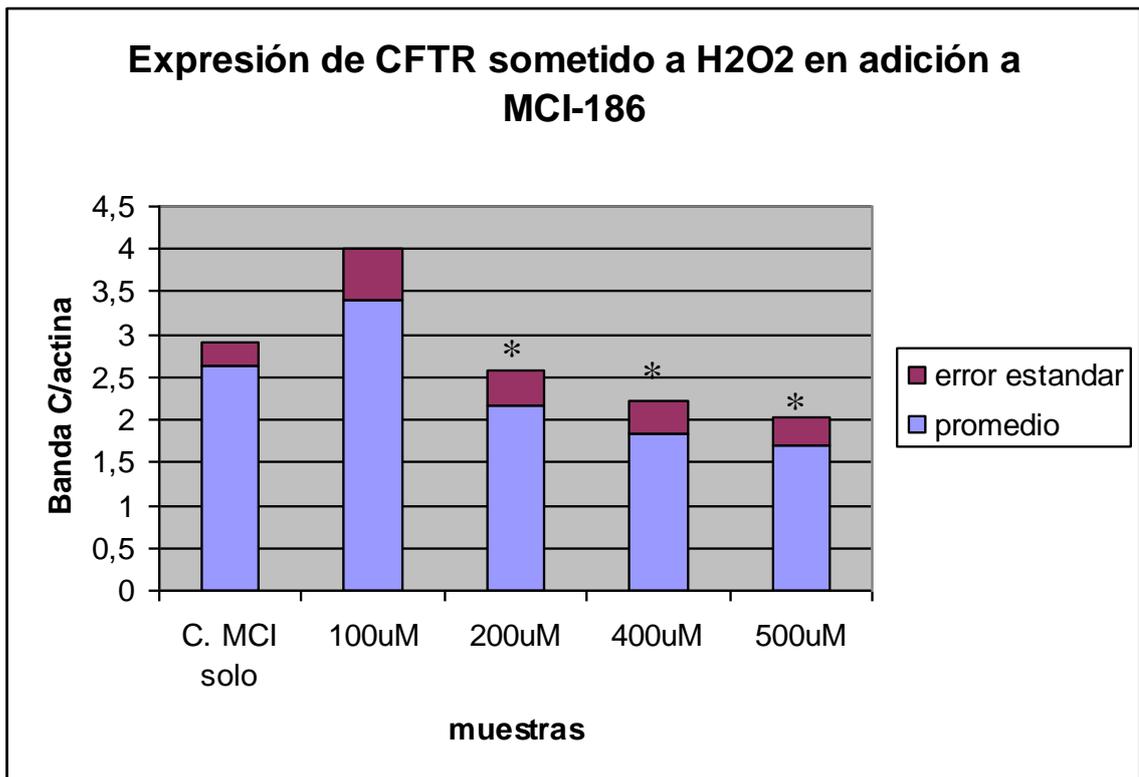


Fig.7 Promedio de muestras de clon 4 sometidas a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, en adición al atrapador específico de radicales hidroxilo MCI - 186 a una concentración constante de 500 μ M para todas las muestras. Se muestra en la figura el error estándar para cada una de las muestras. Al análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre el grupo a 100 μ M con 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M respectivamente. *: $p < 0.05$, versus 100 μ M solamente.

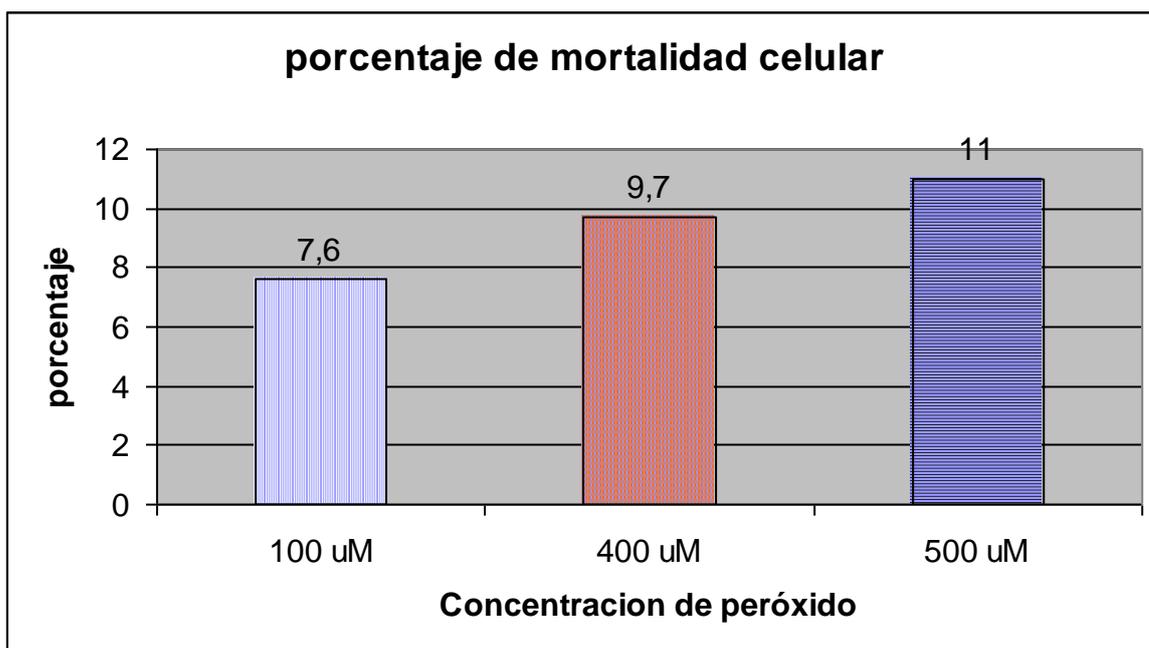


Fig. 8 Porcentaje de mortalidad celular. La mortalidad celular fue evaluada por conteo celular directo en muestras sometidas a concentraciones de 100 μM , 400 μM y 500 μM . Las células fueron recolectadas después de 16 horas de incubación con el peróxido. Mediante tinción con azul tripán la viabilidad celular fue evaluada en la cámara de Neubauer. Se contabilizaron células viables y no viables de cada placa y posteriormente se obtuvieron los porcentajes de mortalidad promedio en cada una de ellas. La mortalidad de las muestras sin tratamiento (controles) se estimó en un 2 %.

VI) DISCUSIÓN

I. EXPERIMENTOS DE EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL

CFTR EN CLON 1 Y CLON 4

Al analizar la expresión del canal CFTR en el clon 1 se pudo observar que el valor máximo de expresión del canal evaluado en los grupos controles fue de 2,48 en contraste con lo observado en los grupos controles del clon 4, donde se notó un leve aumento del valor de expresión el cual alcanzó un valor máximo de 2,62.

Este resultado se puede explicar como una consecuencia del método de transfección de los clones, en el cual se utilizó el mismo gen y el protocolo fue el mismo, sin embargo la efectividad del método fue menor en el clon 1 en el cual una menor cantidad de células incorporaron el plásmido unido al gen codificador de la proteína. De este modo el clon 4 expresa una mayor cantidad basal de la proteína.

Con el objetivo de simplificar el estudio se utilizó en los experimentos posteriores exclusivamente el clon 4 (con la mayor expresión) para realizar la discriminación entre el efecto directo del peróxido y/o del radical hidroxilo y para la evaluación de la mortalidad celular.

II. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL CFTR EN CLON 1 Y

CLON 4 SOMETIDO A CONCENTRACIONES DE 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M Y

500 μ M DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

a) Clon 1:

Al evaluar exclusivamente el clon 1 se observa que, no existen diferencias marcadas en las expresiones del canal cuando se comparan el grupo control con los grupos sometidos a concentraciones de 100 μ M, 400 μ M y 500 μ M de peróxido de hidrógeno. Sin embargo al comparar estos grupos en conjunto con el grupo sometido a la concentración de 200 μ M, se observa una tendencia al aumento de la expresión del canal CFTR.

Igualmente pudimos notar que, la expresión total del canal tiende a aumentar en forma directamente proporcional a la concentración del agente oxidante, teniendo como límite máximo la concentración de 200 μ M (baja concentración de estrés oxidativo), concentración que marca el descenso en forma leve de la expresión siendo a la concentración de 500 μ M, menor incluso que la expresión del grupo control o basal. Se evaluó una alta mortalidad celular como posible causa de esta disminución, razón por la cual se determinó el porcentaje de mortalidad celular que existía en las mismas condiciones experimentales, en cuanto a tiempo de incubación y concentración de agente oxidante. Los resultados de esta evaluación demostraron que la mortalidad producida por los efectos experimentales, era relativamente baja, por lo que la tendencia a la disminución de la expresión observada en todos los experimentos a esta concentración, no era atribuible a mortalidad celular. Al descartarse esta posibilidad se determinó que la razón de esta tendencia a la

disminución se podría deber a un exceso de estrés oxidativo en el medio, el cual altera de manera importante la funcionalidad celular y entre ellas, la expresión génica de las células. El exceso de radicales libres en el medio, cuando no pueden ser eficazmente contrarestados con un nivel adecuado de antioxidantes endógenos y/o exógenos, provocan serios daños en las estructuras celulares, dentro de los cuales se encuentran los ácidos nucleicos. Estos daños irreversibles afectan, entre otras funciones, la expresión génica basal de la célula.

Al realizar el análisis estadístico del clon 1 se pudo constatar que no existen diferencias significativas entre los grupos, considerándose a todos ellos homogéneos entre sí. Esto da cuenta de que, la tendencia al aumento en la expresión observado no es constante, presentando amplia dispersión de los datos en todas las muestras.

b) Clon 4:

Al evaluar la respuesta obtenida en el clon 4 de expresión se pudo observar que la tendencia fue similar a la observada en el clon 1. Sin embargo se presentaron mayores diferencias entre los grupos en este clon. La mayor tendencia al aumento en la expresión del canal se presentó a la concentración de 100 μM y fue muy similar a 200 μM . Al igual que lo observado en el clon 1, la expresión del canal tiende a la disminución progresiva al aumentar la concentración del agente oxidante. Así, a 400 μM la tendencia fue a presentar la menor expresión siendo un poco mayor a la concentración de 500 μM . Al comparar estos datos con los del grupo control, se puede observar que al aumentar demasiado la concentración del agente oxidante (400 μM y 500 μM),

la expresión del canal de membrana CFTR tiende a ser menor incluso que el nivel basal. Como se explicó anteriormente esto se debería a que la expresión génica de la célula se ve afectada a altas concentraciones de oxidantes en el medio.

Al aplicar el análisis estadístico a este clon se observó que: entre el grupo control (expresión basal de CFTR en clon 4) y los grupos sometidos a 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM no existen diferencias significativas al igual que lo mostrado en el clon 1. Es decir existe una tendencia al aumento, pero este no es constante (amplia dispersión de los datos) por lo que no es significativo estadísticamente.

En este clon sin embargo el análisis estadístico arrojó una diferencia significativa dentro de los grupos 100 μM - 400 μM y entre 200 μM - 400 μM .

III. DISCRIMINACIÓN DEL EFECTO DIRECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO Y/O DEL RADICAL HIDROXILO CLON 4/MCI-186.

Al obtener los resultados de estos experimentos se compararon el grupo control al que sólo se le adicionó el atrapador con las muestras a 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM . El resultado fue similar al obtenido en los experimentos anteriores, donde se observó una tendencia al aumento de la expresión cuando es sometido a bajas concentraciones de agente oxidante (100 μM), expresión que tiende a disminuir a medida que se aumenta la concentración de peróxido de hidrogeno. Por esta razón podría concluirse que el efecto observado en todos los experimentos es el resultado de la acción del peróxido de hidrógeno más que del radical hidroxilo, ya que si este último produjera el efecto sobre la

expresión, se habría traducido en este experimento en una expresión de CFTR similar para los cinco grupos (control – MCI, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M).

Los grupos sometidos a la acción del peróxido a 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M, estuvieron en contacto con cantidades crecientes de peróxido de hidrógeno, durante 16 horas de incubación, tiempo en que el cual el agente oxidante se transformó generando radicales hidroxilo. Durante este tiempo el atrapador captó los radicales libres que fueron apareciendo de modo que las muestras estuvieron sometidas a estrés oxidativo, pero dado en mayor proporción por el peróxido de hidrógeno.

Al analizar las muestras la tendencia al aumento en la expresión sólo se observa a la concentración de 100 μ M, situación que no se observó en los experimentos anteriores en los que la tendencia al aumento se observó tanto en el grupo sometido a 100 μ M como al grupo a 200 μ M. en este caso el grupo sometido a la concentración de 200 μ M, presenta una tendencia a disminuir la expresión de la proteína similar a lo observado a las concentraciones más altas de los experimentos (400 μ M y 500 μ M).

Cuando se comparan los grupos sometidos a las concentraciones de 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M con el grupo control – MCI el promedio de la expresión de CFTR en todos estos grupos tiende a ser menor al control.

En el análisis estadístico se observó que existían diferencias significativas entre el grupo a sometido a 100 μ M con respecto a 200 μ M, 400 μ M y 500 μ M.

IV- EVALUACIÓN DE LA MORTALIDAD CELULAR A 100 μ M, 400 μ M Y 500

μ M.

Al observar en los experimentos antes mencionados que la expresión del canal CFTR tendía a disminuir a valores menores que los niveles basales de expresión cuando las muestras eran sometidas a concentraciones de 400 μ M y 500 μ M, notamos la importancia de determinar si esta disminución era atribuible o no a un porcentaje de muerte celular importante en estas muestras.

Por esta razón se decidió evaluar el porcentaje de mortalidad celular en muestras sometidas a concentraciones de 100 μ M, 400 μ M y 500 μ M de peróxido de hidrógeno incubadas durante 16 horas. La mortalidad observada en las muestras control en todos los experimentos fue relativamente baja, la que fue estimada en un 2 %. Los resultados fueron obtenidos por conteo celular directo de células viables y no viables mediante la cámara de Neubauer donde se observó un porcentaje de mortalidad de 7,9 – 9,6 y 10,9 % para las muestras de 100 μ M, 400 μ M y 500 μ M respectivamente. Estos valores demuestran que la presencia del agente oxidante en altas concentraciones provoca en las células un efecto importante donde la mortalidad aumenta en forma directamente proporcional a la concentración del agente oxidante. Sin embargo la mortalidad más alta presentada (500 μ M), no puede ser considerada como relevante en términos de modificar los resultados finales de expresión de la proteína, como se pensó en un principio, sino sólo como una respuesta normal celular frente a la injuria.

Con la realización de este trabajo pudimos evaluar que, la tendencia de la expresión de la proteína CFTR es al aumento, en forma directamente proporcional a la concentración del agente oxidante, aumento que sin embargo

no es considerado significativo al análisis estadístico, lo que no cierra la posibilidad de que nuestra hipótesis sea nula, si no que abre una puerta a futuras realizaciones de experimentos donde se pueda confirmar o descartar esta hipótesis. Hacemos notar además que el método utilizado para la medición de la expresión de esta proteína, presenta enorme cantidad de variables, donde en cada etapa de la realización de un experimento se puede incurrir en errores que aunque son mínimos, pueden afectar finalmente la medición de la banda. Por otra parte la medición de densitometría de las bandas mediante el software UN SCAN – IT al no ser automático en su totalidad puede presentar diferencias en las mediciones que produzcan finalmente mayor variabilidad de los resultados.

Por esta razón consideramos que la realización de este método requiere la realización de una cantidad de experimentos mayor de modo de disminuir el error en las mediciones.

En el caso de no utilizar este método existen otras alternativas para medir la expresión de esta proteína al ser sometida a estrés oxidativo como son el “Southern blot” y el “Northern blot”, trabajando con DNA y RNA respectivamente. También podría evaluarse la realización de PCR para el estudio de expresión de este gen.

VII) CONCLUSION

La expresión del canal CFTR expuesto a concentraciones de 100 μM , 200 μM , 400 μM y 500 μM de peróxido de hidrógeno durante 16 horas tiende a aumentar en forma directamente proporcional a la concentración del agente oxidante, teniendo como límite la concentración de 200 μM de peróxido de hidrógeno, a partir de la cual se produce una disminución paulatina de la expresión del canal. Al análisis estadístico se observa que estas diferencias no son significativas.

El efecto mostrado es producido mayormente por el efecto del peróxido de hidrógeno.

El porcentaje de mortalidad celular aumenta en forma directamente proporcional a la concentración del agente oxidante.

La mortalidad celular producida por el agente oxidante no influye en términos absolutos en la expresión final de la proteína CFTR

VIII) BIBLIOGRAFIA

- **Akabas MH.** 2000. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **275**: 3729-3732.
- **Bradford, M.** 1976 A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- **Cannon, CL; Kowalski, MP; Stopak, KS; Pier, GB.** 2003. *Pseudomona aeruginosa* induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells Regulator expressing mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **29**: 188-189.
- **Cowley EA ; Linsdell P.** 2002.Oxidant stress stimulates anion secretion from the human airway epithelial cell line Calu -3: implications for cystic fibrosis lung disease. *J Physiol.* **543**: 201-209.
- **Dalemans W; Barbry P; Champigny G; Jallat S; Dott K; Dreyer D; Cristal RG; Pavirani A; Lecocq JP; Lazdunski M.** 1991. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* **354**: 526-528
- **Day, BJ; Van Heeckeren, AM; Min, E; Velsor, IW.** 2004. Role of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator protein in a glutathione response to bronchopulmonary Pseudomonas infection. *Infec. Immun.* **72**: 2045-2051.
- **Gadsby DC; Nairn AC.** 1999. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol. Rev.* **79**: S77-S107
- **Gao, L; Kim, KJ; Yankaskas, JR; Forman, HJ.** 1999. Abnormal glutathione transport in Cystic Fibrosis airway epithelia. *Am. J. Physiol.* **277**: L113-L118.
- **Higgins, CF;** 1995. The ABC of channel regulation. *Cell* **82**: 693-696

- **Hudson VM.** 2001. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radical Biol. Med.* **30**: 1440-1461
- **Jungas, T; Motta, I; Duffleux, F; Fanen, P; Stoven, V; Ojcius, DM.** 2002. Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **277**: 27912-27918.
- **Kikkawa U; Matsuzaki H; Yamamoto T.** 2002. Protein kinase C δ : activation mechanisms and functions. *J. Biochem.(Japan)* **132**: 831-839.
- **Kogan I; Ramjeesingh M; Li C; Kidd JF; Wang Y; Lesli EM; Cole SPC; Bear CE.** 2003. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J.* **22**: 1981-1989
- **Linsdell P; Hanrahan JW.** 1998. Glutathione permeability of CFTR. *Am. J. Physiol.* **275**: C323- C326.
- **Li C; Ramjeesingh M; Wang W; Garami E; Hewryk M; Lee D; Rommens JM; Galley K; Bear CE.** 1996. ATPase activity of the Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **271**: 28463-28468.
- **Pier, GB; Grout, M; Zaidi, TS.** 1997. Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas Aeruginosa* from the lung. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **94**:12088-12093.
- **Pilewski, JM; Frizzell, RA.** 1999. Role of CFTR in airway disease. *Physiol. Rev.* **70**: S215-S255.
- **Ratjen, F ; Doring, G.** 2003. Cystic Fibrosis. *The Lancet* **361**: 681-689.

- **Riordan, JR; Rommens, JM; Kerem, BS; Alon, N; Rozmahel, R; Grzelczac, Z; Zielenski, J; Lok, S; Plavsic, N; Chou, J; Drumm, ML; Iannuzzi, MC; Collins, FS; Tsui, L-C.** 1989. Identification of the Cystic Fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**:1066-1073.
- **Sharma M; Benharouga M; Hu W; Luckas GL.** 2001. Conformational and temperature-sensitive stability defects of the $\Delta F508$ cystic fibrosis conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartment. *J. Biol. Chem.* **276**: 8942-8950.
- **Tabcharani JA; Chang X-B; Riordan JR; Narran JW.** 1991 Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* **352**: 628-631.
- **Velsor LW; Van Heeckeren A; Day BJ.** 2001. Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *J. Physiol.* **281**: L31- L28
- **Wu G; Fang Y-Z; Yang S; Lupton JR; Turner ND.** 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* **134**: 489-492.

IX) ANEXOS

Soluciones:

1- Solución Buffer fosfato (PBS)

Para 1000 ml de solución

KCl	0.2 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
NaCl	8.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.16 g

2- Buffer de Lisis :

Tris	50 mM
Triton X-100	1%
EDTA	5 mM
NaCl	150 mM

3 - Buffer de carga

SDS	5%
BFB	0.008%
Tris ph 8.8	0.24M
Glicerol	16%

Agregar β - Mercapto 5 μ l /100 de Buffer

4- Buffer de corrida 10X

TRIS	250 mM
Glicina	1920 mM
SDS	1%

5- Buffer de Transferencia 10X

Buffer Tris	30 grs
Glicina	144 grs
SDS	3 grs

6- TBS (Inmunoblott washes) 10X 1000ml

Buffer Tris	24.228 grs Tris
HCL pH 8	10 ml de HCl
NaCl	292.2 grs
pH final	7.5

Esquemas y figuras anexas

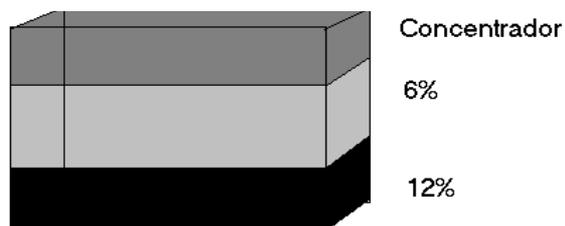
Geles de poliacrilamida

Figura 1

	6%	12%	Concentrador
H ₂ O	4.125 ml	2.625 ml	1.55 ml
Buffer Tris 1.5 M pH 8.9	1.875 ml	1.875 ml	0.625 (pH 6.8)
Acrilamida bis Acrilamida	1.5 ml	3 ml	0.325 ml
SDS 10%	75 µl	75 µl	12.5 µl
APS 10%	100 µl	100 µl	50 µl
Temed	10 µl	10 µl	5 µl

Gel de acrilamida de dos concentraciones

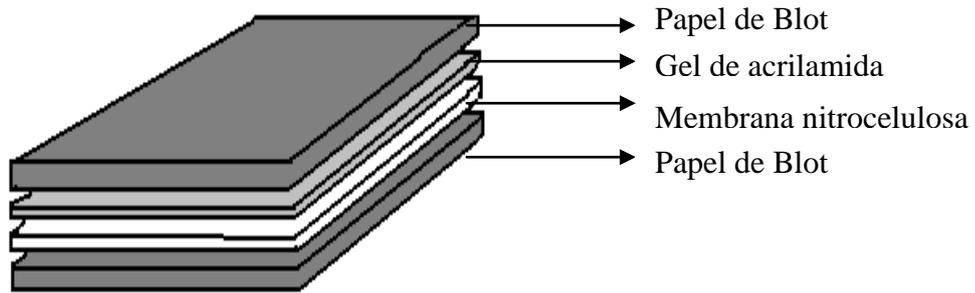
Figura 2



- El gel de acrilamida es preparado en tres fases.
- 6%, 12% y gel concentrador respectivamente
- los geles se cargan en mini-cámara en el mismo orden mencionado.

Transferencia

Figura 3



- Todos los elementos fueron previamente sumergidos en Buffer de transferencia.
- El "sándwich" es posteriormente introducido en la maquina de transferencia