

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION



TITULO:

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SINÁPTICAS Y PATRONES DE UBIQUITINACIÓN EN CONDICIONES DE SOBRECARGA Y DEFICIENCIA DE COBRE EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS DE CEREBRO DE RATA.



Tesis de Magíster presentada a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Ciencias, mención Fisiología

Por

Mauricio Quiroz Jara

2011

4. RESUMEN

El ión cobre es un micronutriente esencial para diferentes reacciones, debido a que es requerido para la actividad catalítica de diferentes enzimas presentes en el cerebro. Sin embargo, este metal puede ser tóxico por su alta actividad oxido/redox, y por lo tanto, su homeostasis celular se encuentra altamente regulada, donde una serie de proteínas participan en el transporte, reclutamiento, tráfico, compartimentalización e inserción del cobre en proteínas apropiadas. El aumento de los niveles de metales en el cerebro ha sido asociado al envejecimiento normal y también a una serie de enfermedades, entre las que destaca la enfermedad de Alzheimer. La acumulación de proteínas sería importante en el daño de las enfermedades neurodegenerativas. Resultados preliminares en nuestro laboratorio, obtenidos mediante tratamiento con cobre en cultivos primarios de neuronas de cerebros de rata, indican que CuCl_2 induce la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas, situación por la cual nos planteamos la hipótesis que los niveles de proteínas-poli-ubiquitinadas aumentan en presencia de CuCl_2 . En esta tesis confirmamos los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y además determinamos que CuCl_2 induce la formación de proteínas poli-ubiquitinadas y disminuye la acumulación de proteínas poli-ubiquitinadas inducida por MG132, un inhibidor del proteosoma. Sin embargo, TTM no afecta los niveles basales de PSD95, β -catenina y proteínas poli-ubiquitinadas en cultivos primarios neuronales. Por el contrario, TTM disminuye los niveles de proteínas poli-ubiquitinadas en ratones tratados en forma crónica con este metal.

Los estudios realizados en cultivos primarios hipocampales indican que los niveles de PSD95, β -catenina y proteínas poli-ubiquitinadas aumentan luego de

12 horas de incubación con CuCl_2 ($10\mu\text{M}$), mientras que al tratar las células con TTM, no se observan variaciones con respecto al control. El efecto de este quelante no es único para las células hipocampales, debido a que al realizar los ensayos con células corticales de rata, se observa que TTM no modifica los niveles de β -catenina, ni tampoco de proteínas poli-ubiquitinadas. Además, para observar si TTM ($10\mu\text{M}$), produce modificación a nivel transcripcional, estudiamos los cambios en los mRNA de Ubiquitina A y C, después de 12 horas de tratamiento, las células tratadas con TTM ($10\mu\text{M}$) no presentan variación con respecto al control. Sin embargo, los niveles de mRNA de UbC aumentan significativamente en los tratamientos con CuCl_2 ($10\mu\text{M}$) o MG132($10\mu\text{M}$). Para observar el efecto de la administración crónica de TTM sobre la acumulación de distintas proteínas a nivel de organismo, inyecciones intraperitoneales a ratones con TTM (10 mg/kg) por 9 días, indican una disminución en los niveles de β -catenina y proteínas poli-ubiquitinadas en tejido renal, hepático y cerebral. Mientras que un tratamiento agudo (3 días), sólo produce modificación en los niveles de estas proteínas en tejido intestinal. Estos datos indican que TTM efectivamente regula los niveles de proteínas poli-ubiquitinadas. De hecho, nuestros resultados indican que TTM bloquea la acumulación de proteínas ZsGreen inducida por MG132. En base a los resultados obtenidos en esta tesis confirmamos que CuCl_2 induce la formación de proteínas poli-ubiquitinadas y la acumulación de proteínas a nivel neuronal, mientras que TTM disminuye los niveles de proteínas poli-ubiquitinadas, indicando que controla la biodisponibilidad del cobre, lo que podría constituir un blanco farmacológico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de proteínas y la disfunción del Sistema Ubiquitina-Proteosoma.