

Análisis de la posible implicación de la tiorredoxina *o1* de *Pisum sativum* (PsTrxo1) en el proceso de autofagia mediado por estrés oxidativo y análisis de la actividad ATG4 y ATG8



Rubén Saez Verdú, Gonzalo Valverde Gómez

Tutoras: Dra. Ana Jiménez Hurtado¹, Dra. María del Carmen Martí Ruiz¹ y Magdalena Martínez Boscadas²

¹CEBAS-CSIC, ²IES Infante D. Juan Manuel



INTRODUCCIÓN

Cuando las células de *Nicotiana tabacum* (BY-2) son sometidas a un estrés oxidativo, su viabilidad se reduce y la mayoría mueren. Sin embargo cuando las células sobre-expresan una proteína de regulación redox, la tiorredoxina *o1* (PsTrxo1) implicada en la regulación por reducción de formas oxidadas inactivas de ciertas proteínas, la viabilidad de estas células aumenta considerablemente. Por otro lado, se conoce la implicación del proceso de autofagia celular en la respuesta a estrés y así, el objetivo principal de esta investigación será comprobar si el proceso autofágico interviene en ese aumento de viabilidad observado en las células sobre-expresantes PsTrxo1 cuando se las somete a un tratamiento oxidativo con peróxido de hidrógeno.

OBJETIVOS

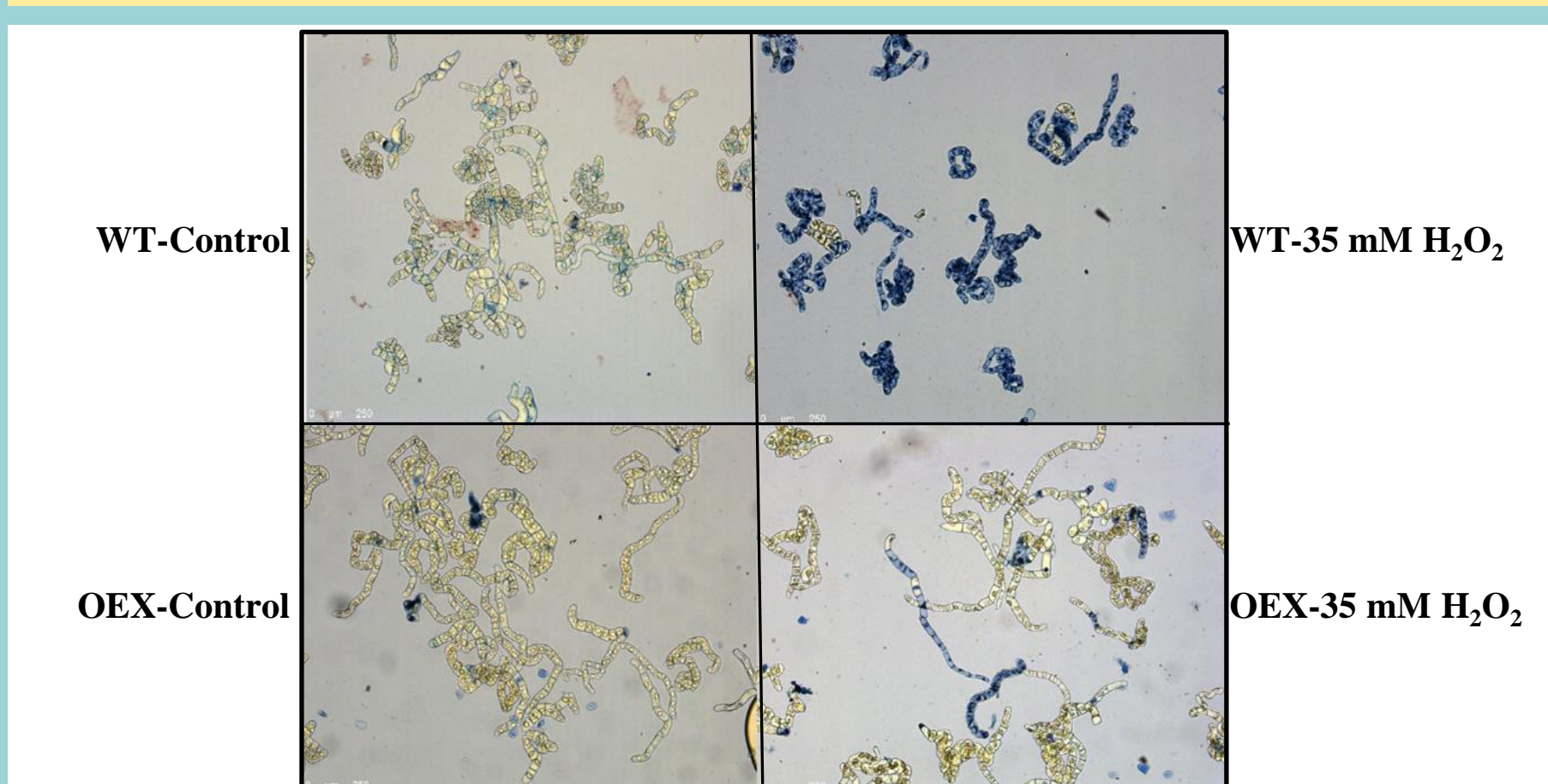
- I. Corroborar la implicación de la proteína tiorredoxina (PsTrxo1) en la viabilidad de células de tabaco BY-2 sometidas a una situación adversa como es el estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
- II. Determinar si el proceso de autofagia también está implicado en la viabilidad de células de tabaco BY-2 crecidas en las mismas condiciones que en el objetivo I, mediante el uso de inhibidores específicos de autofagia.
- III. Evaluar si la posible participación de la proteína PsTrxo1 en la viabilidad celular en condiciones de estrés oxidativo, se debe a su efecto regulador sobre determinadas proteínas implicadas en la autofagia como ATG4 y ATG8.

HIPÓTESIS

- La viabilidad en las células tratadas con H₂O₂ debe ser mayor en la línea celular que sobre-expresa la proteína PsTrxo1 (línea OEX) que en la que no sobre-expresa (línea WT).
- La autofagia estaría implicada en la viabilidad de las células sobre-expresantes de tabaco sometidas al estrés oxidativo y por tanto si la inhibimos disminuirá la viabilidad.
- La proteína PsTrxo1 podría regular la actividad de determinadas proteínas importantes en la autofagia como ATG4 y ATG8.

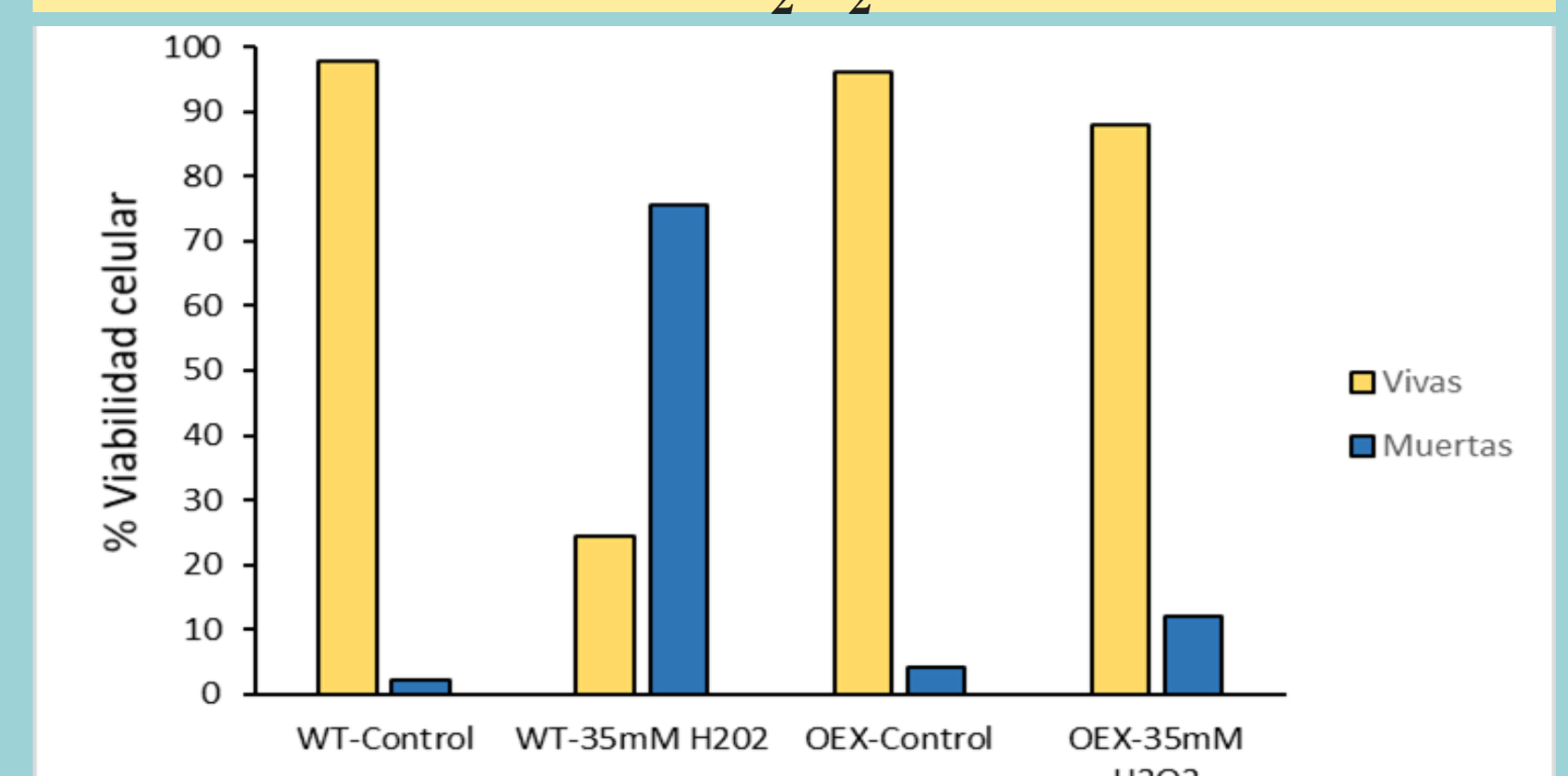
RESULTADOS

Observación de muerte celular por tinción con Trypan-blue en células WT y OEX PsTrxo1 tratadas con H₂O₂

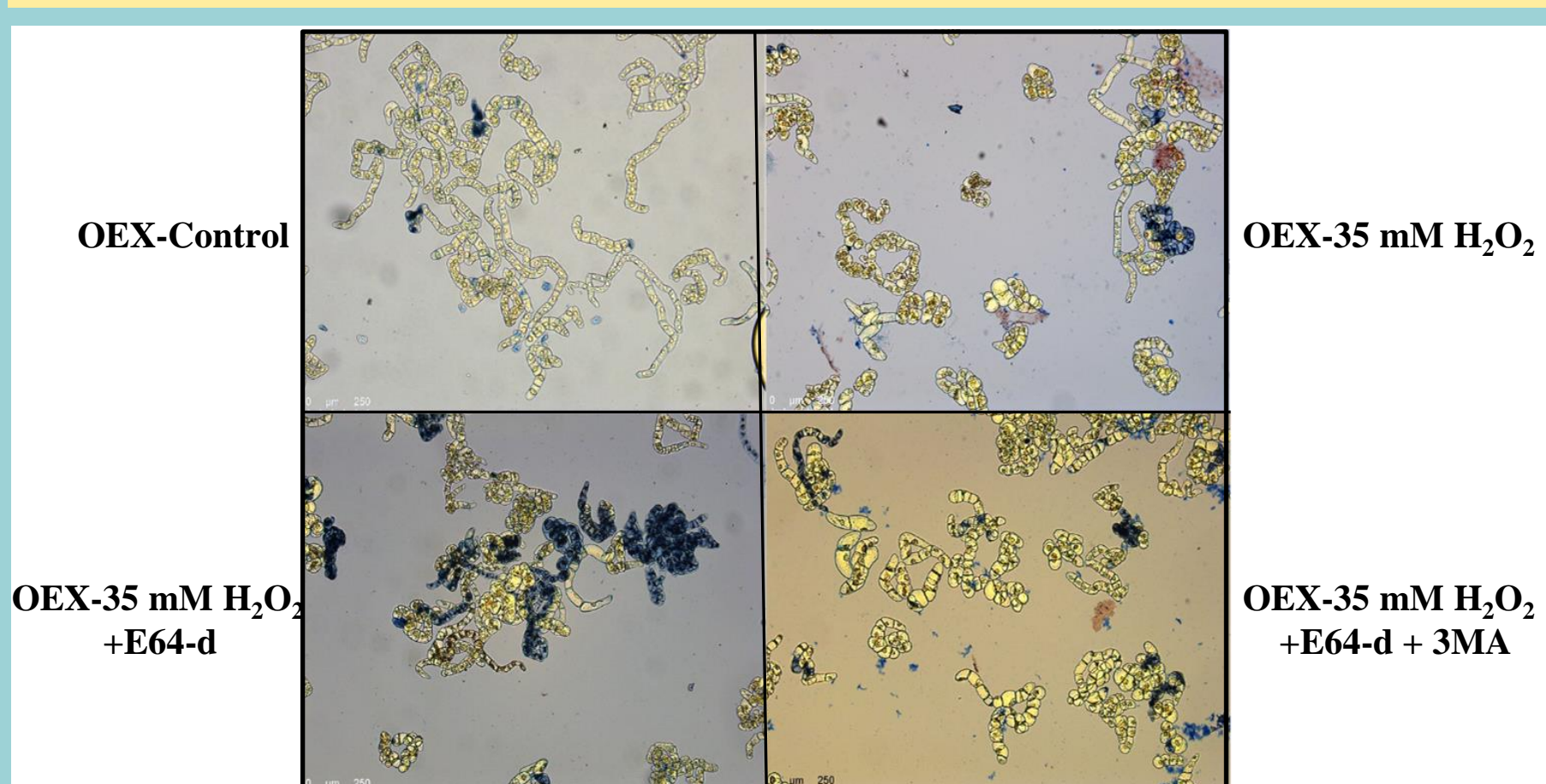


	Vivas	Muertas	Total	Viabilidad (%)
WT-Control	4180	102	4282	97'62%
WT-35 mM H ₂ O ₂	577	1780	2357	24'48%
OEX-Control	2447	103	2550	95'96%
OEX-35mM H ₂ O ₂	3424	467	3892	87'98%

La sobreexpresión de PsTrxo1 aumenta la viabilidad de las células sometidas a estrés por H₂O₂

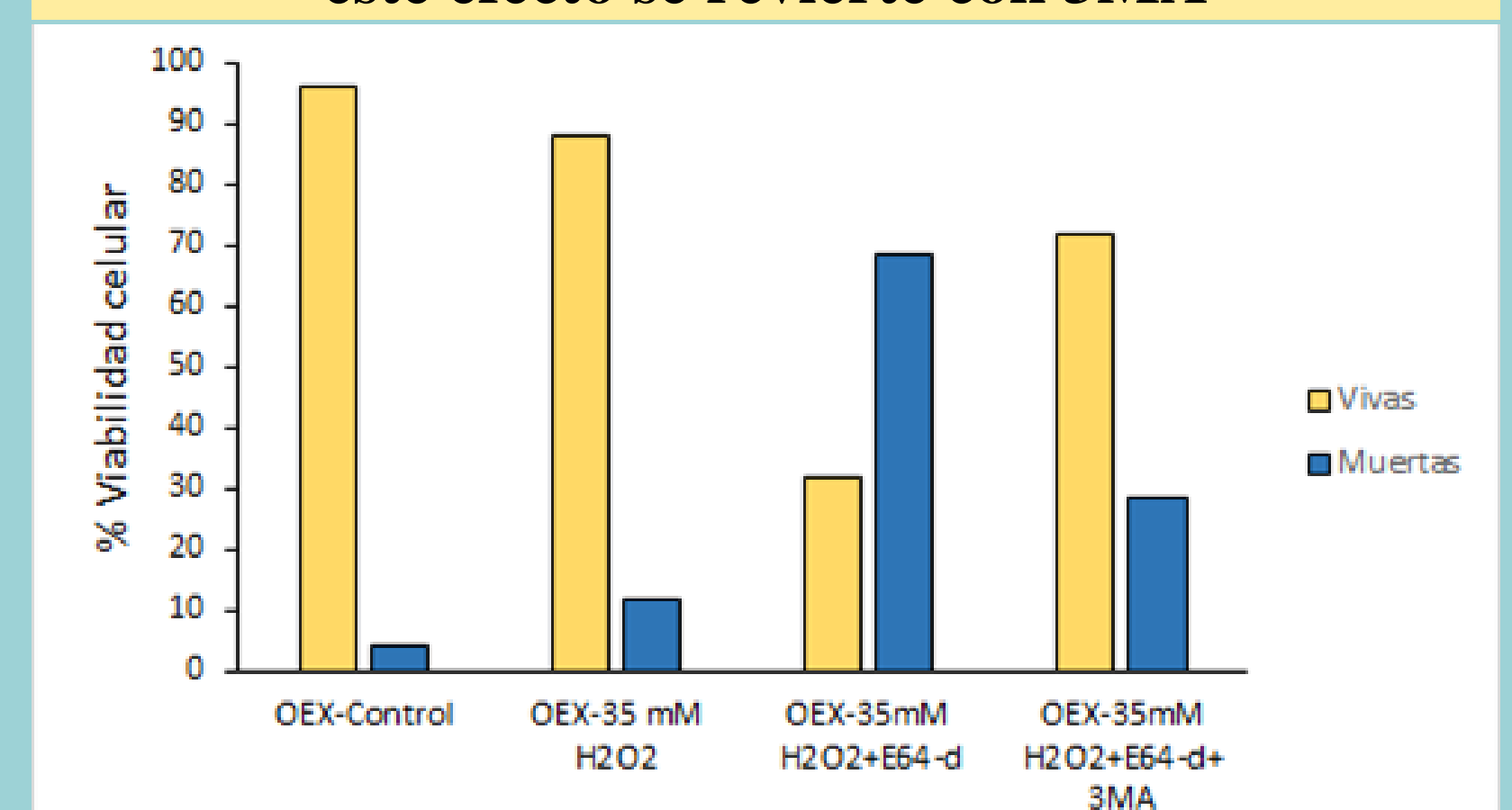


Observación de muerte celular en presencia de inhibidores de autofagia E64-d y 3MA

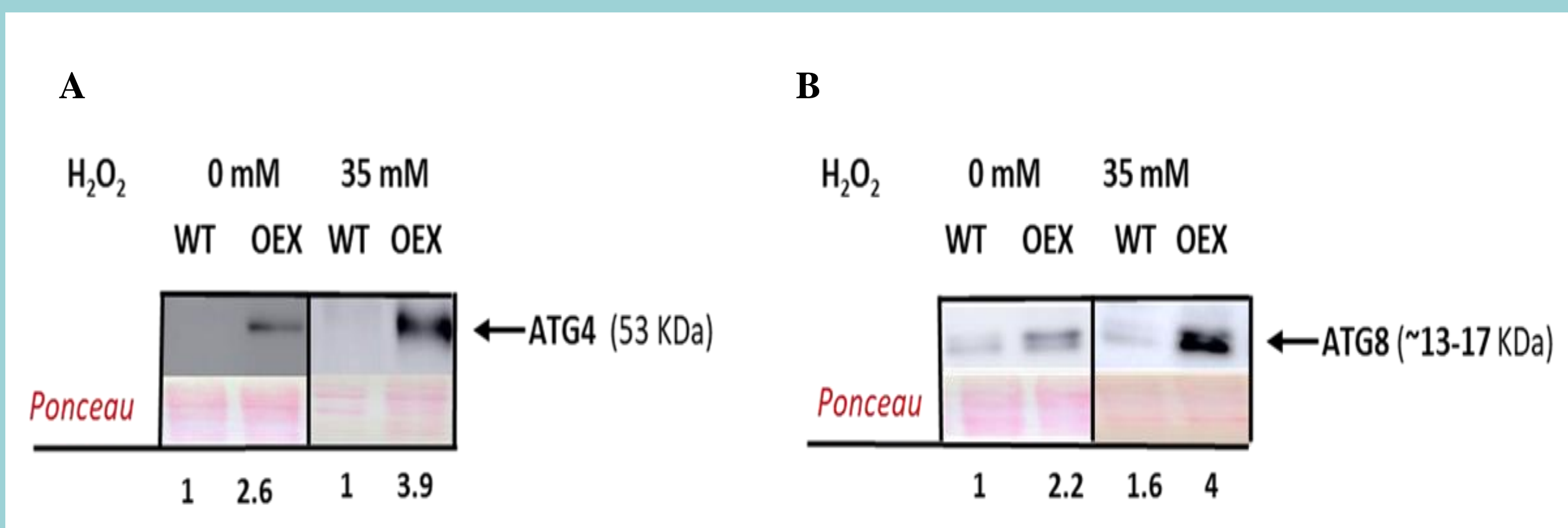


	Vivas	Muertas	Total	Viabilidad (%)
OEX-Control	2447	103	2550	95'96%
OEX-35 mM H ₂ O ₂	3424	467	3892	87'98%
OEX-35mM H ₂ O ₂ +E64-d	958	2065	3023	31'7 %
OEX-35mM H ₂ O ₂ +E64-d+3MA	4166	1643	5809	71'72%

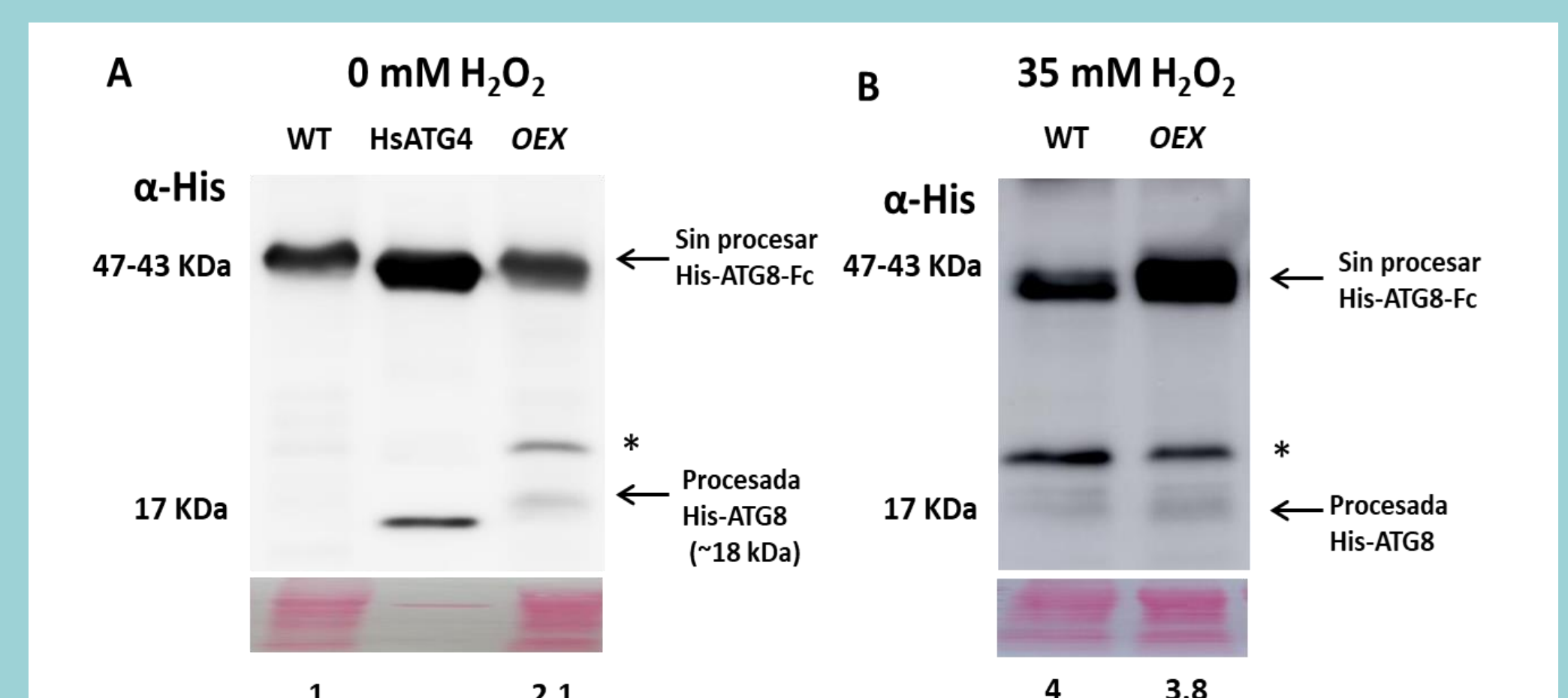
El inhibidor de autofagia E64-d reduce la viabilidad de las células OEX tratadas con H₂O₂ y este efecto se revierte con 3MA



La línea OEX presenta un mayor nivel de proteínas ATG4 y ATG8 que intervienen en la autofagia



Las células sobre-expresantes de PsTrxo1 muestran una actividad de ATG4 mayor que las WT en ausencia de H₂O₂



CONCLUSIONES

1. La proteína PsTrxo1 participa aumentando la viabilidad de células de tabaco BY-2 sometidas a una situación de estrés oxidativo por H₂O₂, ya que su sobre-expresión es fundamental a la hora de resistir el estrés.
2. La autofagia está implicada en la viabilidad celular de la línea sobre-expresante sometida al estrés oxidativo, ya que al inhibirla mueren más células.
3. La proteína PsTrxo1 interviene en la regulación de la cantidad y actividad de las proteínas ATG4 y ATG8 y por tanto en la autofagia, colaborando en la supervivencia celular.