



PROGRAMA DE FARMACOLOGIA MOLECULAR Y CLINICA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMEDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Proyecto de tesis de pregrado:

## Generación de animal knockout contra la enzima DT-diaforasa

El objetivo de este proyecto es generar un animal knockout DTdiaforasa (-/-), que está dentro del marco de un proyecto general que estudia los mecanismos de neurodegeneración en la enfermedad de Parkinson. Tenemos evidencias a nivel de cultivos celulares, que incluye el silenciamiento de la enzima con siRNA, que la enzima DT-diaforasa protege las neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina. También tenemos evidencias de que DT-diaforasa protege las neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina en animales usando un inhibidor. Sin embargo, estas evidencias *in vivo* no pueden descartar que sean efectos inespecíficos. Por esta razón la única evidencia 100 % específica que permita validar nuestra hipótesis es generar un animal knockout contra la enzima DT-diaforasa.

**Nuestra hipótesis** en general es que la enfermedad de Parkinson se gatilla cuando aminocromo, un metabolito intermediario que se genera durante la oxidación de dopamina a neuromelanina, es neurotóxico cuando la enzima DT-diaforasa se encuentra inhibida o con expresión baja.

**Proyecto de tesis:** Estamos en la etapa en que estamos transfectando el constructo que tiene eliminado el gen de la DT-diaforasa a células embrionales (ES).

Objetivos específicos:

1. Electroporación del vector pCas-guide dentro de células ES, apropiada selección y aislamiento de clones resistentes.
2. Búsqueda de clones de células ES -pCas-Guide por PCR.
3. Confirmación de clones de células ES pCas-Guide positivos por secuenciación.
4. Introducción de células ES dentro de embriones huésped, transferencia dentro de la madre subrogada
5. Genotipo por PCR para confirmar el estatus de Knockout
6. Caracterización del animal Knockout por WB, QPCR, IF e IHQ
7. Obtención del F1

**Infraestructura:** Tenemos toda la infraestructura necesaria que incluye, microscopio con micro manipulación, micro inyección, crío preservación, laboratorio de animales transgénicos, etc.

**Financiamiento:** Tenemos una beca de FONDECYT para tesista de pregrado (\$2.500.000) anuales

**Directores de Tesis:** Dra. Patricia Muñoz y Prof. Juan Segura-Aguilar. Somos un grupo de investigación muy productivo. Dra. Patricia Muñoz tiene 28 publicaciones ISI en los últimos 8 años y Prof. Juan Segura-Aguilar tiene 58 publicaciones ISI en los últimos 10 años (más información ver PubMed (Muñoz P o Segura-Aguilar J)).

**Contacto y más información:**

e-mail: [jsegura@med.uchile.cl](mailto:jsegura@med.uchile.cl)

Teléfono: 229786057