

Trabajo Fin de Máster

EFECTO DEL GENOTIPO MITOCONDRIAL
SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL PLASMALEMA
NEURONAL,
LA SINAPTOGENÉISIS Y LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER

Autor/es

Alba Pesini Martín

Director/es

Eduardo Ruiz Pesini

Julio Montoya Villaroya

Facultad de Veterinaria

2013

ABREVIATURAS

A β : Proteína β -amiloide

ACh: Acetilcolina

AD: Enfermedad de Alzheimer

BSA: Albúmina sérica bovina

CI, CIII y CIV: Complejos I, III, y IV

CDP-colina: 5' - citidina difosfato colina

CNS: Sistema nervioso central

CNTF: Factor Neurotrófico Ciliar

CTP: Citidina trifosfato

D: Células diferenciadas

DAG: Diacilglicerol

DHO: Dihidroorotato

DHODH: Enzima dihidroorotato deshidrogenasa

DMHA: Dimetil-hexil-amina

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ETC: Cadena de transporte de electrones

FBS: Suero fetal bovino

Glc : Glucosa

MNGIE: Encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial

MS: Espectrometría de masas

mtDNA: DNA mitocondrial

NaN₃: Azida sódica

nDNA: DNA nuclear

OXPHOS: Sistema de fosforilación oxidativa

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: Tampón fosfato salino con Tween

PC: Fosfatidilcolina

Q: Coenzima Q

RA: Ácido Retinoico

ROS: Especies de oxígeno reactivas

SD: Células sin diferenciar

TH: Tirosina hidroxilasa

U: Uridina

UMP: Uridina monofosfato

UPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

UTP: Uridina trifosfato

VAcHT: Transportador vesicular de acetilcolina

ρ0: Células rho⁰

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (AD) se define como un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central (CNS). Esta patología se caracteriza por la pérdida de memoria, cambios de comportamiento y confusión, dejando a los pacientes completamente inválidos.

Este tipo de procesos mentales dependen del correcto funcionamiento de las redes neuronales. En el caso del AD son las neuronas colinérgicas las que se ven afectadas. Las conexiones neuronales vienen dadas por la correcta sinaptogénesis, y para ello necesitan la producción de neuritas, elongaciones de la membrana plásmica de la propia célula.

Los principales compuestos de la membrana celular son los fosfátidos. Este tipo de molécula necesita para su formación la participación del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) y la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). La combinación de ambos factores da lugar al nucleósido de pirimidina, uridina, precursor de los fosfátidos. Un fallo en la cadena respiratoria de la mitocondria produciría como consecuencia el de la DHODH y una disminución de los niveles de uridina celulares.

Se ha observado en diferentes estudios que la administración de uridina y compuestos relacionados (CDP-colina, CTP, UTP) producían una mejoría en pacientes de AD.

El estudio de la inhibición de estos dos factores, el sistema OXPHOS y la DHODH, podría explicar el papel de la mitocondria en la formación de la membrana celular y las conexiones neuronales que se ven dañadas con la AD.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is defined as a neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS). This disease is characterized by memory loss, behaviour changes and confusion, leaving patients completely invalid.

This type of mental processes depends on the proper function of neural networks. Cholinergic neurons are affected in AD. Neuronal connections depend on a correct synaptogenesis, and to that end, they need the production of neurites, which consist in elongation of the plasma membrane of the cell itself.

The main compounds of the cell membrane are phosphatides. These molecules require from a correct OXPHOS system and dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) activity. The combination of these factors leads to the pyrimidine nucleoside production, uridine, a precursor of phosphatides. A failure in the mitochondrial respiratory chain would produce the inhibition of DHODH and would decrease cellular uridine levels.

It has been observed that the administration of uridine and related compounds (CDP-choline, CTP, UTP) produced an improvement in AD patients.

The study of these two factors inhibition, OXPHOS system and the DHODH, could explain the role of mitochondria in the cell membrane formation and neuronal connections that are damaged in AD.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Enfermedad de Alzheimer.....	1
2. Papel del sistema OXPHOS en la enfermedad de Alzheimer.....	2
3. Papel del sistema OXPHOS en la neuritogénesis.....	7
3.1. Formación de la membrana celular.....	7
3.2. Uridina y la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH).....	9
II. OBJETIVOS.....	11
III. METODOLOGÍA.....	12
1. Líneas celulares.....	12
2. Medios de cultivo.....	12
3. Condiciones de cultivo celular.....	12
4. Reactivos.....	13
5. Procedimientos de cultivo celular.....	13
6. Diferenciación neuronal de la línea SH-SY5Y.....	13
-Diferenciación neuronal.....	13
-Células SH-SY5Y con uridina y azida sódica.....	14
-Diferenciación a neurona colinérgica.....	14
7. Diferenciación celular de la línea NT2.....	15
8. Análisis de la viabilidad celular en presencia de azida sódica.....	15
9. Detección de proteínas por citometría de flujo.....	16

10. Análisis de proteínas mediante Western Blot.....	17
-Extracción de proteínas totales de células de cultivo.....	17
-Cuantificación de proteínas por espectrofotometría. Método de Bradford.....	17
-Preparado de las muestras para la carga en el gel.....	18
-Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....	19
-Transferencia a membrana PVDF.....	20
-Análisis de proteínas por inmunotransferencia. Western-blot.....	20
11. Análisis de proteínas por microscopía de fluorescencia.....	21
12. Determinación de orotato, dihidroorotato (DHO), UMP, UDP Y UTP de fibroblastos.....	23
-Separación cromatográfica.....	23
-Método de separación.....	24
-Método de detección.....	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
1. Diferenciación neuronal de la línea SH-SY5Y.....	25
-Diferenciación a fenotipo morfológico neuronal.....	25
-Viabilidad neuronal.....	27
2. Análisis de la formación de neuritas en presencia o ausencia de uridina.....	29
3. Análisis de la formación de neuritas en presencia o ausencia de uridina y/o azida sódica.....	31
-Viabilidad celular en presencia de azida sódica.....	31

4. Diferenciación de la línea SH-SY5Y a neurona colinérgica.....	34
-Análisis de la morfología neuronal.....	34
-Análisis de marcadores neuronales.....	35
-Análisis de marcadores colinérgicos.....	36
-Comprobación de la diferenciación de tipo colinérgico.....	37
5. Diferenciación de la línea NT2 a neurona colinérgica.....	39
-Análisis de la morfología neuronal.....	39
-Análisis de marcadores neuronales.....	40
-Análisis de marcadores colinérgicos.....	40
-Comprobación de la diferenciación de tipo colinérgico.....	41
6. Extracción de orotato, DHO, UMP, UDP y UTP de fibroblastos.....	43
V. CONCLUSIONES.....	46
VI. REFERENCIAS.....	47

I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un síndrome neurodegenerativo progresivo del sistema nervioso central (CNS) [1]. Se caracteriza principalmente por la pérdida de memoria, la apatía y la depresión, que son los primeros síntomas, y posteriormente también pueden aparecer alteraciones en el juicio, cambios de comportamiento, desorientación y confusión, y dificultad para tragar, hablar y caminar, lo que convierte a los enfermos en personas totalmente dependientes [2].

La AD es hoy en día la causa más común de demencia, ocupando entre un 60 y un 70% de los casos. A nivel mundial, casi 35,6 millones de personas padecen demencia, cifra que se duplicará en el 2030 (65,7 millones) y triplicará para el 2050 (115,4 millones). El tratamiento y el cuidado de personas con demencia cuesta actualmente al mundo más de 604 mil millones de dólares al año (Organización Mundial de la Salud). La AD es una de las mayores causas de muerte, siendo la sexta en Estados Unidos [2].

Se han identificado varias características patológicas en la AD, entre las que se incluyen la aparición de placas causadas por la agregación de un fragmento de la proteína β -amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares asociados con la fosforilación irregular de la proteína tau [1].

Uno de los hallazgos más consistente en la AD es la degeneración de las neuronas colinérgicas (y la disminución de los niveles de acetilcolina, ACh) del cerebro anterior basal, que ofrecen una amplia inervación para el hipocampo y la corteza cerebral [3].

El sistema colinérgico se ha visto que es uno de los más afectados con la edad, tanto con la vejez como con la enfermedad de Alzheimer se produce un fallo colinérgico. Pero este fallo común está producido por distintas causas en cada caso [4]. Mientras que con la edad el déficit colinérgico se debe a una falta en la función de las neuronas (pérdida de ACh por desgaste dendrítico, sináptico y axonal) y no a su muerte; en el caso de la AD el déficit colinérgico tiene numerosas hipótesis.

2. PAPEL DEL SISTEMA OXPHOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la mitocondria se encuentra el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) que entre otras muchas funciones dota de energía a las células.

Este sistema está compuesto por la cadena de transporte de electrones (ETC) o cadena respiratoria y por la ATP sintasa o complejo V. La cadena respiratoria incluye a su vez a los complejos I (CI), III (CIII) y IV (CIV), además del citocromo c y la coenzima Q (Q). Trece polipéptidos de los más de 80 que forman estos complejos están codificados en el DNA mitocondrial (mtDNA) (Figura 1).

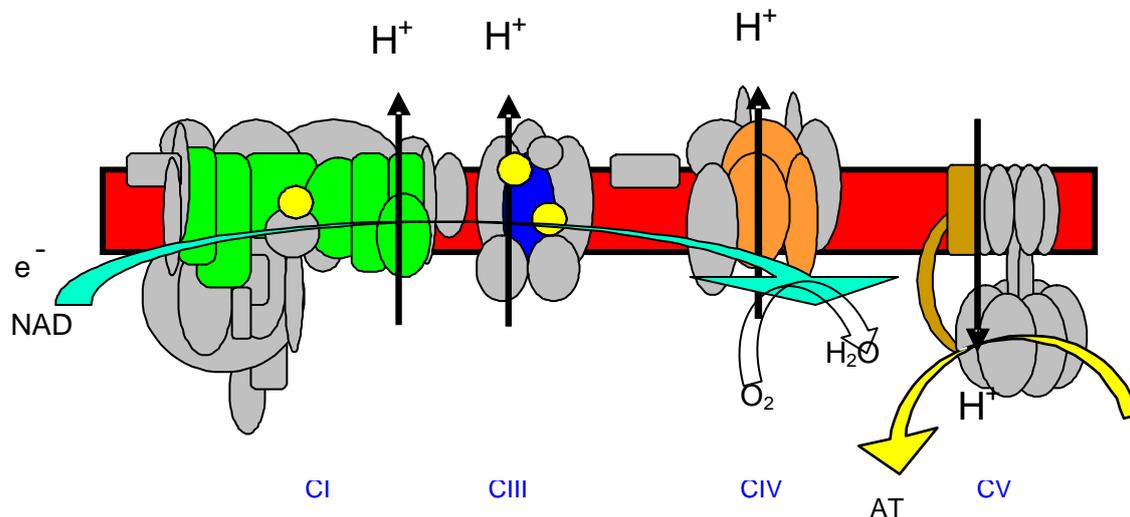


Figura 1. Sistema de fosforilación oxidativa. Las subunidades marcadas en verde, azul, naranja y marrón son codificadas en el mtDNA y las marcadas en gris por el DNA nuclear (nDNA).

El sistema OXPHOS produce la mayor parte del ATP, molécula necesaria para realizar todas las funciones vitales entre las que se encuentran pensar y recordar, funciones que se ven afectadas en la enfermedad de Alzheimer.

Debido a su localización y a sus características específicas, el mtDNA tiene una tasa mutacional mucho más elevada que el nDNA. Por ello, a medida que vamos envejeciendo la frecuencia de mutaciones en el mtDNA aumenta y se produce una disminución de la función del sistema OXPHOS. Estos dos factores acompañan al hecho de que con la edad también aumenta el riesgo de padecer Alzheimer.

Existen numerosos estudios que apuntan a una posible relación entre la mitocondria y su funcionamiento con la enfermedad de Alzheimer.

-Otro factor de riesgo para esta enfermedad, después de la edad, es la de tener un pariente cercano afectado, y más si se trata de uno de los progenitores. Se estudió a pacientes que padecían la enfermedad y que además tenían uno de sus progenitores afectados y se vio que en la gran mayoría de los casos era la madre la progenitora afectada. Esto sugiere que existe mayor riesgo si es la madre la que ha padecido Alzheimer, hecho que vuelve a vincular la enfermedad con la mitocondria, ya que el mtDNA se transmite únicamente por vía materna [5].

-Asimismo también se observó que adultos sanos, que no padecen la enfermedad, pero que tenían la madre afectada, poseían un volumen de materia gris cerebral menor que el de personas sanas sin ningún progenitor afectado o incluso que el de sanos con el padre enfermo. Sin embargo, no se vieron diferencias entre los que tenían los dos progenitores sanos y los que tenían el padre afectado [6].

-Los individuos sanos que tenían la madre afectada además acumulaban más β -amiloide cerebral que los sanos sin ningún progenitor afectado o con sólo el padre enfermo, y al igual que el estudio anterior no se encontraron apenas diferencias entre los que tenían el padre afectado o ningún progenitor afectado [7].

-Siguiendo con este tipo de individuos, sanos con la madre afectada, se vio que poseían una tasa metabólica cerebral de glucosa reducida en comparación con los otros dos tipos de individuos, con ninguno de los progenitores o sólo el padre afectado [8, 9]. A lo largo de tan solo dos años, los que tenían la madre afectada perdían mucha capacidad de metabolizar glucosa, mientras que los otros dos tipos de individuos casi no sufrían modificaciones en su consumo de glucosa [10].

-En otro estudio se vio que las mitocondrias de neuronas de cerebros de pacientes con Alzheimer tenían una actividad del C IV reducida. En relación con esto, el flujo de electrones también se vio disminuido, lo que podría explicar el menor consumo de glucosa, y se produciría menor cantidad de ATP, lo que contribuiría a la aparición de desórdenes mentales. Además se observó, que esta disminución de la actividad del C IV no solo se daba en neuronas sino también en células de la musculatura y células sanguíneas en los enfermos de Alzheimer. Por lo que indicaría que esta carencia no se trata de una consecuencia de la patología sino una causa o por lo menos un factor de riesgo a tener en cuenta [11].

-Con respecto al C IV se confirmó su importancia para la función cerebral. Para ello se trataron ratas con azida sódica (NaN_3), un inhibidor de este complejo. Se observó que las ratas a las que se les administró esta sustancia desarrollaron lesiones en la corteza cingulada posterior, una de las primeras zonas afectadas en el Alzheimer, perdían sus neuronas y aumentaban el número de células gliales. Además se vio que ejecutaban peor las tareas que requerían el uso de la memoria [12].

-El C IV está codificado tanto por el mtDNA como el nDNA, 3 subunidades pertenecen al primero y las otras 10 al segundo. Por ello, para saber de qué parte radicaba el fallo se realizó un estudio mediante la tecnología de cíbridos transmitocondriales.

La generación de cíbridos transmitocondriales consiste en fusionar dos tipos de células. Células ρ^0 ($\rho 0$) que carecen de mtDNA y citoplastos, que son células enucleadas o plaquetas (ya que no tienen núcleo). Por un lado se cultivaron células (con un sistema OXPHOS formado por subunidades codificadas en el núcleo y subunidades codificadas en el mtDNA) con una droga que les eliminó el mtDNA. Esto hizo que ya no sintetizaran subunidades mitocondriales y no produjeran un sistema OXPHOS

operativo. Y por otro lado, plaquetas de pacientes de la enfermedad de Alzheimer o individuos sanos. Estas células se fusionaron resultando en dos líneas celulares distintas. La primera resultante de la fusión de las rho⁰ con plaquetas de enfermos, que poseen el nDNA de la célula donadora y el mtDNA de un paciente enfermo, y la segunda línea, con de nuevo el nDNA de la donadora y el mtDNA, esta vez, de un individuo sano. Al crecer estos dos tipos de células en las mismas condiciones, las posibles diferencias que se dieran serían debidas al mtDNA que portaban, ya que el nDNA era el mismo. Las diferencias que se observaron fueron que los híbridos construidos con las plaquetas de los enfermos de Alzheimer poseían una menor actividad del C IV que los sanos, además de un manejo de calcio alterado y una mayor producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) [13]. Y además también producían más β -amiloide [14].

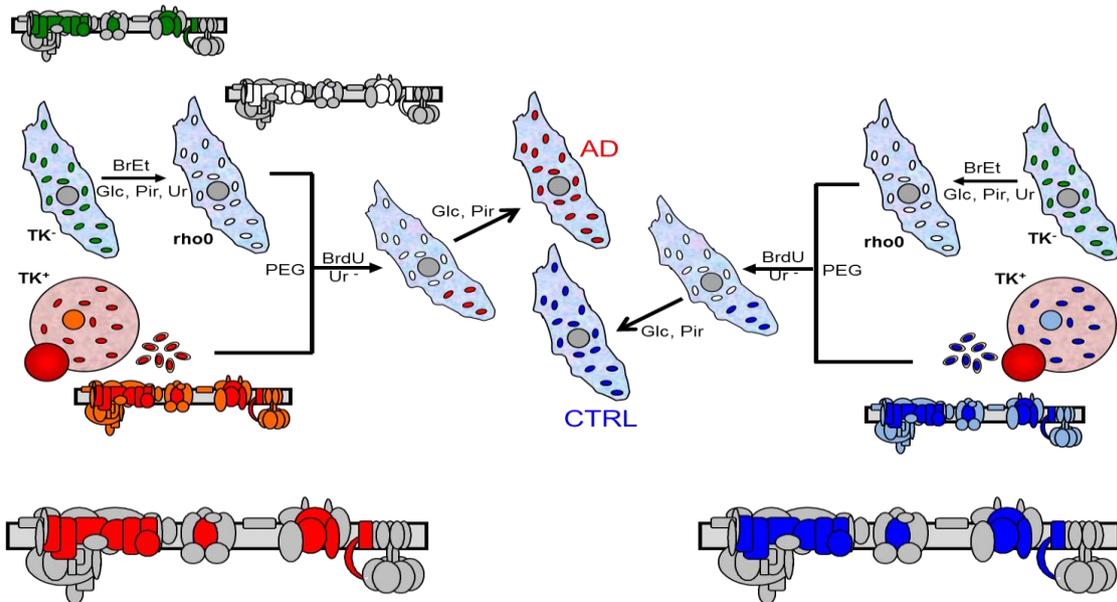


Figura 2. Tecnología de híbridos. Las células rho⁰ con las subunidades del sistema OXPHOS codificadas en el núcleo, aquí marcadas en gris. Estas células se fusionan con plaquetas de pacientes con AD y pacientes sanos. Las células resultantes tendrán un OXPHOS con subunidades codificadas en el núcleo de la célula receptora en gris y otras codificadas en la mitocondria donadora, en rojo los enfermos y azul los sanos.

-Si nos centramos en el DNA mitocondrial, existen estudios en los que se han demostrado que los pacientes con Alzheimer tienen más mutaciones en el mtDNA que los individuos sanos de su misma edad (importante ya que las mutaciones en el mtDNA se van acumulando a medida que envejecemos). Además estas mutaciones se localizan en posiciones importantes para el correcto funcionamiento del mtDNA [15]. Por lo tanto las neuronas de los enfermos de Alzheimer tienen menos mtDNA y en consecuencia expresan menos genes mitocondriales. Pero este exceso de mutaciones no solo se ha observado en el cerebro, sino que también se vio en los mtDNAs extraídos de suero o células sanguíneas de estos mismos pacientes [16].

-Estas mutaciones en el mtDNA se van acumulando a lo largo de la vida pero no se heredan a la generación siguiente. Aunque si hay un pequeño porcentaje de ellas que son inherentes a su haplogrupo mitocondrial. Los haplogrupos se formaron a lo largo de miles de años con el acúmulo de mutaciones en el mtDNA, dando lugar a diferentes líneas de evolución y grupos de mtDNA distintos (haplogrupos mitocondriales). Cuando se estudió la frecuencia de estos grupos en enfermos y sanos, se observó que alguno de los haplogrupos estaban sobrerrepresentados en los pacientes [17]. Lo cual indica que las mutaciones que definen a algunos haplogrupos mitocondriales incrementan el riesgo de padecer AD.

3. PAPEL DEL SISTEMA OXPPOS EN LA NEURITOGÉNESIS

3.1. Formación de la membrana celular

Los procesos mentales dependen de las redes neuronales, y éstas a su vez de las conexiones entre las neuronas. Las conexiones se realizan a través de las superficies neuronales que están formadas por las membranas plasmáticas.

El principal constituyente de las membranas celulares de mamíferos son los fosfátidos, de los cuales el más abundante es la fosfatidilcolina (PC). La biosíntesis de PC se inicia con la fosforilación de colina para formar fosfocolina, que a continuación, se combina con la citidina trifosfato (CTP) para formar 5' - citidina difosfato colina (CDP-colina). Este compuesto a continuación, reacciona con diacilglicerol (DAG) para producir PC (Figura 3).

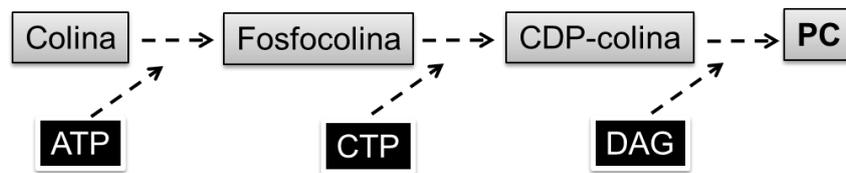


Figura 3. Síntesis de Fosfatidilcolina

La tasa a la cual las células sintetizan PC depende de la disponibilidad de sus precursores. Por lo tanto, la citidina aumenta los niveles de CTP, la disponibilidad de CTP, a su vez puede ser limitante de la síntesis de la CDP-colina y PC.

CTP puede ser sintetizado tanto a partir de la fosforilación de citidina como del nucleótido de uridina trifosfato (UTP). Los niveles intracelulares de UTP y citidina dependen de los de uridina libre ya que se sintetizan a partir de ésta [18].

Al tratar células con uridina se vio que los niveles intracelulares de CTP, UTP y CDP-colina aumentaban [19]. También se observó que el tratamiento con uridina extracelular aumentaba el crecimiento de neuritas y de sus ramificaciones en células diferenciadas y mostraban una mejora significativa en el número de neuritas al compararlas con células diferenciadas en ausencia de uridina.

Se advirtió que el tratamiento, en estas mismas células diferenciadas, con uridina mejoraba la expresión de los neurofilamentos 70 (70 kD) y M (145 kD) en comparación con células sin tratamiento. Estas proteínas de neurofilamentos forman parte de la composición de las neuritas, por lo que un aumento de éstas significaría un aumento en el número de neuritas [18].

Diferentes estudios han demostrado que el tratamiento de animales simultáneamente con precursores de fosfátido presentes en la sangre y de formación endógena (uridina y colina) o derivados de alimentos (colina y ácidos grasos omega-3), puede tener varios efectos: aumento de fosfátidos en el cerebro, proteínas sinápticas, crecimiento de neuritas, y formación de espinas dendríticas [20]. Este tratamiento también mejora la cognición y la liberación de algunos neurotransmisores del cerebro en los animales [21, 22].

Apoyando esta idea se realizó otro estudio en el que se trataba ratones modelos de la enfermedad de Alzheimer con PN401. Esta sustancia es un neuroprotector y se trata de un profármaco de uridina. En el estudio se vio una significativa mejoría en comparación con los ratones no tratados. Asimismo se determinó que la uridina (dependiendo de la dosis) protegía a las células de la hipoxia química, disminuía la formación de especies de oxígeno reactivo y de los daños en el mtDNA debidos al peróxido de hidrógeno [23].

Por otra parte, la administración de los precursores fosfatídicos (junto con nutrientes adicionales de apoyo) mejora significativamente la cognición en un período inicial en los pacientes con AD leve [24].

3.2. Uridina y la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH)

La uridina es una pirimidina. Las pirimidinas tienen dos vías a través de las cuales se sintetizan: la vía de síntesis de novo y la vía de recuperación. La enzima DHODH (dihidroorotato deshidrogenasa) cataliza el cuarto paso en la biosíntesis de novo. Esta enzima convierte el dihidroorotato (DHO) en orotato, este se convierte en uridina monofosfato (UMP) y este a su vez en uridina trifosfato (UTP).

La DHODH es la única enzima en esta ruta de biosíntesis de pirimidina que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria. El resto de enzimas se encuentran en el citosol. DHODH cataliza la oxidación de DHO en orotato mediante la transferencia de electrones a la ubiquinona, molécula de la cadena respiratoria. Por lo tanto DHODH se apoya en la ubiquinona, formando de este modo un enlace funcional entre la cadena respiratoria mitocondrial y la biosíntesis de pirimidina (Figura 4).

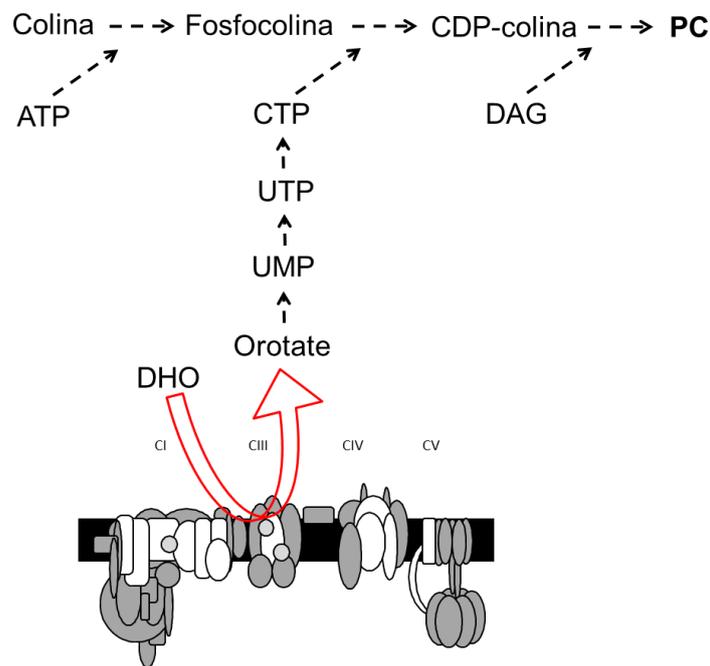


Figura 4. Relación entre la enzima DHODH y el sistema OXPHOS e implicación de ambos elementos en la síntesis de fosfatidilcolina.

La inhibición del C III produce una inhibición de la enzima DHODH, y esto provocó una disminución en la producción de pirimidinas [25, 26].

Esta conexión entre la enzima DHODH y el sistema OXPHOS suscitó la posibilidad de que el déficit observado en el C IV pudiera disminuir el flujo electrónico de la cadena respiratoria y con ello el correcto funcionamiento de la DHODH, con lo que se vería afectado la síntesis de orotato, UTP y CTP, afectando así la producción de la fosfocolina y demás componentes de la membrana celular que forman parte de las dendritas de una neurona.

II. OBJETIVOS

La AD es una enfermedad mental en la que, entre otros muchos signos, se produce un fallo en las conexiones neuronales (sobre todo de neuronas colinérgicas). Nuestra **hipótesis** sería que esta carencia podría ser consecuencia de una falta de síntesis de membrana plasmática debido a una deficiencia en el sistema OXPHOS de la mitocondria que resultaría en la ausencia de pirimidinas en el medio, imprescindibles para una correcta neuritogénesis.

Los objetivos propuestos para este trabajo fin de máster para comprobar nuestra hipótesis serían:

- Cultivo y diferenciación a neuronas colinérgicas de líneas celulares tumorales humanas.
 - Línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y
 - Línea celular de teratocarcinoma NT2
- Estudio del efecto de la inhibición del C III y C IV de la cadena respiratoria sobre los niveles de DHO, orotato y nucleótidos de pirimidina.
- Análisis del papel del sistema OXPHOS sobre el número y longitud de neuritas de las neuronas colinérgicas y sobre los niveles de proteínas del citoesqueleto que contribuyen a la producción de estas neuritas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron dos líneas celulares diferentes. Por un lado se trabajó con células de neuroblastoma SH-SY5Y, y por el otro con la línea celular de teratocarcinoma NT2.

2. MEDIOS DE CULTIVO

- Suero fetal bovino (FBS) (GIBCO) 500 ml
- Suero dializado (GIBCO) 500ml
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium: High glucose (25mM) (SIGMA) 500 ml
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Low glucose (5 mM) (SIGMA) 500 ml

3. CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

El cultivo celular se realizó en placas de 150 y 100 cm², y en placas de 12 y 6 pocillos (TPP). El material de vidrio se esterilizó previamente en un autoclave (Raypa®) y las disoluciones agregadas al cultivo fueron filtradas con filtros de 0,22 µm (TPP). Las manipulaciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar vertical (Holten LaminiAir HB 2448) y bajo condiciones estériles.

El medio se cambió cada 2-3 días y las células se cultivaron en un incubador a 37°C y con un 5% de CO₂ (modelo DHD AutoFlow Incubator de Nuair).

Ambas líneas celulares, tanto en mantenimiento como en proceso de diferenciación, fueron cultivadas en ausencia de antibióticos.

4. REACTIVOS

- Ácido Retinoico (RA) (Sigma)
- Colesterol (Sigma)
- Uridina (Sigma)
- Fluoro-deoxyuridine (Sigma)
- Cytosine arabinoside (Sigma)
- Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF) (Invitrogen)
- Azida Sódica (NaN_3) (Sigma)

5. PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO CELULAR

Tanto para las células SH-SY5Y como para las NT2 lo primero que se hizo fue crear un pool de células para poder trabajar con ellas a lo largo del proyecto.

Las células se cultivaban en medio rico en glucosa suplementado con 10% de FBS. Cuando las células llegaban a un 80% de confluencia se doblaban. Para ello se tripsinizaban, añadiendo 2 mL de tripsina al 0,25% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 0,53 mM. Tras la tripsinización se le adicionaba una cantidad de medio mayor (4 mL) a la añadida de tripsina, se recogían, centrifugaban 5 min a 1400 rpm (Beckman Coulter Allegra™ X – 22, rotor S x 4250) y resuspendían en el medio requerido para su distribución en varias placas.

En el caso de la congelación el pellet celular se resuspendió en medio suplementado con un 20% de FBS y un 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma).

6. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LA LÍNEA SH-SY5Y

-Diferenciación neuronal

Para obtener una diferenciación neuronal general las células se sembraron en placas de 100 cm² a una cantidad de aproximadamente 250.000 células por placa. Se trataron con medio DMEM (de alta y baja glucosa) con 10% de FBS o 10% de Suero Dializado y ácido retinoico 10 µM durante una semana.

-Células SH-SY5Y con Uridina y Azida Sódica

Tras haber conseguido la diferenciación neuronal de las SH-SY5Y, éstas fueron sometidas a diferentes tratamientos con uridina y/o azida sódica (Sigma).

Las células se cultivaron durante una semana con diferentes tratamientos:

- 200 μ M Uridina
- 1 μ M Azida Sódica
- 5 μ M Azida Sódica
- 10 μ M Azida Sódica
- 200 μ M Uridina y 1 μ M Azida Sódica
- 200 μ M Uridina y 5 μ M Azida Sódica
- 200 μ M Uridina y 10 μ M Azida Sódica

-Diferenciación a neurona colinérgica

Las células se sembraron en placas de 100 cm^2 con una densidad de 250.000 células por placa. Para la diferenciación se siguió un protocolo previamente descrito [27]. Las células se trataron con RA a una concentración de 10 μ M durante una semana. Posteriormente se levantaron con tripsina para ser sembradas de nuevo pero esta vez en placas con matrigel. Estas placas deben ser preparadas con anterioridad, tanto el gel, ECMgel (Sigma), como todo el material empleado (falcons, puntas, pipetas y placas) debe estar a una temperatura de aproximadamente 4°C. Tras la elaboración del gel, se dejó que alcanzara paulatinamente una temperatura de 37°C y una vez llegada a ella se sembraron las células. Sobre las placas con matrigel las células se cultivaron durante otra semana más con un medio que contenía, además del RA a 10 μ M, colesterol a una concentración de 10 μ g/ml (Sigma).

7. DIFERENCIACIÓN CELULAR DE LA LÍNEA NT2

Para la diferenciación de las NT2 de nuevo se usó un protocolo ya existente en el que se buscaba una diferenciación a neurona de tipo colinérgica [28]. Las células se sembraron en placas de 150 cm² con una densidad de 400.000 células por placa. Se cultivaron con medio de glucosa alta suplementado con FBS al 10% y RA 10 µM durante un mes. Cumplido el mes se realizó una tripsinización selectiva y las células se sembraron en placas de 100 cm² con poly-D-lysina (Becton Dickinson) en una concentración de entre 1 y 2 millones de células por placa. Tras la siembra en poly-D-lysina, las células fueron cultivadas durante una semana con medio de alta glucosa y 10% FBS al que se le añadió los inhibidores mitóticos uridina (10 µM), cytosine-arabioside (1 µM) y fluoro-deoxyuridine (10 µM), además del factor CNTF (20 ng/ml).

8. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR EN PRESENCIA DE AZIDA SÓDICA

Para ver el efecto de la droga sobre la viabilidad celular, cultivamos a lo largo de 5 días la línea celular SH-SY5Y con azida sódica (NaN₃). Se siembran 10.000 células por pocillo en varias placas de 12 pocillos con diferentes concentraciones de NaN₃ (1 µM, 5 µM y 10 µM), además de unos pocillos de control sin la droga.

Cada 24 horas se recoge una placa. A las células recogidas (tratamiento con trypLE™ Express, gibco® Life Technologies) se les realiza un contaje (Contess™ automated cell counter de Invitrogen™) y con los datos recogidos a lo largo de toda la semana se realiza la curva de viabilidad.

9. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras la diferenciación, se tripsinizaron y recogieron las células. Se lavaron con PBS y fijaron con formaldehído al 4% durante 15 minutos a 4°C. Una vez fijadas se volvieron a lavar con tampón fosfato salino (PBS) y se centrifugaron 5 minutos a 4500 rpm (centrifuga Eppendorf modelo 5415R, rotor F45-24-11). El pellet celular se resuspendió en 100 µL de saponina al 0,1%, BSA al 5% y el anticuerpo primario y se dejó incubar a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios empleados fueron anti-beta-III-tubulina, anti-transportador vesicular de acetilcolina (VChT) y anti-tirosina hidroxilasa (TH) (Tabla 1). Después de la incubación se lavó con PBS y se centrifugó (5 min a 4500 rpm). Se añadió el anticuerpo secundario de igual modo que el primario, con 100 µL de saponina al 0,1% y BSA al 5%. En este caso la incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras la incubación las muestras fueron de nuevo lavadas con PBS, centrifugadas (5 min a 4500 rpm) y resuspendidas en PBS para analizarlas. El anticuerpo secundario que se utilizó fue Alexa fluor 488 (Tabla 1) que se excita a 488 nm y emite a 530 nm por lo que el canal que se empleó fue el canal FL1 del citómetro.

Anticuerpo	Tipo	Características	Dilución	Proveedor
Anti-Beta-III-Tubulina	Ac. 1°	Policlonal conejo	1µg/ml	Abcam
Anti-Transportador vesicular de acetilcolina (VChT)	Ac. 1°	Policlonal conejo	1:100	Abcam
Anti-Tirosina Hidroxilasa (TH)	Ac. 1°	Policlonal conejo	1:200	Sigma
Alexa Fluor 488	Ac. 2°	Policlonal cabra	1:1000	Sigma

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en citometría de flujo

10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

-Extracción de proteínas totales de células en cultivo

Tras someter las células a diferentes tratamientos, se tripsinizaron y recogieron. Las muestras se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos (Beckman Coulter Allegra™ X – 22, rotor S x 4250). El pellet celular obtenido se lavó con 1 ml de PBS y se volvió a centrifugar. El nuevo pellet se resuspendió en tampón de lisis RIPA: 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 0,5% deoxicolato de sodio, 5 mM EDTA y 1% de Tritón X-100. Para favorecer la acción del detergente en la rotura de las membranas celulares se incubaron en una noria giratoria 15 minutos a 4°C y para eliminar los restos celulares se centrifugaron también a 4°C, a 13000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante que quedó se congeló a -80°C hasta su uso.

-Cuantificación de proteínas por espectrofotometría. Método de Bradford

La cuantificación de proteínas es una etapa previa a la carga de las mismas en gel. Con ella obtenemos la cantidad de proteínas totales presentes en un homogenado celular. Cuantificamos las proteínas presentes en la muestra por un método colorimétrico basado en la realización de una recta patrón con una concentración de proteína conocida. Se utilizó la albúmina sérica bovina (BSA) y se trabajó con una absorbancia de 595 nm (Figura 5).

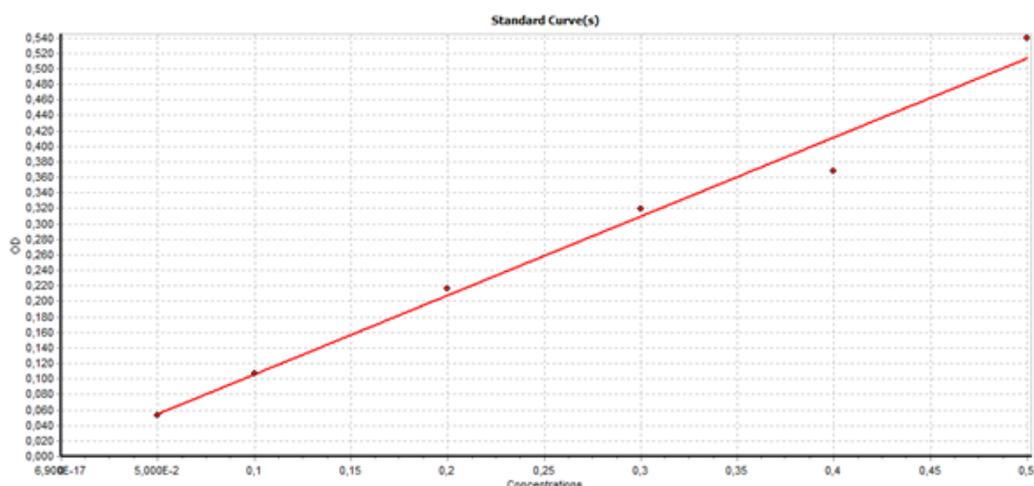


Figura 5. Representación gráfica de una determinación de proteínas por el método de Bradford. Recta de calibrado: concentraciones de BSA frente a absorbancia a 595 nm.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de la recta de calibrado con BSA se partió de una concentración de 1 mg/ml, y a partir de ella se realizaron con agua destilada diferentes diluciones con concentraciones conocidas (Tabla 2).

Concentración BSA (mg/ml)	Agua (μL)	BSA (μL)
Blanco	100	0
0,05	95	5
0,1	90	10
0,2	80	20
0,3	70	30
0,4	60	40
0,5	50	50

Tabla 2. Diluciones de BSA para la recta de calibrado del método de Bradford

El reactivo de Bradford se diluye 1:5 en agua destilada y se conservó a temperatura ambiente en ausencia de luz. En una placa de 96 pocillos se depositaron por triplicado 10 μL tanto de las diferentes concentraciones de BSA como de las muestras y se les añadieron 200 μL del reactivo de Bradford. Tras la medición se usó la recta patrón obtenida para interpolar los valores de absorbancia de las muestras.

-Preparado de las muestras para la carga en el gel

Una vez conocida la concentración de las muestras se prepararon para la carga en el gel. Se calculó la cantidad de proteína a cargar en cada pocillo. Todas las manipulaciones a las que se le sometieron fueron en hielo para evitar así que las proteasas actuaran.

El tampón de carga empleado tenía una concentración 4x y una composición de: 20% glicerol, 0,16 M Tris-HCl pH 6,8, 20 mM EDTA, 4% azul de bromofenol, 4% mercaptoetanol (todos de Sigma) y 8% SDS (Merck).

Previamente a la carga de las muestras, estas se calentaron a 100°C en baño seco durante 5 minutos.

-Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La separación electroforética de las proteínas se realizó mediante geles de poliacrilamida que permiten separar las proteínas en función de su peso molecular. Para ello se realizaron dos versiones, una siguiendo el método Laemmli o SDS-tris-glicina, y otra empleando geles comerciales BIO-RAD Mini-PROTEAN® TGX™ Gels.

Los geles SDS-tris-glicina están compuestos por dos fases con composiciones diferentes (Tabla 3). La fase superior denominada fase de concentración o stacking contiene una cantidad de poliacrilamida del 5%, mientras que la fase inferior, fase de resolución o running, tiene una composición del 10% de acrilamida-bisacrilamida.

Componentes	Running (10%)	Stacking
Acrilamida	1,7 ml	330 µL
Tampon separador 4%	1,25 ml	500 µL
SDS 25%	20 µL	10 µL
Agua	2 ml	1,160 ml
10% persulfato amónico (APS)	30 µL	20 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Tabla 3. Composición de las dos fases que componen el gel SDS-tris-glicina

En primer lugar se añade la fase de resolución ocupando las $\frac{3}{4}$ partes del gel, cuando ésta solidificó se añade la fase de concentración y el peine para crear los pocillos de carga.

Una vez polimerizado el gel se quitó el peine y se cargaron las muestras. La electroforesis se realizó con tampón de electroforesis (0,125 M Tris-HCl, 0,96 M Glicina y 0,01% SDS pH 8,3) y a un amperaje de 100 V constante hasta que las muestras alcanzaron la parte inferior del gel.

-Transferencia a membrana PVDF

La transferencia de proteínas a membranas PVDF se realizó en el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ usando el programa HIGH MW para proteínas mayores de 150 kD.

-Análisis de proteínas por inmunotransferencia. Western-Blot

Tras obtener la membrana se le realizó un bloqueo con PBS con un 5% de leche desnatada en polvo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después se hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween (0,12 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% Tween 20 en PBS pH 7,4) para eliminar los restos de la solución de bloqueo.

Una vez lavada se le añadió el anticuerpo primario, este iba diluido en una solución de PBS-T con un 1% de leche en polvo. Se dejó la membrana en la cámara fría a 4°C toda la noche. Tras la incubación se realizaron de nuevo 3 lavados de 10 minutos con PBS-T para eliminar completamente el anticuerpo primario y se incubó de nuevo, esta vez con el anticuerpo secundario en una solución de PBS-T con un 0,1% de leche. Esta incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente en agitación continua durante 1 hora.

Terminada la incubación se lavó de nuevo la membrana, esta vez 2 lavados de PBS-T y el último con PBS.

Los anticuerpos primarios empleados fueron el anti-Neurofilamento M y la beta-actina para normalizar. En cuanto a los secundarios se usaron tanto de conejo como de ratón y ambos en verde (800) y rojo (680) (Tabla 4).

Anticuerpo	Tipo	Características	Dilución	Proveedor
Anti-Neurofilamento M	Ac 1°	Conejo	1:500	Millipore
Anti - β - actina	Ac 1°	Ratón	1:5000 – 1:10000	Sigma
Anti- conejoIgGDyLight™ 800	Ac 2°	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti- conejoIgGDyLight™ 680	Ac 2°	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti- ratónIgGyLigt™ 800	Ac 2°	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti- ratónIgGyLigt™ 680	Ac 2°	Cabra	1:15000	Thermo Scientific

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunotransferencia

Por último se escanearon y procesaron las membranas usando el sistema de imágenes Odyssey® que utiliza dos canales de fluorescentes infrarrojos (700 y 800 nm) para la detección y análisis simultáneo de proteínas.

11. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La detección de proteínas por inmunohistoquímica se realizaron en placas de 100 cm² y multiplacas donde las células se sembraron a una concentración baja para evitar la confluencia. Se lavaron las células con PBS y se fijaron con PBS al 4% de formaldehído a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se permeabilizó con PBS con tritón X-100 al 0,1 % y se bloquearon con PBS al 0,1 % de BSA durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para la marcación de las proteínas, las células se incubaron con el anticuerpo primario en la cámara fría toda la noche. Después se lavaron y se incubaron de nuevo con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente 30 minutos (Tabla 5). Por último se le añadió un marcador para ver el núcleo de las células (DAPI, Life Technologies), se cargó a una concentración 1 μ M y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células se observaron a través de la estación de imágenes Fluid™.

Anticuerpo	Tipo	Características	Dilución	Proveedor
Anti-Beta-III-Tubulina	Ac. 1°	Policlonal conejo	1 μ g/ml	Abcam
Anti-Transportador vesicular de acetilcolina (VChAT)	Ac 1°	Policlonal conejo	1:100	Abcam
Anti-Tirosina Hidroxilasa (TH)	Ac 1°	Policlonal conejo	1:100	Sigma
Alexa Fluor 488	Ac 2°	Policlonal cabra	1:1000 1:400	Sigma
Alexa Fluor 488	Ac 2°	Policlonal cabra	1:1000	Sigma

Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en microscopía de fluorescencia

12. DETERMINACIÓN DE OROTATO, DIHIDROOROTATO (DHO), UMP, UDP y UTP DE FIBROBLASTOS

Javier Torres Torronteras y Ramón Martí Seves, de la Unidad de Patología Mitocondrial y Neuromuscular del Hospital Universitario Vall d'Hebron, llevaron a cabo esta técnica en colaboración con este proyecto.

Se procede a la extracción de orotato, DHO, UMP, UDP y UTP, de fibroblastos de 4 controles sanos y 2 pacientes con encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE) en cámara fría.

-Se parte de cultivos confluyentes en placas de 10 cm.

-Se elimina el medio de cultivo y se hace un lavado con PBS frío. Se añaden 200 µl de agua milliQ fría y se levantan las células con un scraper.

-Se recupera la suspensión celular y se homogenizan mediante 10 jeringazos enérgicos a través de una aguja de 23Gx1" (0.6x25 mm) con una jeringa de 1 ml.

-El homogenado se ultrafiltra por centrifugación (14000xg durante 30 minutos a 4°C) a través de filtros de 10 kDa.

-El filtrado se congela a -20°C hasta su análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UPLC) acoplado a espectrometría de masas (MS) en tándem (LC-MS/MS)

-Separación cromatográfica

Equipo: UPLC (Waters)

Columna: Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm (tamaño de la columna 2,1 x 100mm) (Waters). Se usa un formador de par iónico (dimetil-hexil-amina, DMHA), que permite retener los compuestos iónicos.

Volumen de inyección: 5 µl

-Método de separación:

-Por gradiente a un flujo de 0.4 ml/min. Se usa como solvente A (orgánico): DMHA 5mM + acetonitrilo 50% (v/v); solvente B (acuoso): DMHA 5mM ajustdo a pH 7 con ácido fórmico.

-El método de separación empieza con 100% de B. De 0 a 4,7 min pasa de 100% a 20% de B (de 0% a 80% de A. De 4,7 a 4,8 min pasa de 20% a 100% de B. De 4,8 a 6,1 min (fin) isocrático con 100% de B.

-Método de detección

Espectrometría de masas en tándem

Equipo: Acquity UPLC-Xevo™ TQ Mass Spectrometer (Waters)

Método de detección: Multiple Reaction Monitoring con electrospray negativo. Las condiciones de ionización para cada componente son las siguientes (Tabla 6):

Compuesto	m/z ión padre	m/z ión hijo	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)
Ác. orótico	154,48	41,97	14	20
DHO	156,55	113,02	20	10
UMP	322,78	96,95	26	18
UDP	402,71	158,9	28	30
UTP	482,71	158,91	34	32

Tabla 6. Condiciones de ionización

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE LA LÍNEA SH-SY5Y

-Diferenciación a fenotipo morfológico neuronal

Para realizar los experimentos de este proyecto necesitamos trabajar con células diferenciadas a neuronas. La principal característica que distingue las células sin diferenciar de las neuronas consiste en la producción de neuritas. Se considera neurita cualquier expansión del soma de una neurona, ya sea una dendrita o un axón (Figura 6).

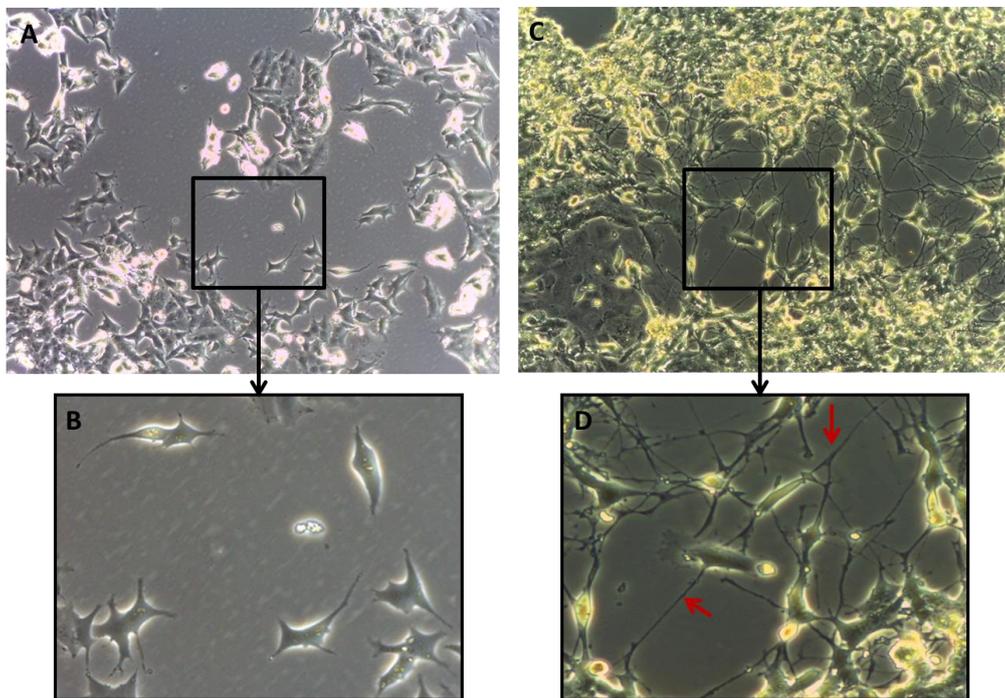


Figura 6. A y B. Células indiferenciadas si la formación de neuritas. C y D. Células diferenciadas a neuronas con la formación de neuritas (señalas con las flechas rojas).

Para obtener una diferenciación neuronal las células se trataron tan solo con RA a una concentración de 10 μ M.

Se estudió también si la cantidad de glucosa o de uridina en el medio influía a la hora de obtener una diferenciación morfológica. En el caso de la glucosa, las células se cultivaron con dos medios diferentes: de alta y de baja concentración de glucosa (25 y 5 mM). Y para la uridina, el medio se suplemento con un 10% de FBS (que contiene uridina) o suero dializado (sin uridina).

Con los cuatro tipos de tratamiento se observa que las células obtenían un fenotipo neuronal, es decir, mostraban neuritas (Figura 7).

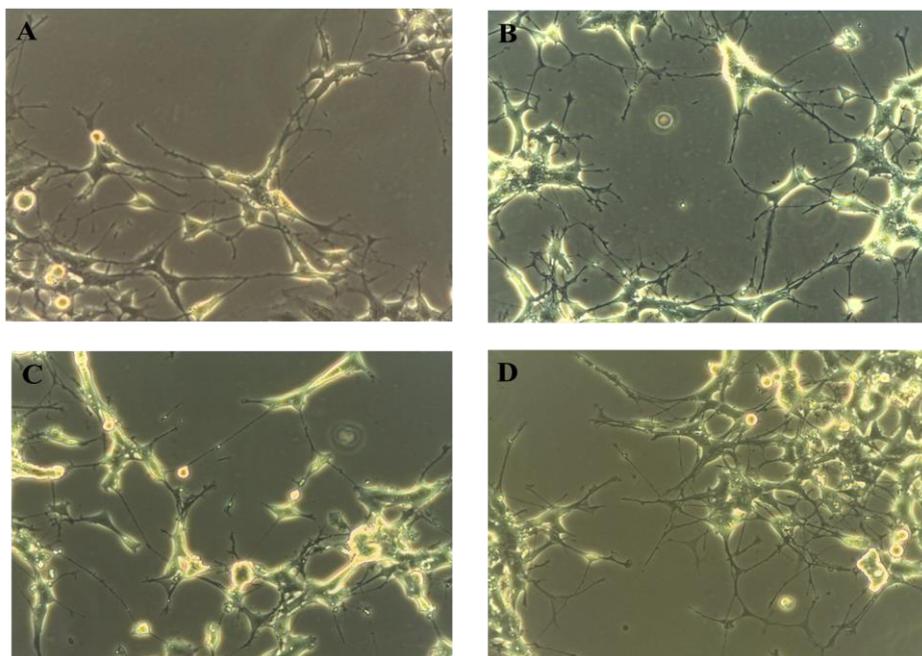


Figura 7. Células tratadas con RA. A. Células en medio con glucosa 5 mM y FBS. B. Células en medio con glucosa 5 mM y suero dializado. C. Celulas en medio con glucosa 25 mM y FBS. D. Células en medio con glucosa 25 mM y suero dializado.

Las células, a una concentración fisiológica de glucosa (5 mM) pueden usar la vía de novo de síntesis de pirimidinas y formar neuritas durante la diferenciación a neurona.

-Viabilidad neuronal

Una vez diferenciadas en las cuatro condiciones, las células se mantuvieron en cultivo durante una semana para ver durante cuánto tiempo permanecían diferenciadas. Con el tiempo en cultivo, las células van perdiendo progresivamente su morfología neuronal produciéndose el acortamiento y desaparición de neuritas.

Las células se mantienen bien diferenciadas hasta los 5 días. Después, las neuritas van disminuyendo hasta que en el día 10 post-diferenciación a pesar de que sigue habiendo células diferenciadas la mayor parte de las células se han despegado y perdido en los cambios de medio (Figura 8).

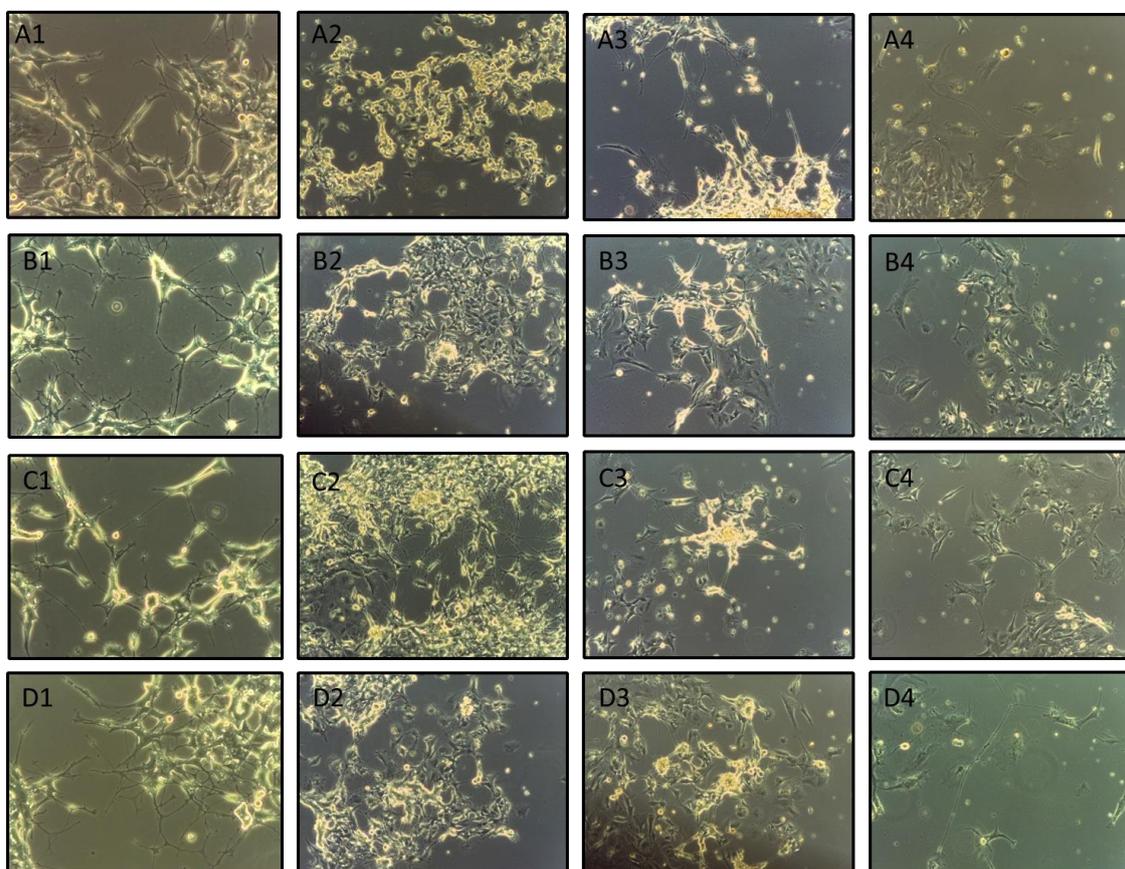


Figura 8. Viabilidad neuronal. A. Células en medio 5 mM de glucosa y FBS a los 2 días (A1), 5 días (A2), 7 días (A3) y 11 días (A4). B. Células en medio 5 mM de glucosa y suero dializado. C. Células en medio 25 mM de glucosa y FBS. D. Células en medio 25 mM y suero dializado.

Tras estos dos análisis deducimos que el uso de medio de baja glucosa y con suero dializado no supone un impedimento para la diferenciación neuronal, por lo que para el resto de pruebas donde sea necesaria la utilización de células con morfología neuronal utilizamos este tipo de medio. Ya que de esta manera no le administramos glucosa en exceso y la concentración se acerca más a la fisiológica (4 – 8 mM). En el caso de la uridina, al no añadirla al medio, provocamos que la única vía de obtención de pirimidinas necesarias para la formación de la membrana celular sea por la síntesis de novo.

2. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE NEURITAS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE URIDINA

Para estudiar con más exactitud si la presencia o ausencia de uridina tenía repercusión a la hora de la síntesis de neuritas fue necesaria la utilización de un marcador. Se empleó como tal la proteína del Neurofilamento M ya que forma parte del citoesqueleto y su cantidad esta correlacionada con la cantidad de neuritas sintetizadas [18].

Diferenciamos células a neurona creciéndolas con suero dializado o suero dializado con uridina (10 μ M) (figura 9).

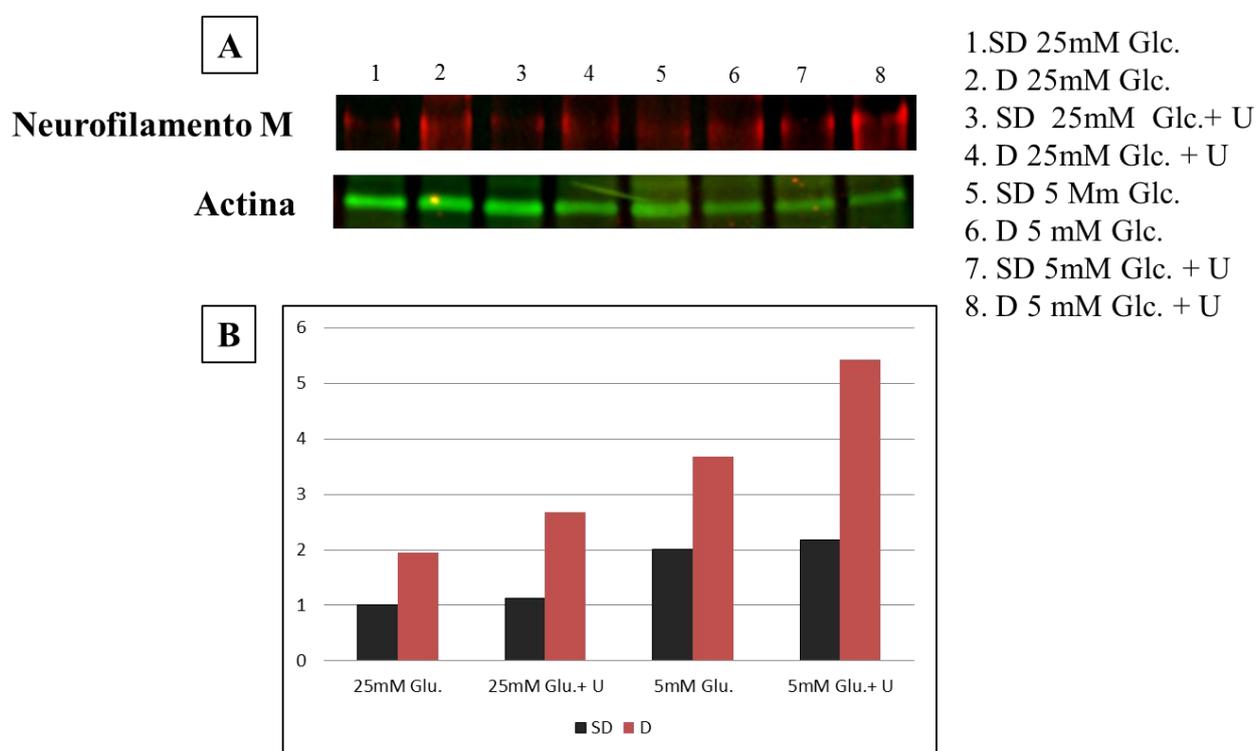


Figura 9. Expresión del Neurofilamento M y la β - actina. A. Western blot. B. Intensidad de las bandas de Neurofilamento M normalizadas con la β - actina.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la figura 9, comprobamos que la diferenciación celular va acompañada de un aumento del Neurofilamento M, ya que las células diferenciadas tienen más membrana plasmática, y por lo tanto más Neurofilamento M.

Además, se puede apreciar como existe un aumento en la producción de Neurofilamento M en las células diferenciadas a las que se les añade una dosis de uridina. Esto indica que la administración de uridina mejora la producción de neuritas, lo que en consecuencia provoca una mejora de las conexiones neuronales. De esta manera se podría explicar el porqué del efecto positivo de los tratamientos con uridina y derivados en pacientes con Alzheimer.

Por último, también se observa que cultivar las células con diferente concentración de glucosa en el medio afecta a la diferenciación. Las células con medio 5 mM de Glucosa se diferencian más que las células con 25 mM de Glucosa.

3. ANÁLISIS DE LA FORMACIÓN DE NEURITAS EN PRESENCIA O AUSENCIA DE URIDINA Y/O AZIDA SÓDICA

La síntesis de los fosfátidos de las neuritas depende de la presencia de uridina. Al no haber uridina en el medio las células tienen que sintetizarla de novo lo cual implica a la DHODH y el sistema OXPHOS. Para observar las consecuencias ante un fallo en esta conexión tratamos las células diferenciadas con azida sódica, un inhibidor del C IV.

-Viabilidad celular en presencia de azida sódica

Antes de realizar el tratamiento con azida sódica a las células, debemos asegurarnos que las dosis escogidas no son letales para éstas ya que en ese caso los cambios en la cantidad de Neurofilamento M que queremos estudiar se deberían a las muertes producidas. Para asegurarnos de ello realizamos una curva de viabilidad con las diferentes concentraciones de NaN_3 utilizadas (1 μM , 5 μM y 10 μM).

Realizando un conteo celular a lo largo de 6 días, observamos que la población celular va aumentando día a día con cualquiera de las tres concentraciones (Figura 10). Lo cual indica las dosis escogidas no son letales para las células.

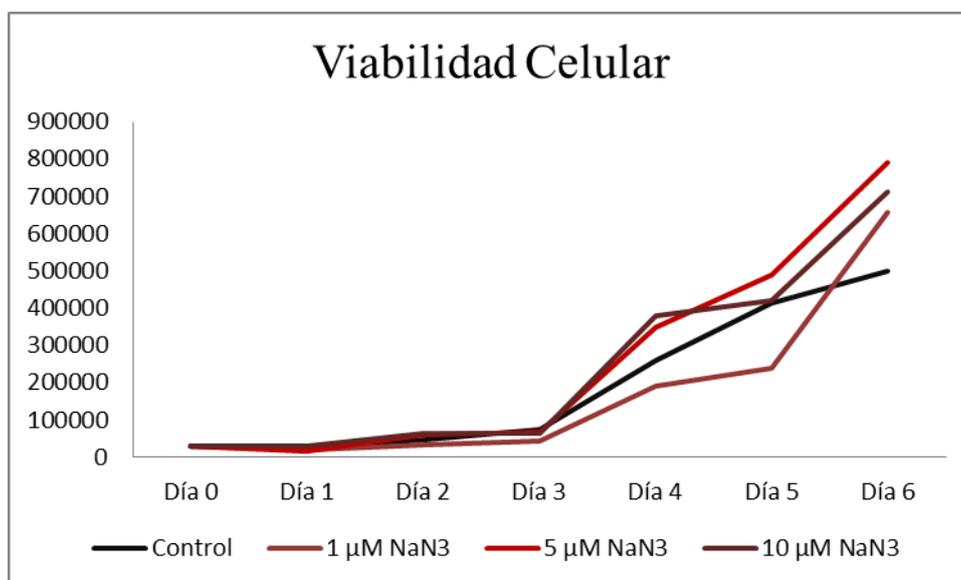


Figura 10. Curva de viabilidad de las células SH-SY5Y con concentraciones 1 μM , 5 μM y 10 μM de NaN_3 .

Cultivamos las células diferenciadas con las tres concentraciones distintas de NaN_3 , 1 μM , 5 μM y 10 μM , y una segunda tanda con el mismo tratamiento más una dosis de uridina.

Al realizar el Western-Blot (Figura 11) observamos como las células diferenciadas cultivadas con NaN_3 tienen menos concentración de Neurofilamento M que las diferenciadas sin NaN_3 , es decir, menos neuritas. Esto podría explicarse debido a que la cadena respiratoria hubiera sido inhibida (por la inhibición del C IV), lo que provocaría que el flujo de electrones a través del sistema OXPHOS se detuviera y por lo tanto la DHODH no podría funcionar dejando de producirse uridina y en consecuencia los fosfátidos de las neuritas.

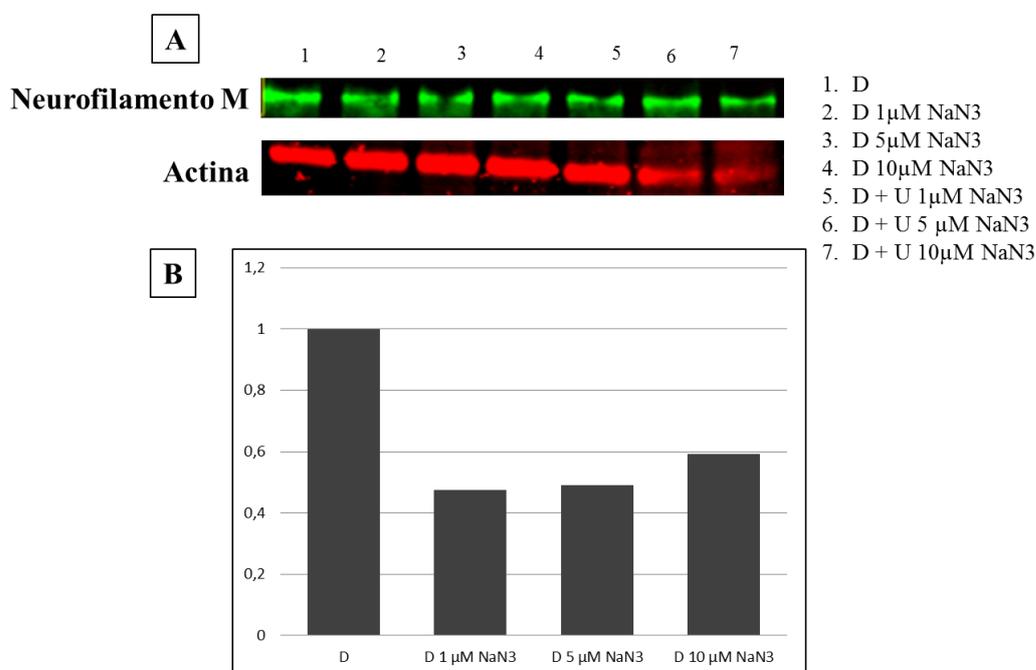


Figura 11. Expresión del Neurofilamento M y la β - actina. A. Western blot. B. Intensidad de las bandas de Neurofilamento M normalizadas con la β – actina: Células cultivadas sin y con NaN_3 .

De nuevo, también se puede apreciar un aumento en la producción de Neurofilamento M en las células diferenciadas tratadas uridina (Figura 12).

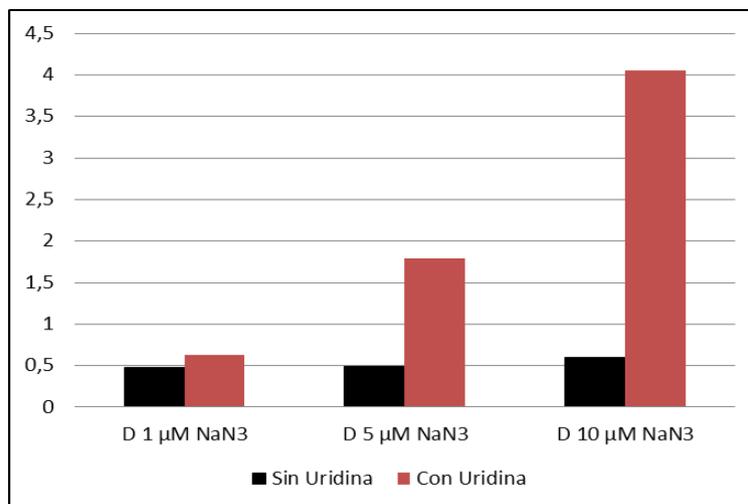


Figura 12. Expresión del Neurofilamento M y la β - actina. Intensidad de las bandas de Neurofilamento M normalizadas con la β – actina: Células cultivadas con NaN₃ y con y sin uridina.

Al realizar esta prueba, observamos que entre las tres concentraciones de azida no hay diferencias en la producción de Neurofilamento M. Lo que si se aprecia es que cuanto mayor es la concentración de azida sódica utilizada, aumenta más la síntesis de Neurofilamento M en las células con uridina, es decir, mayor es la mejoría obtenida del tratamiento con uridina.

4. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA SH-SY5Y A NEURONA COLINÉRGICA

La AD, como hemos dicho anteriormente, se trata de una enfermedad donde el primer grupo de neuronas afectadas son las neuronas del sistema colinérgico, por lo que resultaría de gran interés poder realizar todos estos estudios con ellas. Por ello, intentamos poner a punto un protocolo de diferenciación neuronal hacia tipo colinérgico.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se diferenció en un protocolo de dos fases. Primero se cultivaron con RA durante una semana, y después se continuó el tratamiento en placas con ECMgel, donde se les administró RA y colesterol.

-Análisis de la morfología neuronal

Con este protocolo desde la primera semana las células mostraron la morfología neuronal mostrando gran cantidad de neuritas (Figura 13).

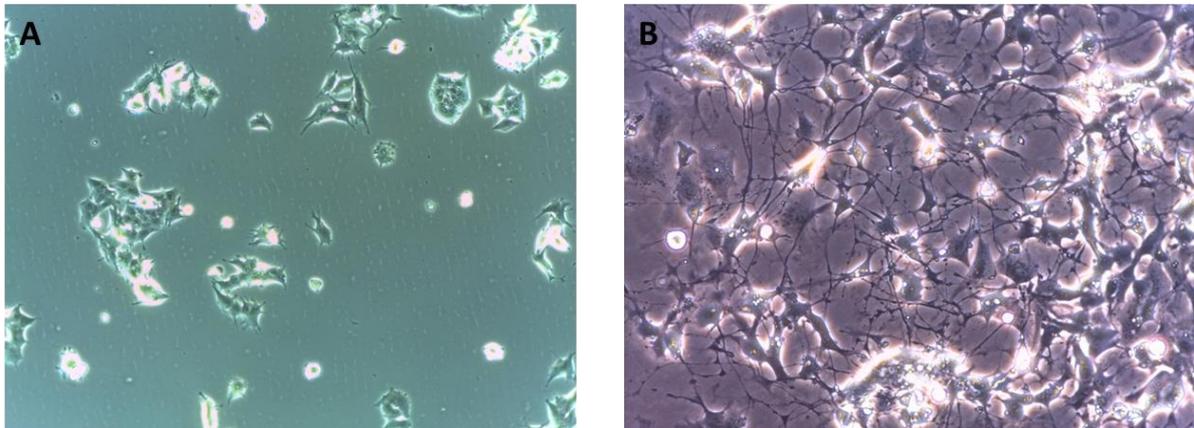


Figura 13. A. Células SH-SY5Y sin diferenciar. B. Células SH-SY5Y diferenciadas

-Análisis de marcadores neuronales

Los cambios morfológicos por si solos no constituyen un indicador de la diferenciación hacia un fenotipo neuronal, por lo que fue necesario utilizar marcadores celulares. En primer lugar usamos la β – III – Tubulina que es un marcador que se ve aumentado en todas las células con diferenciación neuronal.

Realizamos el marcaje para citometría y microscopía de fluorescencia. En la citometría se vio un gran aumento de la fluorescencia en relación con las células sin diferenciar, lo cual indica una diferenciación celular a neurona (Figura 14).

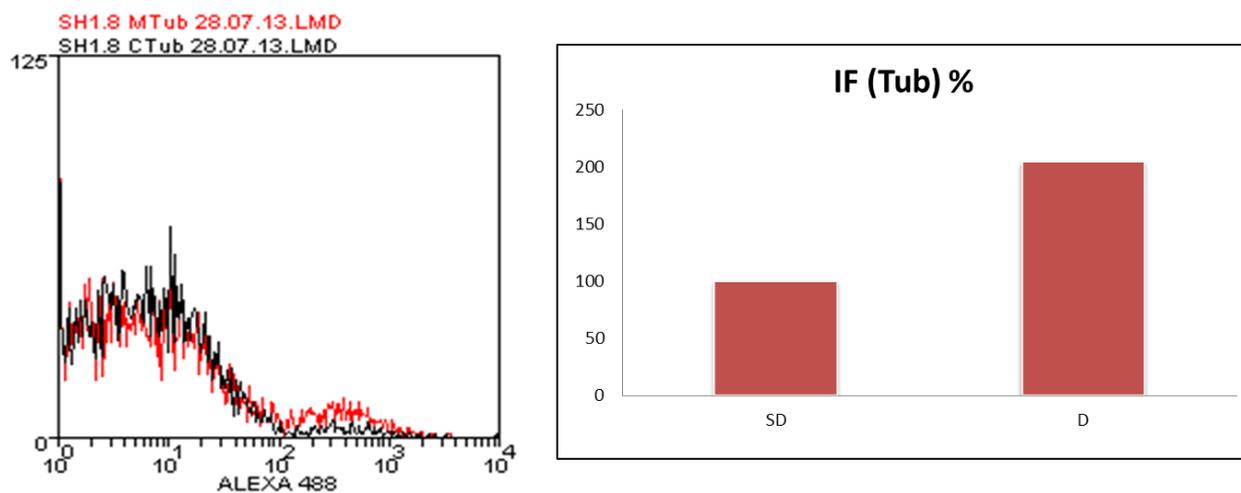


Figura 14. Expresión de la β – III – Tubulina en células sin diferenciar (SD) y células diferenciadas (D) en citometría de flujo.

Además al observar las células diferenciadas al microscopio de fluorescencia éstas expresaban la β – III – Tubulina (Figura 15), hecho que apoya los resultados del citómetro.

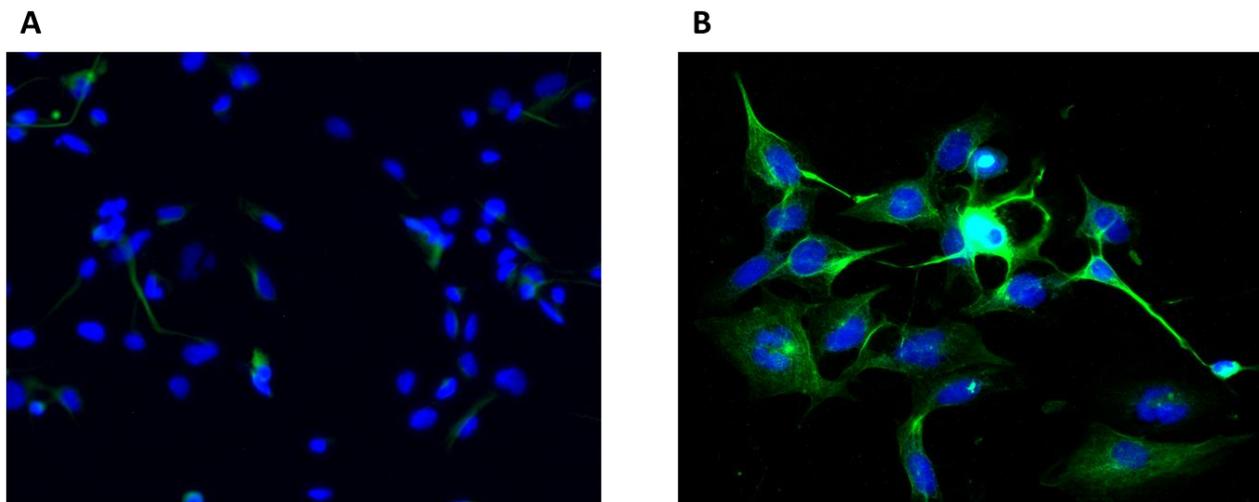


Figura 15. Expresión de la β – III – Tubulina (en verde) en células sin diferenciar (A) y células diferenciadas (B) por microscopía de fluorescencia.

-Análisis de marcadores colinérgicos

Una vez determinado que se trataba de una célula neuronal, estudiamos si realmente se había diferenciado hacia el tipo colinérgico. Para ello marcamos las células con el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Esta molécula se trata de una proteína encargada del transporte a las vesículas donde se almacena, hasta su liberación, el neurotransmisor colinérgico, la acetilcolina [29]. Una neurona del sistema colinérgico tendría, por tanto, una alta cantidad de esta proteína.

Al pasar por el citómetro las células se aprecia un gran aumento de la intensidad de fluorescencia de las células diferenciadas al compararlas con las sin diferenciar. Dato que se ve confirmado con la microscopía de fluorescencia donde se ve que todas las células diferenciadas expresen este marcador (Figura 16).

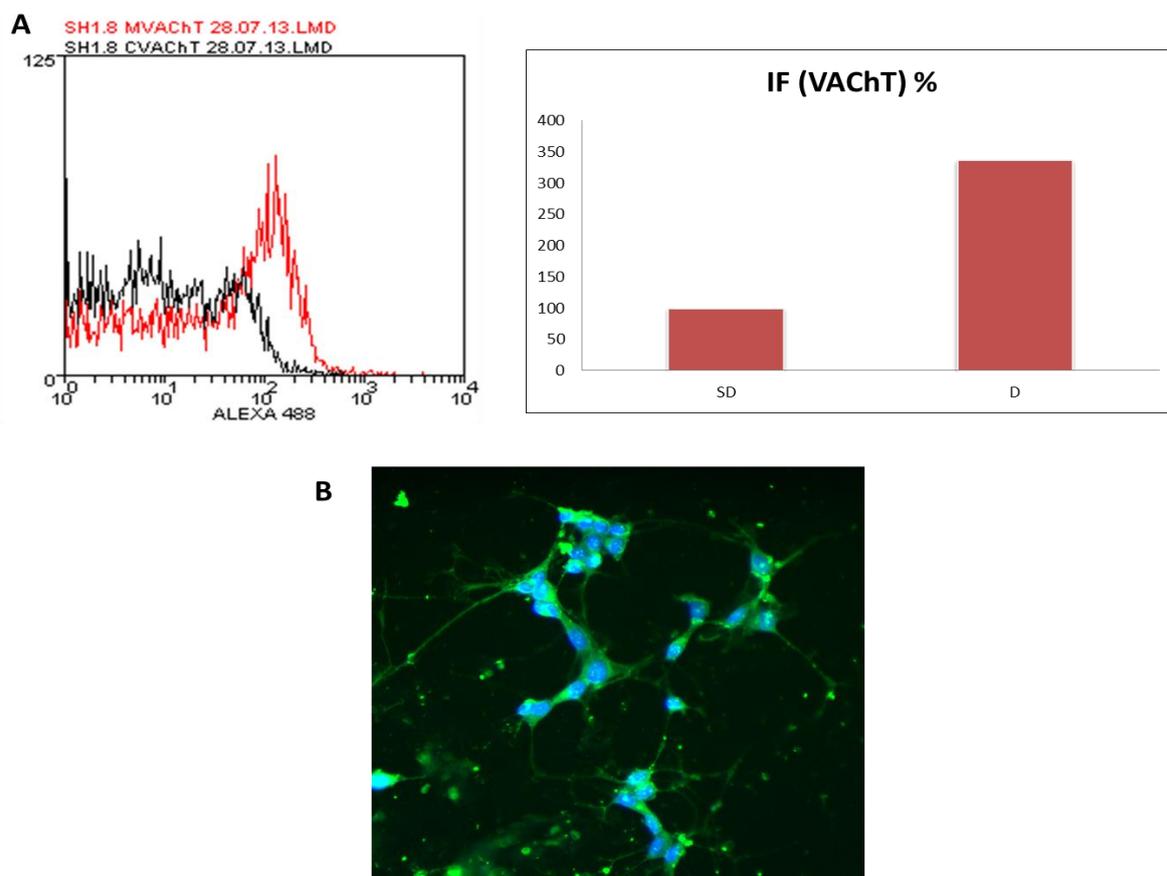


Figura 16. A. Expresión de VChT en células sin diferenciar (SD) y células diferenciadas (D) en citometría de flujo. B. Expresión del VChT (en verde) en células diferenciadas por microscopía de fluorescencia.

-Comprobación de la diferenciación de tipo colinérgico

Ya hemos comprobado que las células se han diferenciado hacia neuronas colinérgicas, pero para asegurarnos que no lo han hecho hacia otros tipos neuronales realizamos un marcaje con tirosina hidroxilasa (TH). La TH es una enzima encargada de producir dihidroxifenilalanina (DOPA) que es el precursor de la dopamina, neurotransmisor de las neuronas dopaminérgicas.

Marcamos las células tanto para citometría de flujo como microscopía de fluorescencia, con TH. Al observar los resultados vemos que en citometría la intensidad de fluorescencia de las células diferenciadas disminuye con respecto de las sin diferenciar y en microscopía de fluorescencia prácticamente no se observan células que expresen el marcador (Figura 17). Esto indica que no se ha producido una diferenciación a tipo dopaminérgico.

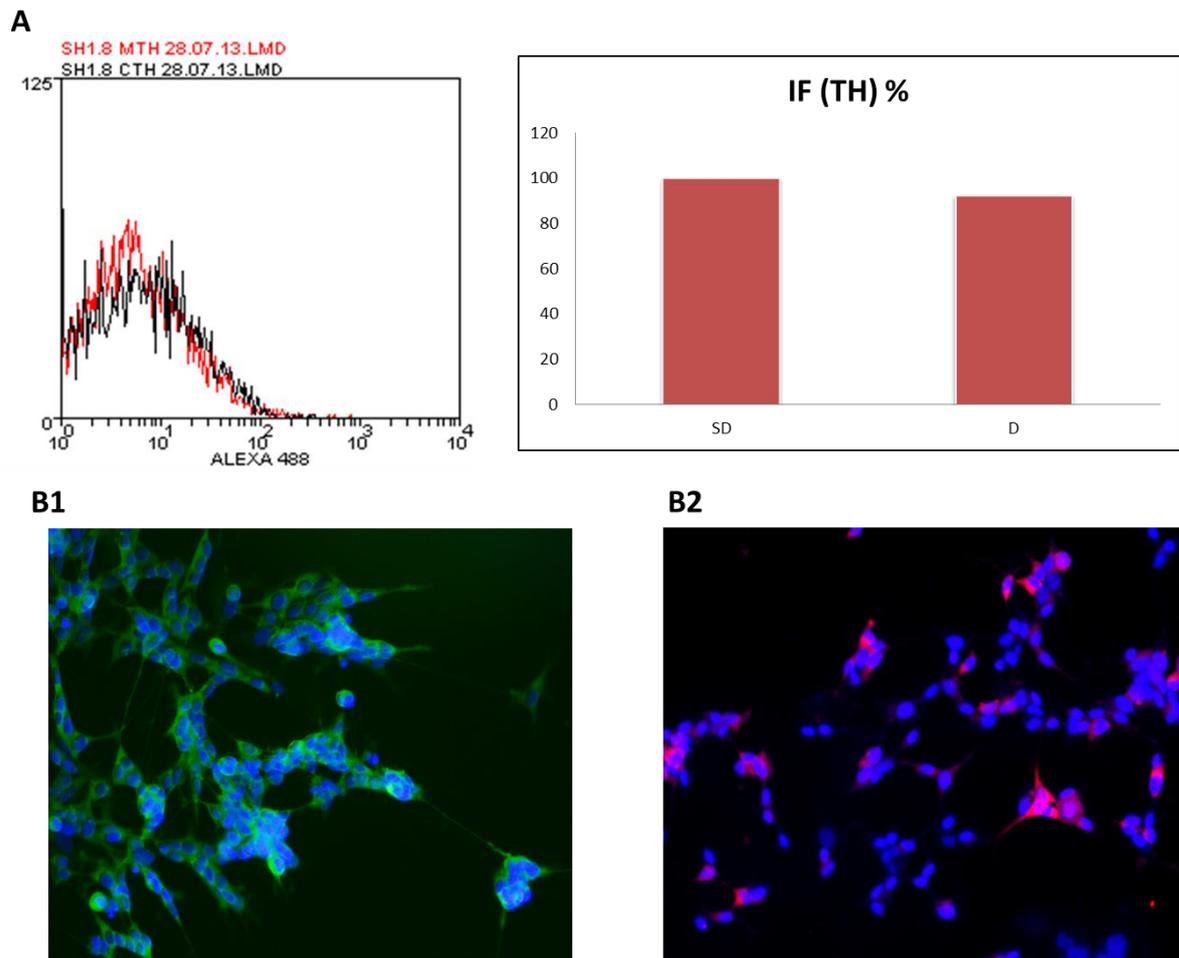


Figura 17. A. Expresión de TH en células sin diferenciar (SD) y células diferenciadas (D) en citometría de flujo. B1. Expresión del TH por microscopía de fluorescencia. B1. En células diferenciadas a dopaminérgica (en verde). B2. En células diferenciadas a colinérgicas (en rojo).

Todos los datos obtenidos nos indican que siguiendo este protocolo las células SH-SY5Y se diferencian hacia neuronas de tipo colinérgico.

5. DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA NT2 A NEURONA COLINÉRGICA

A pesar de haber obtenido la diferenciación a neurona colinérgica con la línea celular SH-SY5Y, buscamos también un protocolo de diferenciación con células de la línea NT2. Para investigar la relación del sistema OXPHOS con la AD resultaría interesante poder trabajar con híbridos mitocondriales diferenciados a este tipo de neurona. La construcción de híbridos requiere una técnica complicada, y la línea celular NT2 ha demostrado ser más sencilla para trabajar en la producción de estos que la línea SH-SY5Y.

-Análisis de la morfología neuronal

La línea de teratocarcinoma humano NT2 se diferenció, al igual que las SH-SY5Y, con un protocolo formado por dos etapas. En la primera fase las células se mantenían a lo largo de un mes con RA, para pasar a la segunda etapa se realizaba una tripsinización selectiva y se cultivaban en placas de poly - D - lisina con inhibidores mitóticos.

En cuanto a la morfología, estas células no mostraron ningún fenotipo neuronal en todo el mes de tratamiento con RA. No fue hasta que se realizó la tripsinización selectiva cuando empezaron a mostrar conformación neuronal y revelar neuritas (Figura 18).

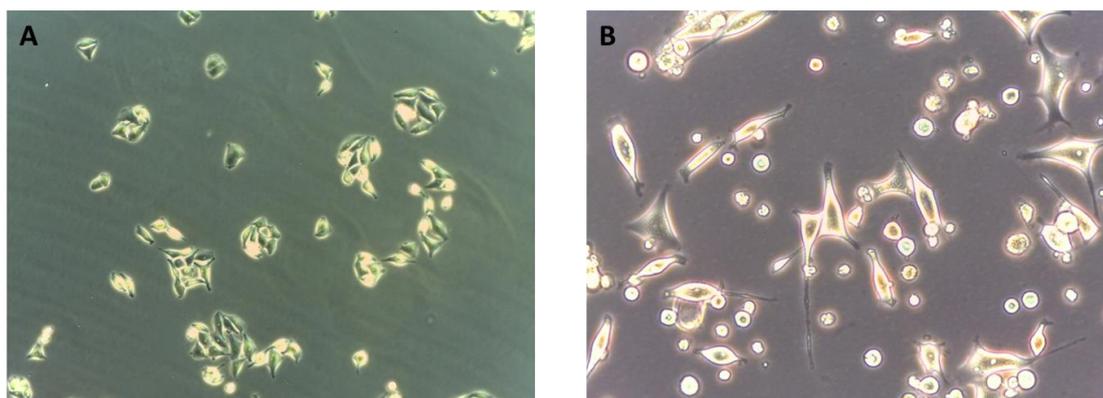


Figura 18. A. Células NT2 sin diferenciar. B. Células NT2 diferenciadas.

-Análisis de marcadores neuronales

De nuevo, los cambios morfológicos no son suficientes para confirmar la diferenciación a neurona. Por lo tanto, al igual que con las células SH-SY5Y, realizamos un marcaje con β – III – Tubulina en citometría de flujo.

Los datos de citometría nos muestran que ha habido una diferenciación a neurona. Se puede observar como la expresión del marcador aumenta en las células diferenciadas con respecto a las no diferenciadas (Figura 19).

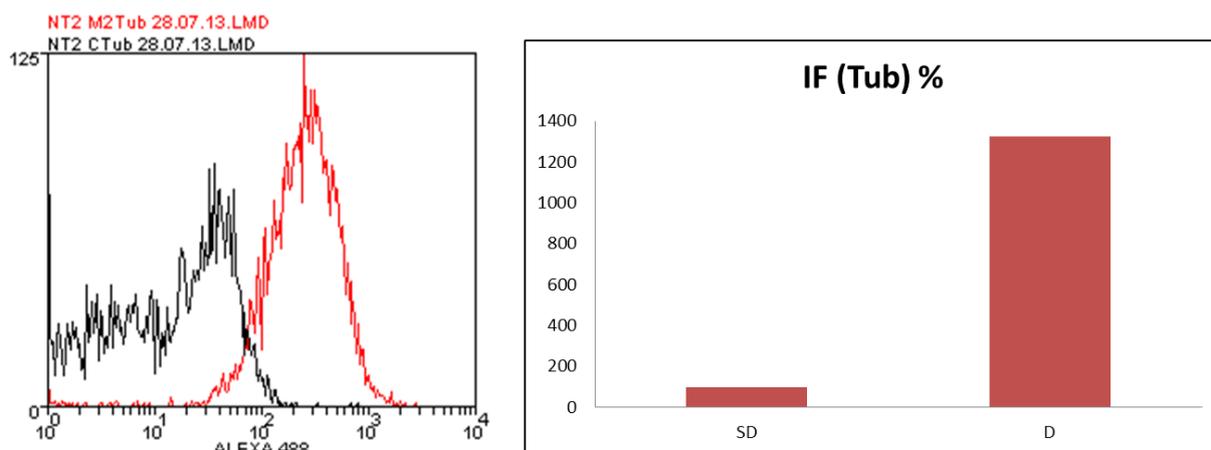


Figura 19. Expresión de la β – III – Tubulina en células sin diferenciar (SD) y células diferenciadas (D) en citometría de flujo.

-Análisis de marcadores colinérgicos

A continuación, analizamos si se trata de una neurona diferenciada hacia tipo colinérgico marcando las muestras con VACHT.

En citometría se ve un gran aumento de la intensidad de fluorescencia en las células diferenciadas en contraste con las sin diferenciar y en microscopía de fluorescencia vemos como todas las células expresan el marcador (Figura 20).

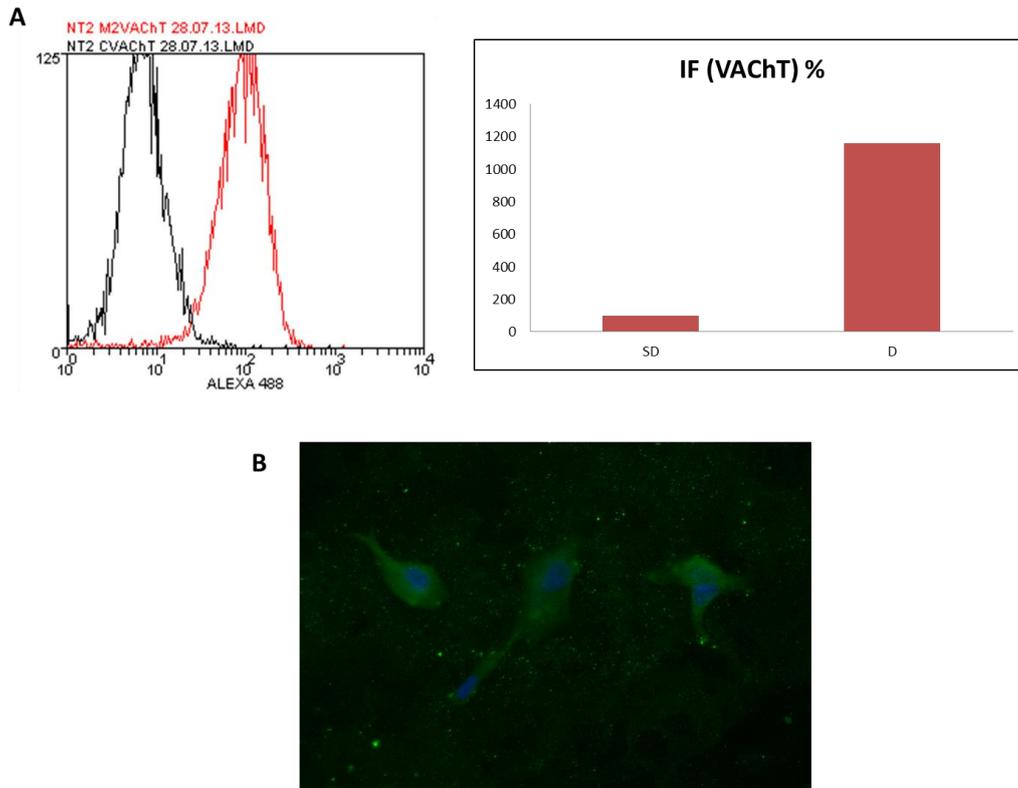


Figura 20. A. Expresión de VACHT en células sin diferenciar (SD) y células diferenciadas (D) en citometría de flujo. B. Expresión del VACHT (en verde) en células diferenciadas por microscopía de fluorescencia.

-Comprobación de la diferenciación de tipo colinérgico

Con los datos anteriores podríamos apuntar que las células se han diferenciado a neurona colinérgicas pero para corroborarlo realizamos el marcaje con TH.

Al pasar las muestras por citometría observamos que las células diferenciadas tienen más intensidad de fluorescencia que las no diferenciadas (aunque no tan marcado como en el caso del VACHT). Y al ver las células diferenciadas por microscopía de fluorescencia se aprecia que la mayoría de estas muestran el marcador (Figura 21).

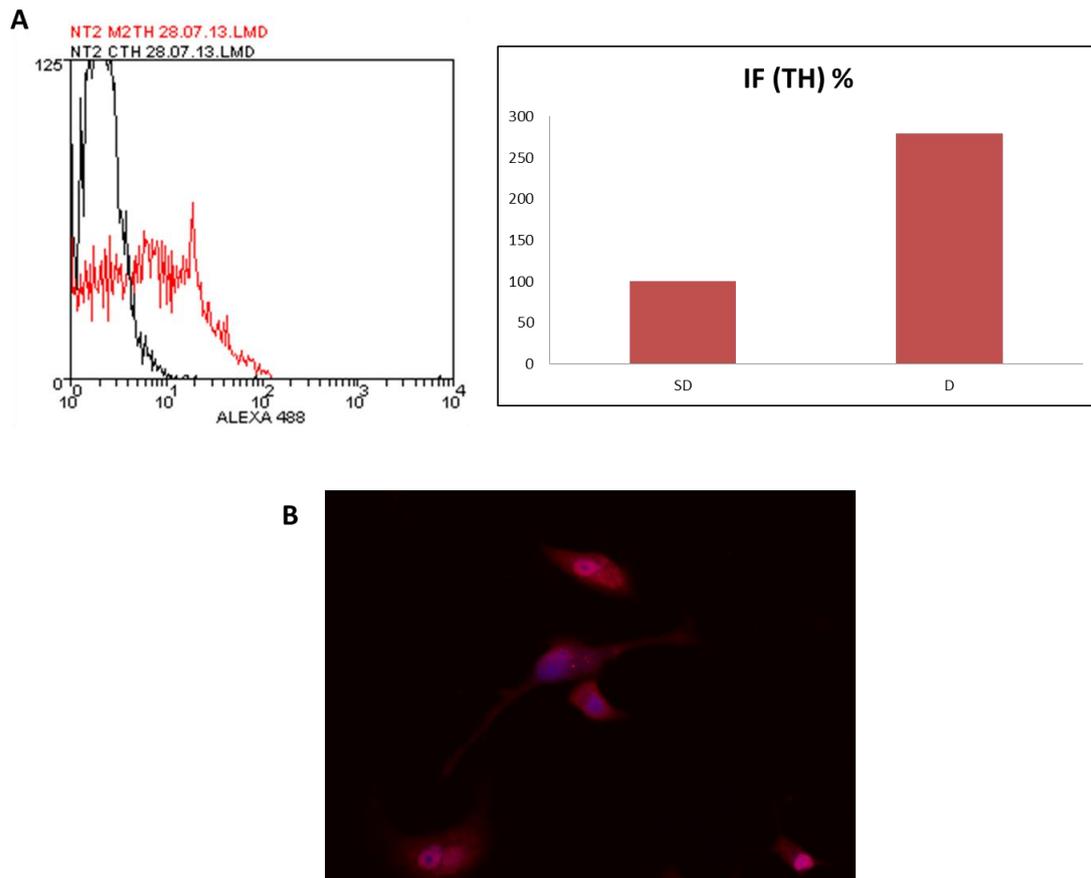


Figura 21. A. Expresión de TH en células sin diferenciadas (SD) y células diferenciadas (D) en citometría de flujo. B. Expresión del TH (en rojo) en células diferenciadas por microscopía de fluorescencia.

Con todos estos datos podemos concluir que realizando este protocolo la línea celular NT2 se diferencia a neurona, pero no podemos asegurar que lo haga hacia ningún tipo neuronal en concreto ya que expresa los marcadores tanto de neurona colinérgica como dopaminérgica. Por lo que debemos seguir poniendo a punto el protocolo.

6. EXTRACCIÓN DE OROTATO, DHO, UMP, UDP y UTP DE FIBROBLASTOS

Con el fin de poder observar las consecuencias producidas al inhibir la cadena respiratoria del sistema OXPHOS, y por lo tanto la inhibición de la enzima DHODH, se estudió la forma de analizar los niveles de las moléculas participantes en la reacción de la DHODH (DHO y orotato) y las producidas a partir de ella (UMP, UDP y UTP).

En la Unidad de Patología Mitocondrial y Neuromuscular del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Javier Torres Torronteras y Ramón Martí Seves pusieron a punto el protocolo para medir DHO, Orotato, UMP, UDP y UTP mediante cromatografía.

Primero se trabajó con un multiestándar para determinar los tiempos para cada molécula. Al pasar el multiestándar 1 μ M acuoso con los 5 compuestos se pudo observar claramente en sus correspondientes transiciones, a los siguientes tiempos de retención: Orotato (1.98 min), DHO (1.83 min); UMP (2.77 min); UDP (3.40 min); UTP (3.77 min) (Figura 22 y 23).

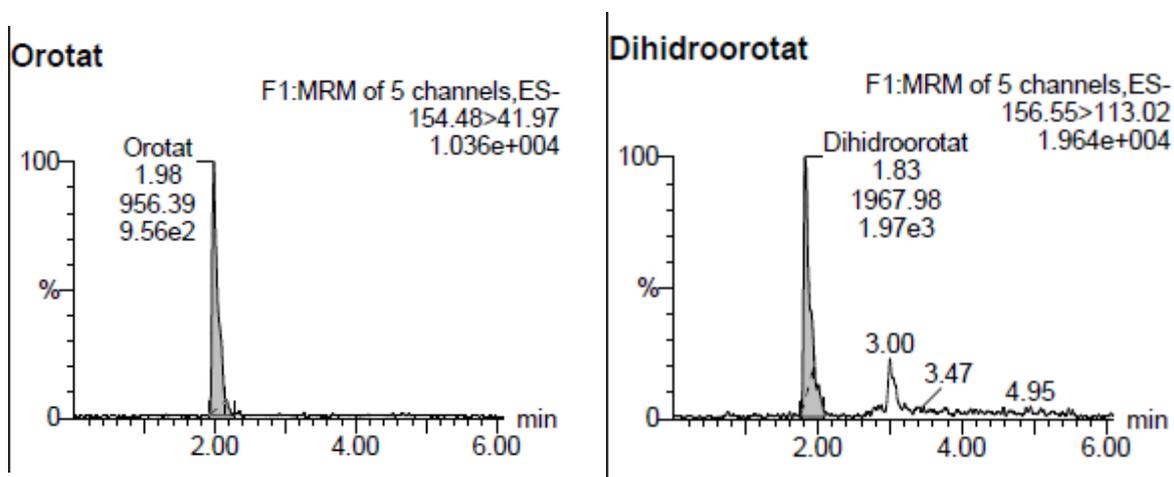


Figura 22. Cromatogramas del multiestándar de Orotato y Dihidroorotato.

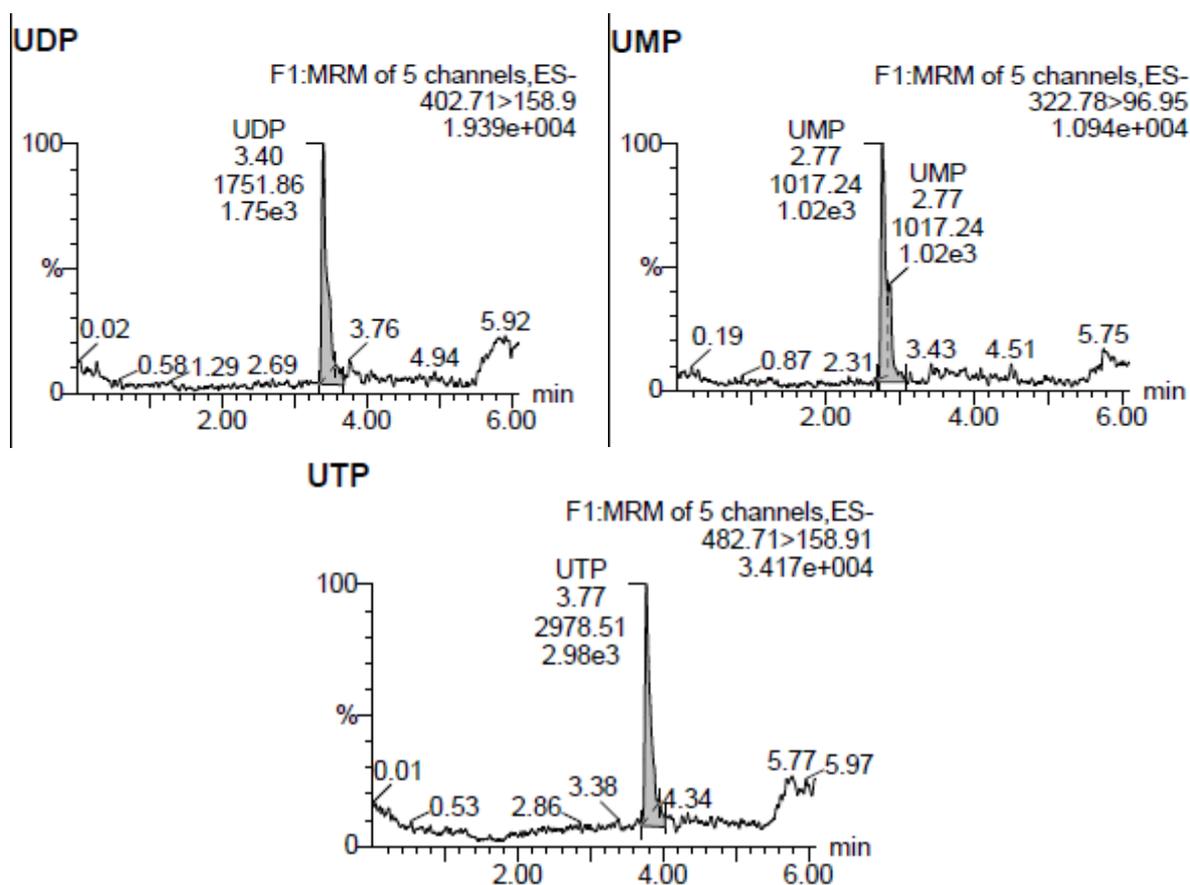


Figura 23. Cromatogramas del multiestándar de UDP, UMP y UTP.

Una vez conocidos los tiempos, se analizan los compuestos en un extracto acuoso de una línea de fibroblastos. Los mono-, di- y trifosfatos de uridina se detectan bien, mientras que orotato y dihidroorotato no se pueden detectar en sus transiciones correspondientes, lo cual puede deberse a que se transforman muy rápido en el medio convirtiéndose en fosfatos de uridina (Figura 24).

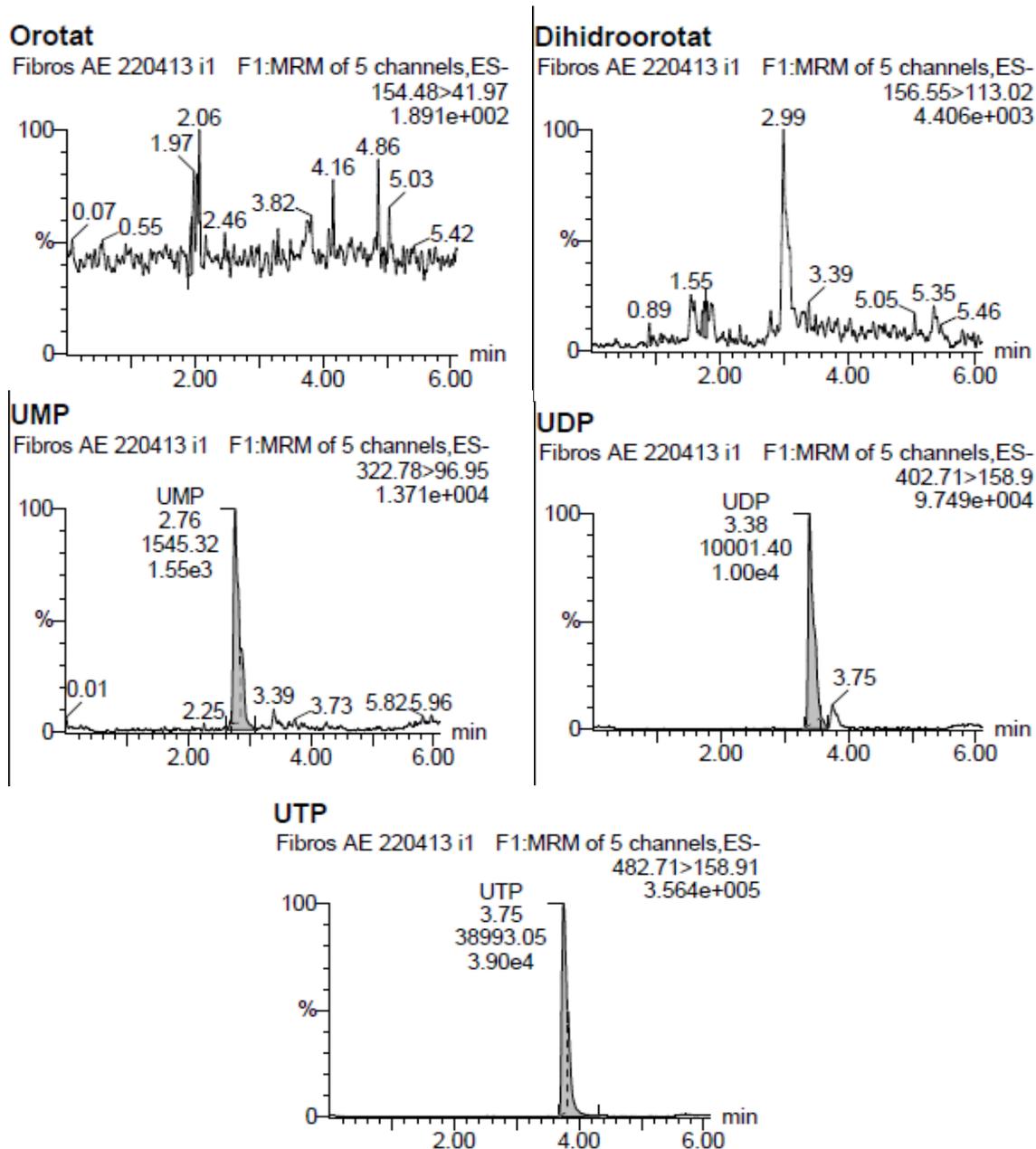


Figura 24. Cromatogramas de la línea de fibroblastos de orotato, dihidroorotato, UDP, UMP y UTP.

Una vez determinados los tiempos de cada molécula y confirmado cuales son posibles medir en células de cultivo, el siguiente paso sería observar las posibles variaciones en células diferenciadas a neuronas con el sistema OXPHOS y la DHODH inhibidos.

V. CONCLUSIONES

- Se consiguió la correcta diferenciación a neurona de tipo colinérgico con la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, mientras que en la línea celular de teratocarcinoma NT2 se obtuvo una diferenciación a neurona sin poder determinar con exactitud a que fenotipo correspondía.
- Se puso a punto la técnica para poder medir los niveles celulares de los nucleótidos de pirimidina mediante cromatografía. El siguiente paso será medir estos niveles en diferentes condiciones de inhibición del C III y C IV de la cadena respiratoria.
- Se determinó las distintas concentraciones de neurofilamento M.
 - Se observó la mayor producción de esta proteína en células diferenciadas, debido a una mayor producción de membrana plasmática necesaria para la síntesis de neuritas.
 - Se vio como la síntesis de membrana disminuía al inhibir la actividad del sistema OXPHOS y la DHODH con azida sódica.
 - Se demostró que el tratamiento con uridina mejoraba la producción de neuritogénesis y de esta manera, las conexiones neuronales.

De esta manera, a partir de ahora podremos estudiar con más detalle las posibles consecuencias de un fallo del sistema OXPHOS en la neuritogénesis, proceso de vital importancia para la prevención de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer.

VI. REFERENCIAS

1. Todd J. Eckroat, Abdelrahman S. Mayhoub, Sylvie Garneau-Tsodikova, Amyloid- β probes: Review of structure–activity and brain-kinetics relationships, *Beilstein J. Org. Chem.* 2013, 9, 1012–1044.
2. Alzheimer's Association, Thies, W., Bleiler, L., Alzheimer's Association Report: 2011 Alzheimer's disease facts and figures, *Alzheimer's & Dementia* 7 (2011) 208–244.
3. Vogels OJM, Broere CAJ, Ter Laak HJ, Ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BPM., Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1990; 11:3–13.
4. Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221: 555-563.
5. Edland et al, Increased risk of dementia in mothers of Alzheimer's disease cases: Evidence for maternal inheritance 1996 *Neurology*, 47: 254-6.
6. Honea et al, Reduced gray matter volume in normal adults with a maternal family history of Alzheimer disease 2010 *Neurology*, 74: 113-20.
7. Mosconi et al, Increased fibrillar amyloid- β burden in normal individuals with a family history of late-onset Alzheimer's 2010 *PNAS*, 107: 5949-54.
8. Mosconi et al, Maternal family history of Alzheimer's disease predisposes to reduced brain glucose metabolism 2007 *PNAS*, 104: 19067-72.
9. Mosconi et al, Declining brain glucose metabolism in normal individuals with a maternal history of Alzheimer disease 2009 *Neurology*, 72: 513-20.
10. Mosconi et al, Maternal transmission of Alzheimer's disease: Prodromal metabolic phenotype and the search for genes 2010 *Human Genomics*, 4: 170-93.

11. Swerdlow et al, The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: An update 2009 *Exp Neurol*, 218: 308-15.
12. Riba et al, Animal model of posterior cingulate cortex hypometabolism implicated in amnesic MCI and AD 2008 *Neurobiology of Learning and Memory*, 90: 112-24.
13. Chomyn A., Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. 1996 *Methods Enzymol.* 264: 334-9.
14. Khan et al, Alzheimer's disease cybrids replicate β -amyloid abnormalities through cell death pathways 2000 *Ann Neurol*, 48: 148-55.
15. Coskun et al, Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication 2004 *PNAS*, 101: 10726-31.
16. Coskun et al, Systemic mitochondrial dysfunction and the etiology of Alzheimer's disease and Down syndrome dementia 2010 *J Alzheimers Dis*, 20: S293-310.
17. Santoro et al, Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease 2010 *PLoS One*, 5: e12037.
18. A. M. Pooler, D. H. Guez, R. Benedictus and R. J. Wurtman, Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma cells, *Neuroscience* 134 (2005) 207–214.
19. Richardson UI, Watkins CJ, Pierre C, Ulus IH, Wurtman RJ., Stimulation of CDP-choline synthesis by uridine or cytidine in PC12 rat pheochromocytoma cells, *Brain Res.* 2003 May 9; 971(2):161-7.
20. Wurtman RJ. Use of phosphatide precursors to promote synaptogenesis. *Ann Rev Nutr.* 2009; 29:59–87.

21. Wurtman RJ, Ulus IH, Cansev M, Watkins CJ, Wang L, Marzloff G. Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally. *Brain Res.* 2006; 1088:83–92.
22. Richard J Wurtman, Mehmet Cansev, Toshimasa Sakamoto, and Ismael Ulus, Nutritional modifiers of aging brain function: use of uridine and other phosphatide precursors to increase formation of brain synapses e_344 88.
23. Joel A. Saydoff, Ana Olariu, Jin Sheng, Zhongyi Hu, Qin Li, Rolando Garcia, Jiong Pei, Grace Y. Sun, Reid von Borstel; Uridine Prodrug Improves Memory in Tg2576 and TAPP Mice and Reduces Pathological Factors associated with Alzheimer's Disease in Related Models, *Journal of Alzheimer's Disease*, 2013.
24. Scheltens P, Verhey FRJ, Olde Rikkert MGM, Kamphuis PJ, Wilkinson D, Kurz A., The efficacy of Souvenaid™ in mild Alzheimer's disease: a randomized, controlled, doubleblind, parallel group, multi-centre, multi-country clinical trial. *Alzheimers Demen.* 2008; 4 (Suppl 2): T789.
25. JingXian Fang, Takeshi Uchiumi, Mikako Yagi, Shinya Matsumoto, Rie Amamoto, Shinya Takazaki, Haruyoshi Yamaza, Kazuaki Nonaka, and Dongchon Kang, Dihydro-orotate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction, *Biosci. Rep.* (2013) 33, art:e00021.
26. Anastasia A. Khutornenko, Vladimir V. Roudko, Boris V. Chernyaka, Andrey B. Vartapetian, Peter M. Chumakov, and Alexandra G. Evstafieva, Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway, 2010 *PENAS 107* (29): 12828–12833.
27. Lotta Agholme, Tobias Lindström, Katarina Kågedal, Jan Marcusson and Martin Hallbeck, An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons, 2010, *Journal of Alzheimer's Disease*, (20), 4, 1069-1082.

28. Isabelle Guillemain, Gérard Alonso, Gilles Paety, Alain Privat, Isabelle Chaudieu, Human NT2 Neurons Express a Large Variety of Neurotransmission Phenotypes In Vitro, 2000, The Journal of Comparative Neurology 422:380-395.
29. Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B., Vesicular acetylcholine transporter (VAChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. 1997 J Comp Neurol. 378 (4):454-67.