

Alba Pesini Martin

# Implicación de la síntesis de nucleótidos de pirimidina en la enfermedad de Alzheimer

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
RUIZ PESINI, EDUARDO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

# IMPLICACIÓN DE LA SÍNTESIS DE NUCLEÓTIDOS DE PIRIMIDINA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Autor

Alba Pesini Martin

Director/es

RUIZ PESINI, EDUARDO

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018





**Universidad**  
Zaragoza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

# **Implicación de la síntesis de nucleótidos de pirimidina en la enfermedad de Alzheimer**

Memoria presentada por **Alba Pesini Martín**

Licenciada en Veterinaria

para optar al Grado de Doctor

Tesis Doctoral dirigida por el Dr. Eduardo Ruiz Pesini

Zaragoza, Julio de 2018





Universidad  
Zaragoza

D. Eduardo Ruiz Pesini, Investigador de la Fundación Agencia Aragonesa para la Investigación y el Desarrollo (ARAID)

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral **“Implicación de la síntesis de nucleótidos de pirimidina en la enfermedad de Alzheimer”**, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, bajo su dirección y tutela, y que ésta se ajusta al plan de investigación y reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor.

Zaragoza, Julio de 2018



Departamento de  
Bioquímica y Biología  
Molecular y Celular  
Universidad Zaragoza

Fdo: Eduardo Ruiz Pesini

Este trabajo ha sido financiado con fondos del proyecto de investigación del Instituto de Salud Carlos III FIS PI14-00070.

La doctoranda ha disfrutado de una beca predoctoral del Gobierno de Aragón cofinanciada por el Fondo Social Europeo (2014-2018).

## **ABREVIATURAS**

**AD:** enfermedad de Alzheimer

**ADAM10:**  $\alpha$ -secretasa

**AICD:** dominio intracelular de A $\beta$ PP libre

**APS:** persulfato amónico

**ATCasa:** aspartato transcarbamoilasa

**ATP:** adenosin trifosfato

**A $\beta$ :**  $\beta$ -amiloide

**A $\beta$ 1-40:** fragmento  $\beta$ -amiloide de 40 aminoácidos

**A $\beta$ 1-42:** fragmento  $\beta$ -amiloide de 42 aminoácidos

**A $\beta$ PP:** proteína precursora de  $\beta$ -amiloide

**BACE:**  $\beta$ -secretasa

**BSA:** albúmina sérica bovina

**CAD:** carbamoil fosfato sintasa II + aspartato transcarbamoilasa + dihidrorotasa

**CCCP:** carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona

**CDIZ:** glicosilación tipo IZ

**cDNA:** DNA complementario

**CDP:** citidina difosfato

**CE:** corteza entorrinal

**CI:** complejo I

**CID:** disociación producida por colisión

**CII:** complejo II

**CIII:** complejo III

**CIV:** citocromo c oxidasa, complejo IV

**CMP:** citidina monofosfato

**CMP-NANA:** CMP-N-acetil neuramínico

**CoQ:** coenzima Q

**CPS II:** carbamoil fosfato sintasa II

**CTF $\alpha$ :** fragmento C-terminal alfa soluble de A $\beta$ PP

**CTFβ:** fragmento C-terminal beta de AβPP

**CTP:** citidina trifosfato

**CV:** ATP sintasa, complejo V

**Cyt c:** citocromo c

**DAB:** 3,3'-Diaminobenzidina

**dCDP, dTTP y dUDP:** desoxirribonucleósido de difosfato de citidina, tiamina y uridina

**DHO:** dihidroorotato

**DHODH:** dihidroorotato deshidrogenasa

**DMEM:** medio Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DNP:** dinitrofenol

**DTT:** ditioneitol

**EDTA:** ácido etilendiaminotetracético

**EOAD:** enfermedad de Alzheimer de aparición temprana

**ETC:** cadena de transporte de electrones

**FAD:** dinucleótido de flavina y adenina oxidado

**FADH<sub>2</sub>:** dinucleótido de flavina y adenina reducido

**FBS:** suero fetal bovino

**FCCP:** carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona

**FMN:** mononucleótido de flavina oxidado

**FMNH<sub>2</sub>:** mononucleótido de flavina reducido

**GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

**GD:** giro dentado

**GDP:** guanosina difosfato

**GPS:** servicio global de proteínas

**HQ:** histoquímica

**IAM:** Iodacetamida

**ICQ:** inmunocitoquímica

**IHQ:** inmunohistoquímica

**KCN:** cianuro de potasio

**LC:** locus cerúleo

**LEF:** leflunomida

**LOAD:** enfermedad de Alzheimer de aparición tardía

**MAP:** proteínas asociadas a microtúbulos

**mRNA:** RNA mensajero

**MT-ATP6 y 8:** genes para la subunidad 6 y 8 del complejo V

**MT-CO1-3:** genes para las subunidades 1 a 3 del complejo IV

**MT-CYB:** gen para la subunidad del complejo III

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**MT-ND 1-6:** genes para las subunidades 1 a 6 del complejo I

**NAD<sup>+</sup>:** dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado

**NADH:** dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido

**nDNA:** DNA nuclear

**NFT:** ovillos neurofibrilares intracelulares de tau hiperfosforilada

**NHNP:** células progenitoras neuronales humanas normales

**O:** orotato

**OMP:** orotidina monofosfato

**OPRT:** orotato fosforribosiltransferasa

**OXPHOS:** sistema de fosforilación oxidativa

**PBS:** solución salina tamponada con fosfato

**PC:** fosfatidilcolina

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PM:** post-mortem

**PMF:** huella peptídica

**PRM:** método de monitorización de reacción en paralelo

**PRPP:** fosforribosil pirofosfato

**PS1, PS2, PS3:** presenilinas 1, 2 y 3

**PYRD:** dihidroorotato deshidrogenasa

**RA:** ácido todo trans-retinoico

**ROS:** especies reactivas de oxígeno

**RPM:** retardo post-mortem

**rRNA:** RNA ribosómico

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa a tiempo real

**sA $\beta$ PP $\alpha$ :** fragmento N-terminal alfa soluble de A $\beta$ PP

**sA $\beta$ PP $\beta$ :** fragmento N-terminal beta soluble de A $\beta$ PP

**SDHA:** subunidad A de la succinato deshidrogenasa

**SDS:** dodecilsulfato sódico

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

**TH:** tirosina hidroxilasa

**TPA:** 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato

**TPM:** transcritos por millón

**tRNA:** RNA de transferencia

**TTP:** tiamina trifosfato

**TUBB3:**  $\beta$ -III-tubulina

**UCK:** uridina / citidina quinasa

**UDP:** uridina difosfato

**UDP-GlcNAC:** UDP-N-acetilglucosamina

**UMP:** uridina monofosfato

**UMPS:** uridina monofosfato sintasa

**UTP:** uridida trifosfato

**ÍNDICE**



# **ÍNDICE**

1.	INTRODUCCIÓN .....	3
1.1.	La enfermedad de Alzheimer .....	3
1.1.1.	Aspectos epidemiológicos de la Enfermedad de Alzheimer .....	3
1.1.2.	Aspectos clínicos de la enfermedad de Alzheimer.....	3
1.1.3.	Aspectos patológicos de la enfermedad de Alzheimer .....	4
1.1.4.	Hipótesis de la cascada amiloide.....	5
1.1.5.	Hipótesis tau.....	6
1.1.6.	Clasificación neuropatológica .....	7
1.1.7.	Hipótesis de la cascada mitocondrial .....	10
1.2.	La mitocondria.....	13
1.3.	Sistema OXPHOS .....	14
1.4.	Síntesis de pirimidinas.....	15
1.4.1.	Síntesis de novo de pirimidinas.....	15
1.4.1.1.	CAD.....	17
1.4.1.2.	DHODH .....	18
1.4.1.3.	UMPS .....	18
1.4.2.	Ruta de salvamento de pirimidinas.....	19
1.4.2.1.	UCK2 .....	19
1.5.	Nucleótidos de pirimidina como precursores.....	20
1.5.1.	Síntesis de CTP.....	20
1.5.2.	Síntesis de UDP-azúcar y glicosilación.....	20
1.5.3.	Síntesis de RNA y DNA.....	21
1.5.4.	Síntesis de fosfatidilcolina .....	21
1.6.	Plasmalema neuronal.....	23
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
3.1.	Estudio de la ruta de biosíntesis <i>de novo</i> de pirimidinas en cerebro humano adulto .....	31
3.1.1.	Expresión de mRNAs .....	31
3.1.1.1.	Revisión de bases de datos .....	31
3.1.1.2.	Análisis de los niveles de mRNA mediante RT-qPCR.....	34
3.1.2.	Proteínas .....	38
3.1.2.1.	Proteína CAD en cerebro.....	38

3.1.2.2.	Proteína DHODH en cerebro .....	38
3.1.3.	Actividad.....	43
3.1.3.1.	Revisión bibliográfica .....	43
3.1.3.2.	Consumo de Oxígeno .....	45
3.1.3.3.	Histoquímica de DHODH .....	46
3.1.4.	Localización .....	48
3.2.	Alteraciones en la síntesis de nucleótidos de pirimidinas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer.....	52
3.2.1.	Variables preclínicas.....	52
3.2.2.	Niveles de mRNA de DHODH.....	55
3.2.3.	Niveles de mRNA de UCK2 .....	56
3.2.4.	Relación entre los niveles de mRNA de DHODH y UCK2.....	59
3.2.5.	Relación con el sistema OXPHOS .....	61
3.3.	Función OXPHOS, biosíntesis de nucleótidos de pirimidina y diferenciación neuronal .....	65
3.3.1.	Presentación del modelo celular.....	65
3.3.2.	Enzimas de la síntesis de pirimidinas en las células SH-SY5Y.....	67
3.3.3.	Efecto de la inhibición directa de la enzima DHODH sobre la diferenciación neuronal.....	69
3.3.4.	Efecto de la inhibición indirecta de la enzima DHODH sobre la diferenciación neuronal.....	72
4.	CONCLUSIONES .....	79
5.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	83
5.1.	Muestras biológicas y líneas celulares .....	83
5.2.	Cultivos celulares.....	83
5.2.1.	Equipos, materiales y reactivos de cultivo celular .....	83
5.2.2.	Mantenimiento de cultivos celulares.....	84
5.2.3.	Congelación y descongelación de las líneas celulares .....	85
5.2.4.	Recuento celular.....	85
5.2.5.	Curvas de crecimiento.....	86
5.2.6.	Tratamientos con drogas.....	86
5.3.	Diferenciación celular a neuronas dopaminérgicas .....	87
5.4.	Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	87
5.4.1.	Equipos y materiales utilizados .....	87
5.4.2.	Extracción del RNA .....	87

5.4.2.1.	Obtención de RNA a partir de cultivos celulares.....	87
5.4.2.2.	Obtención de RNA a partir de tejido cerebral.....	88
5.4.3.	Obtención del cDNA .....	88
5.4.4.	Cuantificación de ácidos nucleicos.....	89
5.4.5.	Cuantificación de la expresión de genes .....	89
5.4.5.1.	Genes estudiados .....	89
5.4.5.2.	Cuantificación de mRNAs a partir de cDNA.....	90
5.4.5.3.	Cuantificación de mRNAs a partir de RNA .....	91
5.5.	Clonaje en el vector pCRTM-Blunt II-TOPO® .....	92
5.5.1.	Diseño de oligonucleótidos para amplificar .....	92
5.5.2.	Obtención de cDNA a partir de RNA de la línea celular SH-SY5Y .....	93
5.5.3.	Amplificación por PCR .....	93
5.5.4.	Clonaje del producto de PCR en el vector .....	94
5.5.5.	Transformación de bacterias DH5α por choque térmico.....	94
5.5.6.	PCR de colonias bacterianas.....	95
5.5.7.	Secuenciación del gen clonado en las colonias recombinantes.....	96
5.6.	Clonación del fragmento de DHODH.....	96
5.6.1.	Clonación y transformación en E. Coli BL21 .....	96
5.6.2.	Expresión y purificación del péptido .....	97
5.7.	Manipulación y análisis de proteínas .....	97
5.7.1.	Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford.....	97
5.7.2.	Método para el análisis de proteínas por Western blot .....	99
5.7.2.1.	Materiales y equipos utilizados.....	99
5.7.2.2.	Extracción de proteínas.....	100
5.7.2.2.1.	Extracción de proteínas de líneas celulares .....	100
5.7.2.2.2.	Extracción de proteínas de tejido cerebral .....	100
5.7.2.3.	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS .....	101
5.7.2.4.	Transferencia a membranas PVDF .....	102
5.7.2.5.	Inmunodetección de proteínas mediante Western-blot .....	103
5.7.2.5.1.	Incubación con los anticuerpos primario y secundario .....	103
5.7.2.5.2.	Detección de proteínas .....	104
5.7.2.6.	Reutilización de membranas .....	104
5.8.	Huella peptídica.....	105
5.8.1.	Preparación de las muestras .....	105

5.8.2.	Análisis mediante MALDI-TOF/TOF .....	105
5.8.2.1.	Aplicación en Placa de MALDI .....	105
5.8.2.2.	Adquisición de espectros MS .....	105
5.8.3.	Búsqueda en bases de datos .....	106
5.8.3.1.	Identificación por huella peptídica.....	106
5.8.3.2.	Identificación por huella peptídica combinada con MS/MS .....	107
5.9.	Análisis de Proteómica Dirigida: PRM .....	107
5.9.1.	Preparación de las muestras .....	107
5.9.2.	Identificación de proteínas por proteómica dirigida (PRM).....	107
5.9.2.1.	Diseño del método PRM.....	107
5.9.2.2.	Cromatografía líquida y análisis de espectrómetros de masas.....	108
5.9.3.	Análisis de datos.....	109
5.10.	Método para el análisis de proteínas por citometría de flujo.....	110
5.10.1.	Equipos y materiales utilizados en citometría .....	110
5.10.2.	Detección de proteínas por citometría de flujo .....	110
5.11.	Consumo de oxígeno .....	111
5.11.1.	En células intactas .....	111
5.11.2.	En tejido cerebral .....	112
5.11.2.1.	Preparación de las muestras .....	112
5.11.2.2.	Respiración .....	112
5.12.	Histoquímica.....	113
5.12.1.	Preparación de las muestras .....	113
5.12.2.	Tinción Hematoxilina-Eosina .....	113
5.12.2.1.	Materiales y reactivos .....	113
5.12.2.2.	Tinción .....	113
5.12.3.	Histoquímica DHODH .....	114
5.12.3.1.	Materiales y reactivos .....	114
5.12.3.2.	Tinción .....	114
5.13.	Inmunohistoquímica .....	114
5.13.1.	Preparación de las muestras .....	114
5.13.2.	Material y reactivos.....	115
5.13.3.	Tinción .....	115
5.14.	Inmunofluorescencia en cultivos celulares .....	115
5.15.	Bases de datos.....	116
5.16.	Análisis estadístico .....	116

6. BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXOS .....	iii
ANEXO I .....	.xi
ANEXO II .....	iii
ANEXO III .....	.xiii



## ***INTRODUCCIÓN***



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La enfermedad de Alzheimer

### 1.1.1. Aspectos epidemiológicos de la Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (AD) es un proceso neurodegenerativo, crónico y progresivo, caracterizado por la pérdida de memoria y declinar cognitivo [1]. Es la forma más común de demencia progresiva y afecta entre al 5 y 10 % de la población por encima de los 65 años [2]. El factor de riesgo más importante es la edad y la prevalencia se incrementa de forma exponencial con la ella. Sin embargo, el Alzheimer no es siempre una enfermedad de la vejez. Aproximadamente 200,000 estadounidenses menores de 65 años padecen lo que se denominada Alzheimer de aparición temprana (EOAD) ([www.alz.org](http://www.alz.org)). Por lo que se puede diferenciar entre Alzheimer de aparición tardía (LOAD) y EOAD, que tan solo representa el 1-2 % de todos los casos de AD [3].

Dentro de las demencias, la LOAD representa entre el 60 y 70 % de los casos. Casi 50 millones de personas padecen demencia, cifra que alcanzará los 131 millones para 2050. El tratamiento y el cuidado de personas con demencia cuesta actualmente mil millones de dólares [4]. En España, el AD, supone casi el 80 % de las muertes por demencia (Instituto Nacional de Estadística). Actualmente se sitúa entre las 10 principales causas de muerte a nivel global ([www.alz.org](http://www.alz.org)), siendo la séptima en España.

### 1.1.2. Aspectos clínicos de la enfermedad de Alzheimer

La AD puede afectar de distintas maneras según el individuo, pero el patrón de síntomas más común comienza con el empeoramiento gradual de la memoria, aumentando la dificultad para recordar nueva información. Los individuos progresan desde AD leve a moderado y grave a diferentes velocidades. A medida que la enfermedad progresa, las capacidades cognitivas y funcionales del individuo disminuyen. La disminución cognitiva incluye pérdida de memoria, dificultades en el lenguaje y disfunción en la ejecución. Además, la disfunción no cognitiva incluye ansiedad, depresión, alucinaciones, delirios y agitación [5].

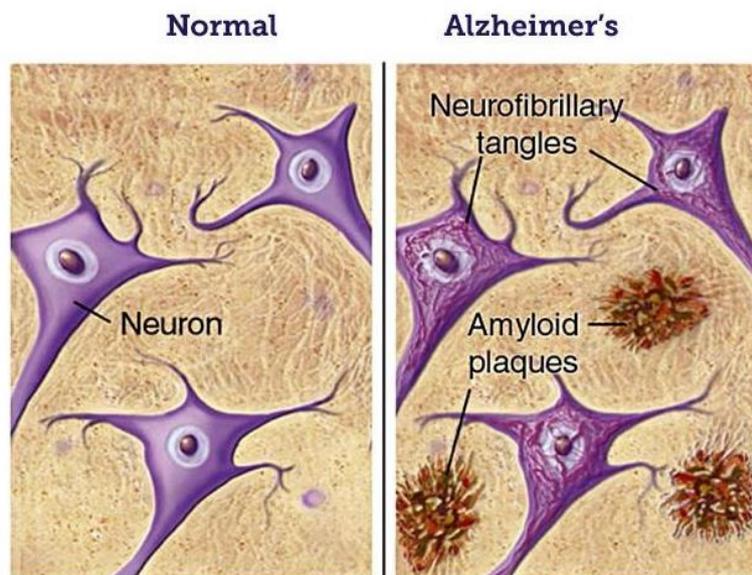
En un comienzo, fase leve, se ven afectados los reflejos. Presentan rasgos de lentitud, cambios leves de ánimo y pérdidas de memoria. Posteriormente, fase moderada, empiezan los problemas para acordarse de hechos recientes, mientras que los aspectos lejanos son

recordados perfectamente. Tienen dificultad para reconocer aspectos actuales como la fecha, el lugar, la hora, y, a veces, no son capaces de reconocer los rostros de familiares. Por último, fase grave, pierden la capacidad para comer, masticar e ingerir alimentos. Además, en este estadio ya no reconocen a nadie. En la AD avanzada, las personas necesitan ayuda con las actividades básicas de la vida diaria. La incapacidad para moverse, en esta última etapa, puede hacer que las personas sean más vulnerables a las infecciones u otras patologías. La enfermedad es finalmente fatal y las infecciones relacionadas son, a menudo, la causa.

### 1.1.3. Aspectos patológicos de la enfermedad de Alzheimer

La AD se diagnosticó por primera vez hace más de 100 años, pero la investigación en sus síntomas, causas, factores de riesgo y tratamiento no ganó impulso hasta los últimos 30 años. Y aunque se ha avanzado bastante en su estudio, con la excepción de ciertas formas heredadas de la enfermedad, la causa o causas del AD siguen siendo desconocidas [6].

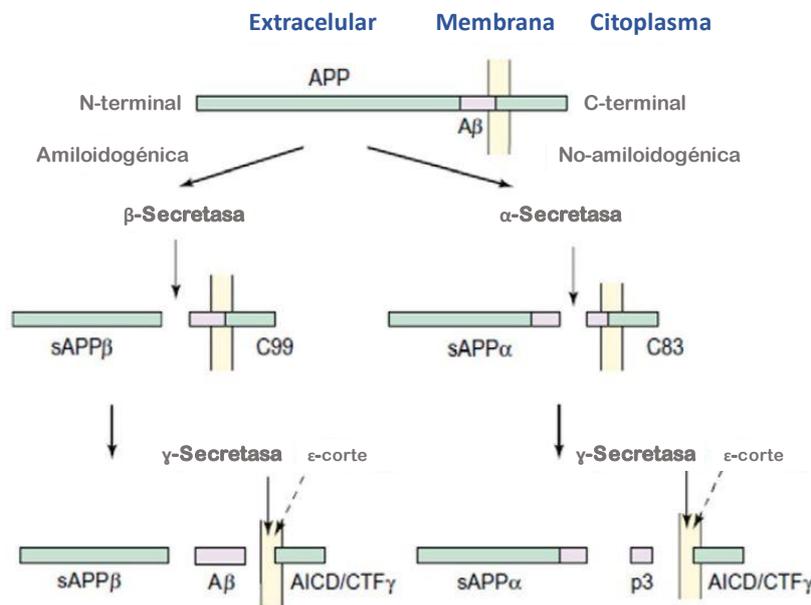
Como rasgos histopatológicos característicos destacan las placas extracelulares de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ); los ovillos neurofibrilares intracelulares de tau hiperfosforilada (NFT); y una pérdida continuada de neuronas (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Imágenes esquemáticas de tejido cerebral de un individuo sano y otro con Alzheimer. En el segundo caso se puede apreciar las placas  $A\beta$  extracelulares y los ovillos neurofibrilares intracelulares. *Imagen perteneciente a BrightFocus Foundation.*

### 1.1.4. Hipótesis de la cascada amiloide

De acuerdo con la hipótesis de la "cascada amiloide" (Figura 1.2), A $\beta$  es la causa de la AD [1]. La proteína precursora de A $\beta$  (A $\beta$ PP o APP) es una proteína integral de membrana que puede ser procesada proteolíticamente por una vía no amiloidogénica o una amiloidogénica. En la vía amiloidogénica, la  $\beta$ -secretasa (BACE1) es la encargada de realizar el primer corte, produciendo un fragmento N-terminal  $\beta$  soluble (sA $\beta$ PP $\beta$ ) más un fragmento C-terminal  $\beta$  (CTF $\beta$ ). CTF $\beta$  es procesado por la  $\gamma$ -secretasa que genera A $\beta$  y un dominio intracelular A $\beta$ PP libre (AICD o CTF $\gamma$ ).



**Figura 1.2.** Esquema representativo del procesamiento de la proteína precursora de  $\beta$ -amiloide. APP: proteína precursora de  $\beta$ -amiloide; A $\beta$ :  $\beta$ -amiloide; sAPP $\beta$ : fragmento N-terminal  $\beta$  soluble de APP; C99: fragmento C-terminal  $\beta$  de APP; sAPP $\alpha$ : fragmento N-terminal  $\alpha$  de APP; C83: fragmento C-terminal  $\alpha$  de APP; AICD/CTF $\gamma$ : fragmento C-terminal  $\gamma$  de APP; p3: péptido p3. *Imagen perteneciente a Barage et al. 2015.*

Por otro lado, la vía no amiloidogénica es iniciada por la  $\alpha$ -secretasa (ADAM10) y produce A $\beta$ PP $\alpha$  soluble en el extremo N-terminal (sA $\beta$ PP $\alpha$ ) más un fragmento C-terminal  $\alpha$  (CTF $\alpha$ ), que es procesado por la  $\gamma$ -secretasa obteniéndose el péptido p3 y AICD. Cuando el primer corte en la proteína A $\beta$ PP es realizado por la  $\alpha$ -secretasa, este ocurre dentro de lo que sería la secuencia de A $\beta$ , y por lo tanto la generación de A $\beta$  es imposible.

Dependiendo del punto de corte de la  $\gamma$ -secretasa, se producen tres formas principales de A $\beta$ , que comprenden 38, 40 o 42 residuos de aminoácidos. La cantidad relativa de A $\beta$ 1-42 formada es particularmente importante, debido a que se trata de la forma más larga de A $\beta$ , por lo que es más propensa a oligomerizar y formar fibrillas amiloides más rápidamente que el

péptido A $\beta$ 1-40 [7]. La enzima  $\gamma$ -secretasa es una proteasa que realiza su corte dentro de la membrana plasmática. La actividad forma parte de un gran complejo enzimático que tiene al menos cuatro componentes. De ellos, los más importantes son las presenilinas. Por el momento se han identificado tres presenilinas (PS1, PS2 y PS3). Las mutaciones en los genes que codifican las presenilinas son responsables de entre el 20 y 60 % de los casos de Alzheimer heredado o EOAD. Pese a que la producción de A $\beta$  es un proceso normal [8], [9], la sobreproducción de A $\beta$ , o una mayor proporción de A $\beta$ 1-42, parece suficiente para causar AD de inicio temprano [10]–[12].

La síntesis de A $\beta$  provoca una respuesta inflamatoria local con microgliosis y astrocitosis. Se produce una pérdida de la columna sináptica y distrofia neuronal. Con el tiempo, estos eventos resultan en estrés oxidativo, alteración de la homeostasis iónica y una serie de cambios bioquímicos. La cascada culmina en una disfunción sináptica/neuronal generalizada y muerte celular, que conduce a una demencia progresiva asociada con patología extensa de A $\beta$  y tau [13].

#### **1.1.5. Hipótesis tau**

La proteína tau pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) que se localiza principalmente en neuronas [14]. En condiciones fisiológicas, esta proteína regula el ensamblaje de microtúbulos, el comportamiento dinámico y la organización espacial [15]. La proteína tau está codificada por un único gen. En cerebro adulto se expresan principalmente seis isoformas a través del corte y empalme alternativo [16].

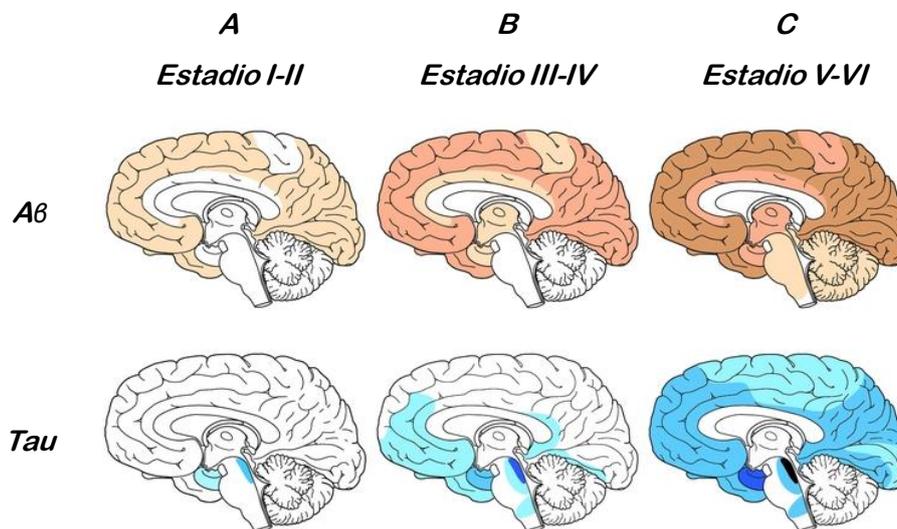
La fosforilación de la proteína tau está regulada por el desarrollo [17]. Durante la embriogénesis y el desarrollo temprano, cuando no se expresan las seis isoformas sino tan solo una, hay un alto nivel de fosforilación de tau. Por el contrario, en el cerebro adulto, cuando se expresan las seis isoformas, los niveles de fosforilación son más bajos.

En condiciones patológicas, como la AD, los niveles de tau fosforilada aumentan. La hiperfosforilación de tau reduce su afinidad hacia los microtúbulos [18]. El acúmulo de proteína tau hiperfosforilada genera filamentos que, en el cerebro de pacientes con AD, se agregan formando los ovillos neurofibrilares [19]. Esta pérdida de función conduce a la alteración de las funciones estructurales y reguladoras del citoesqueleto. De esta manera, se ven afectado el mantenimiento morfológico y el transporte axonal, produciéndose disfunción sináptica y neurodegeneración [20].

La hipótesis tau afirma, por tanto, que es la hiperfosforilación de tau la causante de esta enfermedad. Señalando, además, que los daños histopatológicos producidos por los NFT progresan de forma correlacionada con los síntomas de los pacientes. Aún así, todavía no existe una explicación clara de cómo se inicia todo este proceso.

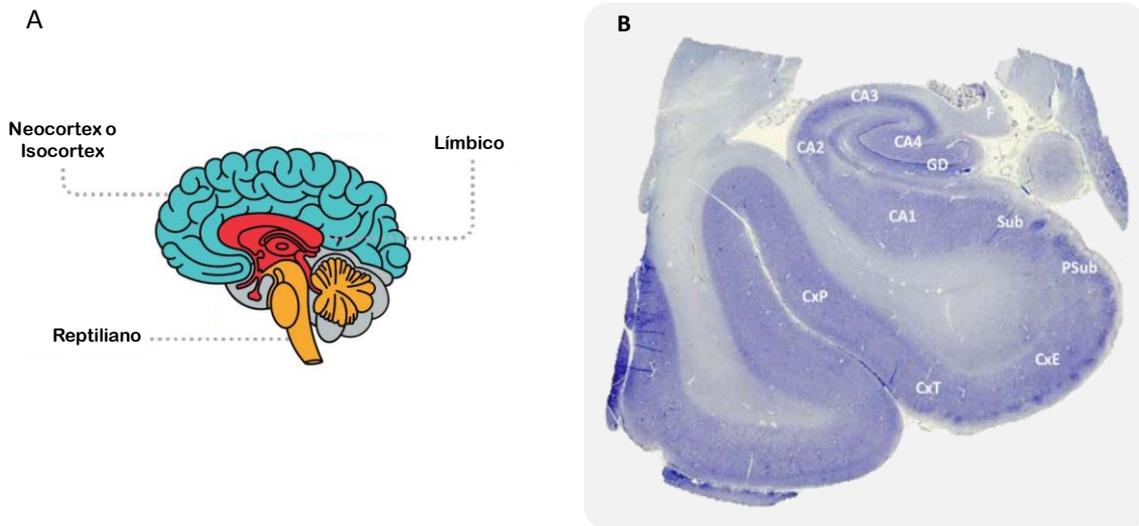
### 1.1.6. Clasificación neuropatológica

En 1991 los neuroanatomistas Heiko Braak y Eva Braak propusieron una división de la enfermedad en diferentes estadios según la progresión de los daños neuropatológicos (Figura 1.3 y 1.5). Propusieron dos clasificaciones diferentes en función del daño histopatológico en el que se centraban, una para las placas  $A\beta$  y otra para los NFT.



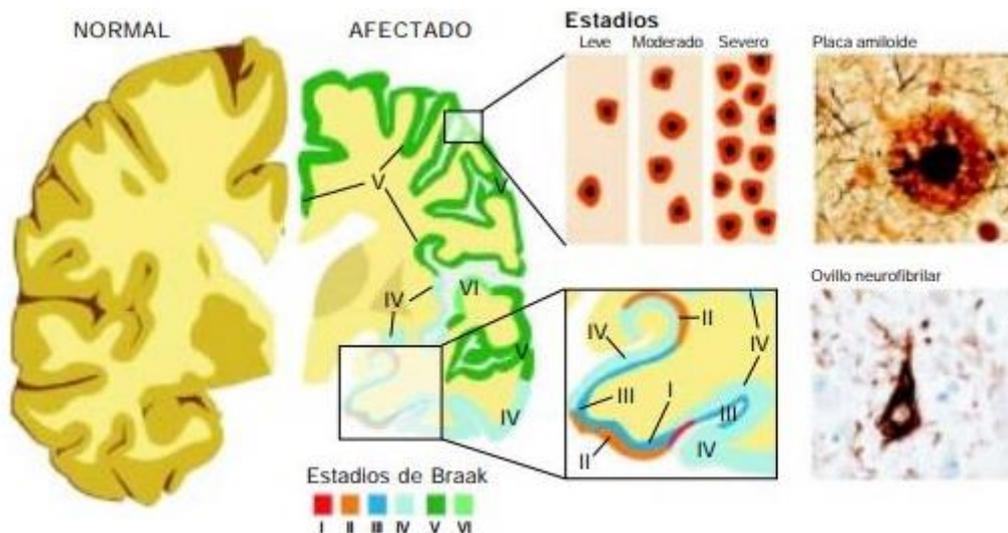
**Figura 1.3.** Esquema demostrativo de la progresión del acúmulo de las placas de  $A\beta$  y los ovillos de tau hiperfosforilado en los diferentes estadios de la enfermedad. *Imagen perteneciente Jeanne et al. 2017.*

Para los depósitos de amiloide presentaron tres estadios (A, B y C) (Figura 1.3). En el estadio A se muestra una baja densidad de depósitos de  $A\beta$  que están localizados en la porción basal del isocórtex (Figura 1.4). En el estadio B los depósitos de  $A\beta$  se encuentran a lo largo de todo el isocórtex, y además la formación hipocámpica comienza a verse afectada. Por último, en el estadio C, las placas amiloides se encuentran por todo el isocórtex y en alta densidad [21].



**Figura 1.4.** Imagen esquemática del cerebro y representativa de la formación hipocámpal y corteza. A: Representación de las partes del cerebro según la clasificación del “cerebro triuno” (de acuerdo a la evolución). B: Imagen de la sección coronal de la formación del hipocampo humana y corteza (situado en la parte límbica). CxP: córtex perirrinal; CxT: córtex transentorrinal; CxE: córtex entorrinal; PSub: presubiculum; Sub: subículum; CA1: sector CA1 del asta de Ammón; CA2: sector CA2; CA3: sector CA3; CA4: hilio del giro dentado; GD: giro dentado; F: fimbria. *Imagen perteneciente a TheNovaRoom y Rábano 2013 respectivamente.*

Quando la clasificación se centra en la formación de los ovillos neurofibrilares (Figura 1.5), la progresión de los daños neuropatológicos puede relacionarse más fácilmente con la progresión clínica de los pacientes. De esta manera, aparecen seis estadios que, agrupados de dos en dos, suelen coincidir con el tiempo con los tres estados de A $\beta$ .



**Figura 1.5.** Imagen representativa del acúmulo de las placas de A $\beta$  en la corteza cerebral y de los ovillos neurofibrilares en la formación hipocampal a lo largo de los distintos estadios del AD. *Imagen tomada de Alvarez Sanchez Mario, et al. 2008.*

Los dos primeros estadios (estadios I y II), se corresponde con la fase preclínica de la enfermedad ya que los daños se producen por debajo del umbral de aparición de los síntomas clínicos [22]. A estas dos fases se les denomina estadios transentorrinales, ya que los cambios se centran prácticamente en esta región. La región CA1 del hipocampo también se ve ligeramente dañada, mientras que el isocortex aún permanece intacto.

Los estadios III y IV se clasifican como estadios límbicos. Esta fase se corresponde con la aparición de los primeros síntomas, cuando comienza a aparecer el deterioro en la función cognitiva y surgen los cambios de personalidad [22]. Durante estos estadios el área transentorrinal se ve completamente afectada y el daño se extiende a toda la región entorrinal. La formación hipocampal muestra un moderado daño, que se centra tan solo en la zona CA1 en el estadio III, pero que llega levemente a CA4 en el estadio IV. En ambos periodos, el isocortex comienza a dañarse ligeramente.

Las dos últimas fases, estadio V y VI, conocidos como estadios isocorticales, se corresponden con los pacientes que muestran todos los síntomas de demencia. En ellos el isocortex está gravemente dañado. En el estadio V se pueden ver daños en la formación hipocampal, mientras que en el estadio VI, está completamente infestada de ovillos neurofibrilares.

### 1.1.7. Hipótesis de la cascada mitocondrial

Si bien existen pruebas sustanciales que respaldan cada una de estas teorías por separado, la cascada A $\beta$  y la hipótesis tau, ninguna de ellas recoge una explicación de ambos hechos. En este punto nos encontramos con la "hipótesis de la cascada mitocondrial". Esta hipótesis propone que la función basal del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS) de cada individuo, junto con su declinar asociado a la edad, determinará cuándo esta función cruzará el umbral patológico, por lo tanto, cuando el riesgo de que un individuo sufra AD aparecerá [23].

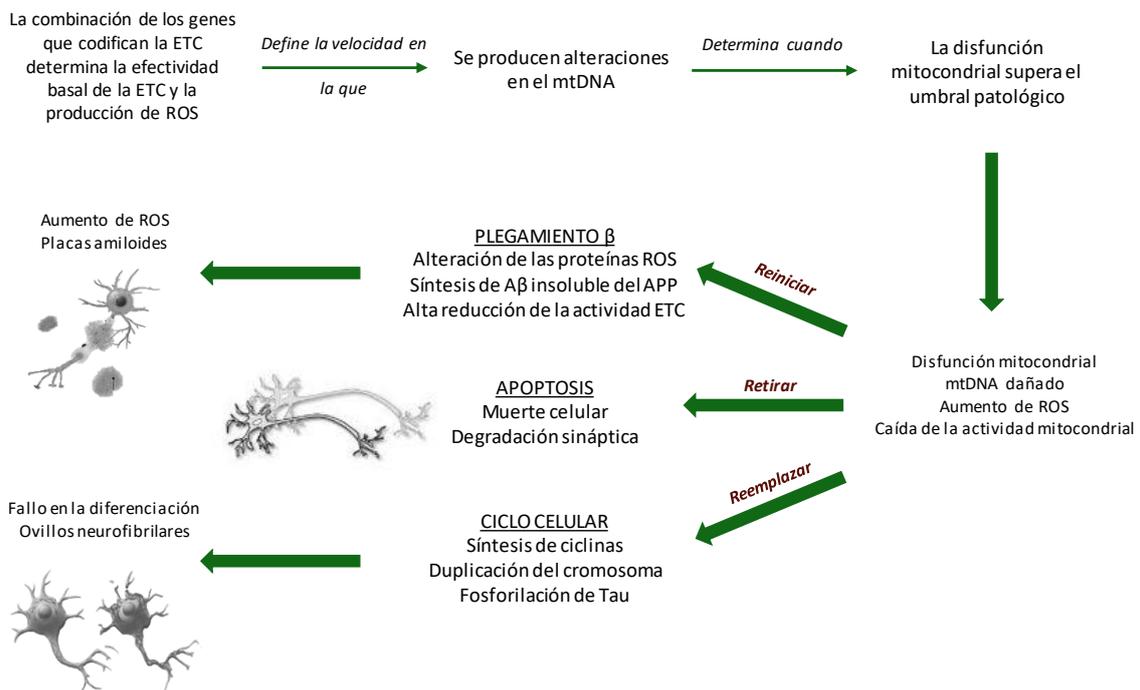
La teoría se basa, por lo tanto, en que las variaciones polifórmicas de los genes del DNA mitocondrial (mtDNA) y el DNA nuclear (nDNA), que codifican las subunidades de los complejos OXPHOS, determinan la eficiencia de este sistema y el nivel de producción basal de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se ha visto que cuando la producción de ROS es alta se daña el mtDNA, por lo que tener una producción basal de ROS elevada produce mayor daño en el mtDNA. Además, las mutaciones en el mtDNA disminuyen la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (ETC), que se manifiesta con una disminución de la fosforilación oxidativa y un aumento en la producción de ROS. Todo ello desencadena una triple respuesta compensatoria:

1. El sistema intenta "reiniciarse". La superproducción de ROS mitocondrial provoca un daño en las proteínas, que conlleva el plegamiento en lámina  $\beta$  de proteínas solubles, como el APP, a proteínas insolubles, A $\beta$ . Esto provoca una mayor disminución de la actividad de ETC. Esta actividad redox dañada cambia el sistema de oxidorreducción de la membrana plasmática celular, donde el exceso de ROS incrementa la producción de A $\beta$  extracelular y la formación de placas amiloides.
2. "Se retiran" las células disfuncionales. La apoptosis se activa cuando las células mantienen unos niveles excesivamente altos de ROS o bajos de fosforilación oxidativa.

3. “Se intenta reemplazar” la pérdida de células. La alteración de la fosforilación oxidativa mitocondrial aumenta la dependencia de las células a la glucólisis anaeróbica, iniciando la señalización hipóxica y alterando la homeostasis de ROS. En neuronas con capacidad proliferativa residual, esto proporciona una señal para la reentrada en el ciclo mitótico. El reingreso al ciclo celular finalmente falla, tal vez debido a consideraciones bioenergéticas, y se produce un fallo en la regulación de las ciclinas, en la síntesis de DNA y la fosforilación de tau, formándose los ovillos neurofibrilares. Las células pierden su viabilidad, no por su fallo para completar el ciclo celular, sino más bien por la disfunción mitocondrial subyacente que provocó la reentrada en el ciclo celular en primer lugar.

Esta triple respuesta estaría explicando los principales daños patológicos que se encuentran en los individuos que padecen la AD, como la aparición de placas amiloides extracelulares, los ovillos neurofibrilares intracelulares, la pérdida de sinapsis y muerte celular [21] (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Esquema de la hipótesis de la cascada mitocondrial. El daño mitocondrial, cuya aparición viene determinada por la ETC de cada individuo, inicia una serie de eventos compensatorios que resultan en los daños histopatológicos que caracterizan la AD.

Existen numerosas evidencias que apoyan la teoría que relaciona el sistema OXPHOS con la enfermedad de Alzheimer. Se ha visto que la actividad sistémica del complejo IV (CIV) del sistema OXPHOS esta reducida en sujetos con AD [24]. También hay estudios que relacionan la disfunción OXPHOS con un aumento de A $\beta$ , como ocurre con la inhibición de la ETC con azida sódica (un inhibidor del CIV), oligomicina [un inhibidor complejo V (CV)], carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP, un desacoplador OXPHOS) o con hipoxia (oxígeno al 2.5 %) en líneas celulares cultivadas, neuronas de embrión de pollo o astrocitos humanos. En ellos el metabolismo de A $\beta$ PP cambia de no amiloidogénico a la vía amiloidogénica aumentando los niveles de A $\beta$  [25]–[32]. Además, la hipoxia reduce los niveles ADAM10 en células de neuroblastoma SH-SY5Y [30] y la administración *in vivo* de rotenona, un inhibidor del complejo I (CI), 3-nitropropiónico, inhibidor del complejo II (CII), o de azida sódica, resultan en un aumento de los niveles de la proteína BACE1, tanto en actividad como en productos, en retina de rata madura o cerebro de ratón [33], [34].

Además, se ha observado que A $\beta$  es capaz de transportarse al interior de las mitocondrias [35] y unirse a la región N-terminal de p.MT-CO1 del CIV [36]. Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano transfectadas con A $\beta$ PP expresan mayores niveles de A $\beta$  y muestran una actividad del CIV y del consumo de oxígeno significativamente reducida [37]. Los ratones doble transgénicos para A $\beta$ PP/PS2 sobreexpresan formas mutantes de A $\beta$ PP humana y presenilina 2, un componente del complejo de la  $\gamma$ -secretasa. Las mitocondrias cerebrales de estos ratones, además, muestran una disminución de la actividad del CIV y el consumo de oxígeno [38].

Por lo que, independientemente de si los depósitos de A $\beta$  aparecen antes o después, una disfunción del sistema OXPHOS parece ser un hallazgo frecuente en muchos pacientes con AD.

## 1.2. La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo que se encuentra en prácticamente todas las células eucariotas. Este orgánulo, esencial para las células, puede diferir en número y forma de acuerdo con la demanda específica de cada tejido [39]. Sin embargo, la ultraestructura es muy característica, ya que poseen una organización de tipo general en la que se distingue la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembranoso y la matriz mitocondrial.

Por otra parte, la función mitocondrial responde dependiendo de múltiples señales celulares o ambientales como hormonas, factores de crecimiento, cambios de temperatura, actividad fisiológica, etc. Por lo tanto, la biogénesis y la función mitocondrial dependerán de complejos procesos que tienen que ser regulados con precisión de acuerdo a las diferentes condiciones fisiológicas de la célula [39],[40].

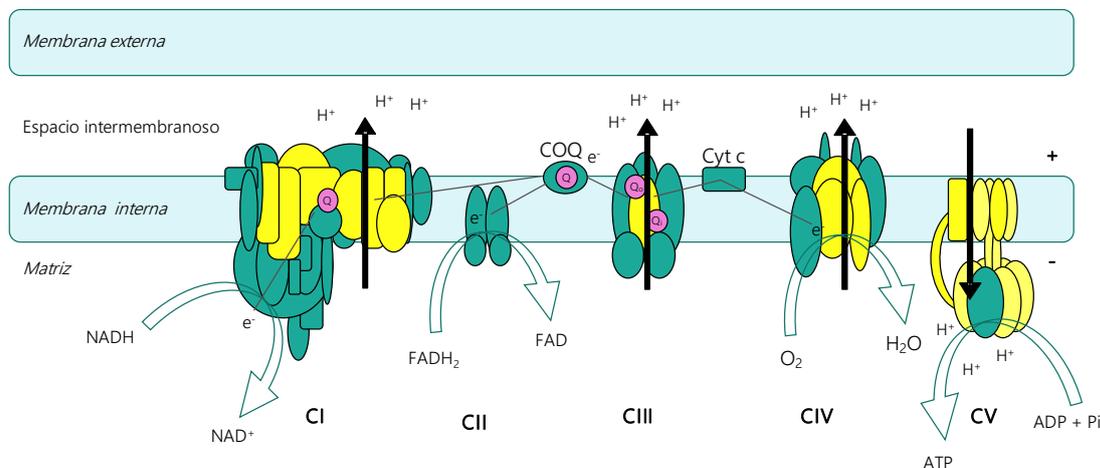
Las mitocondrias están involucradas en muchas vías metabólicas esenciales de las células, como son la biosíntesis de pirimidinas, aminoácidos, fosfolípidos, nucleótidos, ácido fólico, hemo, urea y una gran variedad de metabolitos [41]. La función principal es la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) a través del sistema OXPHOS, pero también se encarga de otras muchas como la termorregulación, la regulación de la apoptosis, la homeostasis del calcio y la producción de ROS [42].

Una de las particularidades de la mitocondria es que posee un genoma propio, el DNA mitocondrial (mtDNA). El mtDNA es circular, consta de 16.569 pares de bases y contiene información para 37 genes: 24 que participan en la síntesis de las proteínas codificadas en el propio genoma [dos rRNAs (12S y 16S) y 22 tRNAs] y 13 que codifican polipéptidos que forman parte de cuatro de los cinco complejos multienzimáticos del sistema OXPHOS. De ellos, siete polipéptidos (p.MT-ND 1-6 y p.MT-ND4L) son componentes del CI; uno (p.MT-CYB) pertenece al CIII; tres (p.MT-CO1-3) pertenecen al CIV y dos (p.MT-ATP6 y 8) pertenecen a la ATP sintasa o CV [43]. El resto de los polipéptidos componentes del sistema OXPHOS están codificados en el DNA nuclear. Por ello, la biogénesis de este sistema constituye un caso particular en la célula, ya que para su síntesis se requiere la expresión coordinada de los dos sistemas genéticos celulares.

El mtDNA presenta una serie de características propias que lo diferencian del nDNA. Presenta un alto número de copias por células, la mayor parte de los tejidos contienen entre 1000 y 10000 copias por células, con 2 a 10 moléculas de DNA por mitocondria. Además, el mtDNA se hereda exclusivamente por vía materna [44]. Otra de las características llamativas del mtDNA es la organización extremadamente compacta de los genes que codifica. Los genes se encuentran unos a continuación de los otros sin nucleótidos intermedios ni intrones, además, presenta un código genético que difiere del universal [45]. Por último, el mtDNA es muy vulnerable y presenta una tasa de mutación espontánea 10-20 veces superior a la del nDNA.

### 1.3. Sistema OXPHOS

El sistema OXPHOS es el encargado de la producción de ATP dentro de las mitocondrias y se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial. El sistema OXPHOS está compuesto por la cadena de transporte de electrones (ETC) y la ATP sintasa [46], [47]. La ETC incluye los complejos respiratorios I, II, III y IV y dos transportadores móviles de electrones, el citocromo c, *cyt c*, y la coenzima Q, CoQ. La transferencia de energía ocurre como resultado del paso de electrones a través de los complejos respiratorios [46] (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Representación esquemática del sistema OXPHOS. En la imagen se observan los complejos de la cadena de transporte de electrones CI, CII, CIII, CIV y la ATP sintasa (CV). Las flechas perpendiculares señalan la dirección de salida de los protones al espacio intermembranoso y de entrada por el canal protónico de la ATP sintasa. Se dibuja también la línea que marca el paso de electrones a través de los complejos. *Imagen tomada de Khan Academy.*

El NADH y FADH<sub>2</sub> generados por el metabolismo catabólico de las células constituyen los sustratos requeridos para la producción de energía. Estos ceden sus electrones al CI (oxidación del NADH) y CII (oxidación del FADH<sub>2</sub>) de la ETC. De aquí, los electrones son transportados a lo largo de los complejos respiratorios hasta el oxígeno, que es reducido para producir agua como producto final. La energía liberada por los electrones en la cadena respiratoria es usada para el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, a través de los complejos I, III y IV. Este bombeo produce un gradiente electroquímico que es aprovechado por la ATP sintasa para sintetizar ATP [48]. Parte de la energía producida por el transporte de electrones se libera en forma de calor y una fracción de los electrones reacciona tempranamente con el oxígeno produciendo especies de oxígeno reactivas [49].

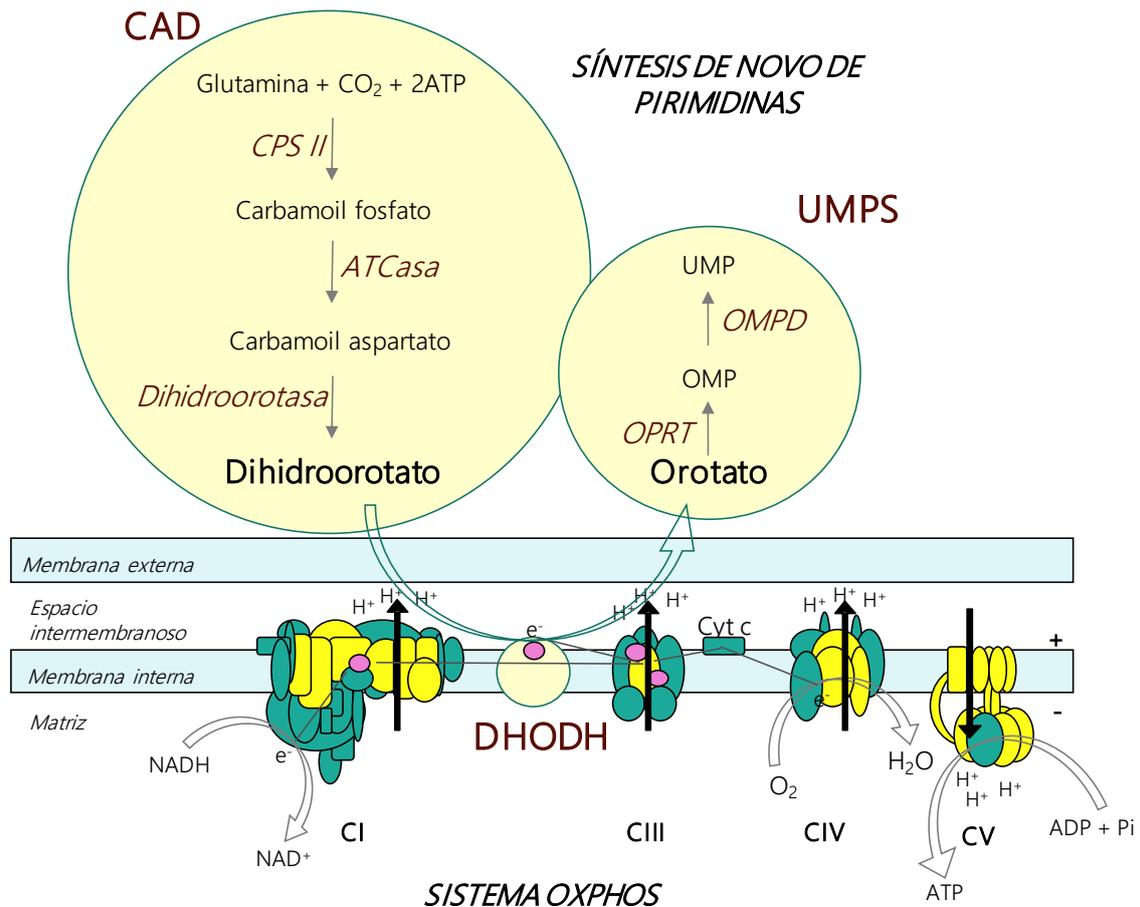
## **1.4. Síntesis de pirimidinas**

Los nucleótidos de pirimidina son los precursores en la síntesis de numerosos compuestos como son los ácidos nucleicos, glicoproteínas, glicolípidos y fosfolípidos. Estos nucleótidos pueden obtenerse reciclándose por la ruta de salvamento o sintetizándose *de novo*. En el último caso, la enzima dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) oxida dihidroorotato para dar orotato transfiriendo directamente electrones a la cadena respiratoria mitocondrial a través del coenzima Q<sub>10</sub> o ubiquinona.

La ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas es, por lo tanto, una de las vías en la que la mitocondria tiene un papel fundamental. Como consecuencia, un daño en el sistema OXPHOS podría afectar a la síntesis de estas.

### **1.4.1. Síntesis *de novo* de pirimidinas**

La síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina comienza con ATP, glutamina y bicarbonato. La completa conversión de estos sustratos a uridina tan solo requiere tres genes y seis actividades enzimáticas, lo que se logra mediante la fusión de múltiples actividades enzimáticas en una sola cadena polipeptídica [50], [51] (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Representación esquemática de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. En la imagen se presentan los tres primeros pasos de la ruta catalizados por la enzima multifuncional CAD (CPS II, ATCasa y dihidroorotasa); el cuarto paso, con la DHODH localizada en la membrana interna de la mitocondria y que conecta esta ruta con el transporte de electrones del sistema OXPHOS; y el último catalizado por la UMPS (OPRT y OMPD).

Los tres primeros pasos en la síntesis *de novo* de pirimidinas son catalizados por una enzima citoplasmática trifuncional denominada CAD. Acrónimo que viene dado por el nombre de las tres actividades de la proteína, carbamoil fosfato sintasa II (CPS II), aspartato transcarbamoilasa (ATCasa) y dihidroorotasa. El producto de CAD, dihidroorotato (DHO), difunde al interior de la mitocondria, donde se convierte en orotato (O) por la acción de la DHODH. De nuevo, en el citoplasma la UMP sintasa (UMPS) cataliza los dos últimos pasos de la ruta a uridina monofosfato (UMP).

La importancia de esta vía en células mitóticas, en las que se intenta cumplir con la demanda de precursores de ácido nucleicos, se apoya en varios hallazgos. En primer lugar, la suplementación de uridina restaura la tasa de crecimiento en fibroblastos de pacientes con deficiencia del coenzima Q<sub>10</sub> [52]. Segundo, en concentraciones de oxígeno por debajo del 1 %, la uridina aumenta el número de células tumorales [53]. Y tercero, teniendo en cuenta que el

oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, las células rho<sup>0</sup>, sin DNA mitocondrial y ninguna cadena respiratoria funcional, son auxótrofos para pirimidina y requieren uridina para el crecimiento [54].

La inhibición de la cadena respiratoria por inhibidores del CIII, como la antimicina A o mixotiazol, da lugar a una disminución significativa en la cantidad total de pirimidina [55], [56] y la inhibición del CIV por óxido nítrico inhibe indirectamente la actividad de DHODH. Esta inhibición se correlaciona con una disminución en la síntesis de orotato. La producción de orotato también se disminuye con el cianuro, otro inhibidor de CIV [57]. Por otra parte, la uridina protege los fibroblastos de pacientes con AD y células progenitoras neuronales humanas normales (NHNP) frente a la toxicidad de la azida [58] [59].

A diferencia de las células mitóticas, generalmente se considera que la actividad de la ruta *de novo* es baja en células no mitóticas y totalmente diferenciadas, ya que la demanda de precursores de ácido nucleico es menor [60].

#### **1.4.1.1. CAD**

Toda la actividad de la enzima CAD se sitúa en el citoplasma. El primer paso es convertir el bicarbonato, glutamina y ATP en carbamoil fosfato a través de la CPS II. La ATCasa lo convierte en carbamoil aspartato, que da dihidoorotato con la acción de la dihidroorotasa.

La CPS II cataliza la etapa limitante de la velocidad en esta ruta, ya que está sujeto a una inhibición por retroalimentación por uridina trifosfato (UTP) y se activa mediante fosforribosil pirofosfato (PRPP). En estudios sobre las señales implicadas en la regulación de CAD se ha observado una disminución rápida de la actividad de CPS II durante la apoptosis. De hecho, existen dos sitios de escisión de caspasa-3 dentro del dominio CPS II [50]. Además, en paralelo con la pérdida de actividad de CAD, se produce una disminución rápida de pirimidinas en las células apoptóticas [61].

En relación con la CAD existe un trastorno congénito de glicosilación tipo IZ (CDIZ) que es causado por mutaciones bialélicas en el gen CAD. Esto causa una alteración en la incorporación de aspartato en la ruta de vía de síntesis *de novo* y una disminución de CTP, UTP y azúcares activados implicados en la glicosilación. En este trastorno multisistémico se produce un defecto en la biosíntesis de glicoproteínas que causa glicoproteínas séricas subglicosiladas y que da lugar a varias características clínicas como defectos en el desarrollo del sistema nervioso, retraso psicomotor, características dismórficas, hipotonía, trastornos de la coagulación e

inmunodeficiencia. En el estudio de este trastorno se ha observado que la suplementación de uridina puede revertir los síntomas y, por lo tanto, puede usarse como potencial terapia [62].

#### **1.4.1.2. DHODH**

El cuarto paso de la ruta es catalizado por la enzima dihidroorotato deshidrogenasa. Esta enzima está localizada en la membrana interna de la mitocondria y se trata de una flavoproteína (FMN). En paralelo con la oxidación de dihidroorotato a orotato, DHODH cataliza la reducción de ubiquinona en la membrana mitocondrial interna [50]. La enzima tiene dos sitios de unión. El sustrato DHO se une al primer sitio y se oxida a través de un aceptor de electrones, el cofactor FMN que se reduce a FMNH<sub>2</sub>. Después de la liberación de orotato, la ubiquinona se une al segundo sitio y recibe un electrón de FMNH<sub>2</sub>. Por lo tanto DHODH representa un enlace funcional entre la cadena respiratoria y la síntesis *de novo* de pirimidinas [63] [64].

Bajo determinadas situaciones, cuando se produce una sobreexpresión de CAD, la DHODH se convierte en la etapa limitante en la síntesis de nucleótidos de pirimidina. Por ello, es en muchas ocasiones la proteína diana para tratamientos como potencial antiinflamatorio, inmunosupresor y antiproliferativo.

Al igual que CAD, se ha visto que una disminución en la función de la enzima DHODH, por la inhibición del CIII, produce un daño en la síntesis *de novo* que acaba induciendo la apoptosis celular [65]. Además una depleción de DHODH puede provocar una disfunción mitocondrial, parada del ciclo celular y un aumento de los niveles de ROS, daños ampliamente descritos en la hipótesis de la cascada mitocondrial [66].

#### **1.4.1.3. UMPS**

Los dos últimos pasos de la síntesis *de novo* de pirimidinas ocurren en el citoplasma. La UMPS es una enzima bifuncional que incluye la orotato fosforribosil transferasa (OPRT) y la orotidina monofosfato descarboxilasa (OMPD). OPRT, localizada en el dominio N-terminal de la proteína, cataliza la transferencia de PRPP del orotato a la orotidina monofosfato (OMP). Y OMP, localizada en la región C-terminal, da el producto final de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas, la uridina monofosfato (UMP) [67]. UMPS además de ser la encargada del paso final de la ruta, también participa en la recuperación de orotato [51].

UMP es el precursor para todos los demás nucleótidos de pirimidina. Las correspondientes formas di y trifosforiladas de uridina, UDP y UTP, se forman por la acción de UMP/CMP quinasa y nucleósido difosfato quinasa, y son necesarias para la posterior síntesis de UDP-azúcar. UTP también proporciona el punto de entrada para la síntesis del otro nucleótido principal de pirimidina, citidina trifosfato (CTP). Citidina monofosfato (CDP), como UDP, se convierte en el derivado del desoxirribonucleótido por la acción de la ribonucleótido reductasa, que es necesaria para la síntesis de polímeros de DNA en crecimiento. Por otro lado, los nucleótidos de pirimidina se incorporan directamente en las cadenas de RNA y son los precursores de una serie de importantes procesos biosintéticos [50].

#### **1.4.2. Ruta de salvamento de pirimidinas**

En las células de mamíferos, además de la vía *de novo* para la síntesis de pirimidinas, existe también la ruta de salvamento, un proceso que requiere el transporte facilitado y la posterior fosforilación de uridina y citidina para formar UMP y CMP, respectivamente [68].

Diferentes transportadores de membrana son responsables del paso de los nucleósidos. Una vez dentro de la célula, la uridina/citidina quinasa (UCK) fosforila uridina o citidina. Existen al menos dos isozimas de esta proteína, UCK1 y UCK2, que cataliza este evento, además de la fosforilación de numerosos análogos de uridina y citidina [69]. Los estudios sugieren que UCK se regula en respuesta a factores de crecimiento y aumenta marcadamente en varias líneas de células tumorales [70].

En células altamente diferenciadas, la dependencia de la vía *de novo* es más reducida y en comparación, en células completamente diferenciadas como los cardiomiocitos y el tejido del músculo esquelético, la utilización de la vía de rescate excede la de la vía de síntesis *de novo* [71].

##### **1.4.2.1. UCK2**

La enzima UCK es la enzima responsable del primer paso de la ruta de salvamento de pirimidinas, además de ser la limitante. Su acción produce CMP y UMP, que a su vez son potentes inhibidores por retroalimentación de la uridina/citidina quinasa. Se señalan dos tipos de UCK, UCK1 (277 aminoácidos) y UCK2 (261 aminoácidos) [69]. Y aunque las dos formas comparten alrededor del 70 % de su secuencia, el papel fisiológico exacto de la UCK1 todavía es desconocido, mientras que la UCK2 es la responsable de la mayor parte de la fosforilación de uridina y citidina en células.

## 1.5. Nucleótidos de pirimidina como precursores

### 1.5.1. Síntesis de CTP

En la vía *de novo*, la conversión de uridina en nucleótidos de citidina se logra mediante la enzima, altamente regulada, CTP sintetasa [72], [73]. Enzima cuya actividad se ha demostrado que es sustancialmente más alta en las células tumorales [74].

La síntesis de CTP es esencial para una serie de procesos biosintéticos [73]. Como son la síntesis CTP dependiente de fosfatidilcolina (PC) y lípidos derivados de esta molécula. Además, los lípidos derivados de esta ruta son esenciales para la incorporación de fructosa y manosa en los precursores de GDP-azúcar. El conjunto de CTP libre es normalmente el más pequeño de los nucleótidos trifosforilados, y los datos sugieren que los cambios en los niveles de este nucleótido pueden tener una influencia significativa en la regulación de la proliferación celular [75]. Estudios recientes que usan inhibidores de la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas, como leflunomida, o privan de uridina células que carecen de una proteína CAD funcional (G9c), respaldan la importancia de este nucleótido en la progresión del ciclo celular [76].

### 1.5.2. Síntesis de UDP-azúcar y glicosilación

Los nucleótidos de uracilo son esenciales para la síntesis de azúcares activados tales como uridina difosfato-glucosa, UDP-glucosa, y UDP-N-acetilglucosamina, UDP-GlcNAc [77]. Los nucleótidos de glucosa se sintetizan en el citosol y se transportan al retículo endoplásmico o al aparato de Golgi, donde se utilizan para reacciones de glicosilación. UDP-glucosa se origina de la acción de la UDP-glucosa pirofosforilasa en UTP y glucosa 1-fosfato, y es el precursor de una variedad de derivados de UDP-azúcar, incluyendo UDP-galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ácido idurónico, etc. [77], [78]. En última instancia, estos compuestos se utilizan para la síntesis de disacáridos y polisacáridos complejos como el glucógeno en células de mamíferos. UDP-GlcNAc se sintetiza mediante la ruta de la hexosamina y se requiere para la glicosilación de proteínas y la unión de análogos de glicosilfosfatidilinositol. Por lo tanto, la disponibilidad de nucleótidos de uracilo podría afectar a estos importantes procesos biosintéticos. Estudios recientes muestran que la síntesis reducida de UDP-GlcNAc influye tanto en la progresión del ciclo celular como en la susceptibilidad a la apoptosis [79]. Los nucleótidos de citidina también son necesarios para la modificación postraduccional de las proteínas y la síntesis de CMP-N-acetilneuramínico (CMP-NANA) que es esencial para la sialilización de proteínas [80], [81].

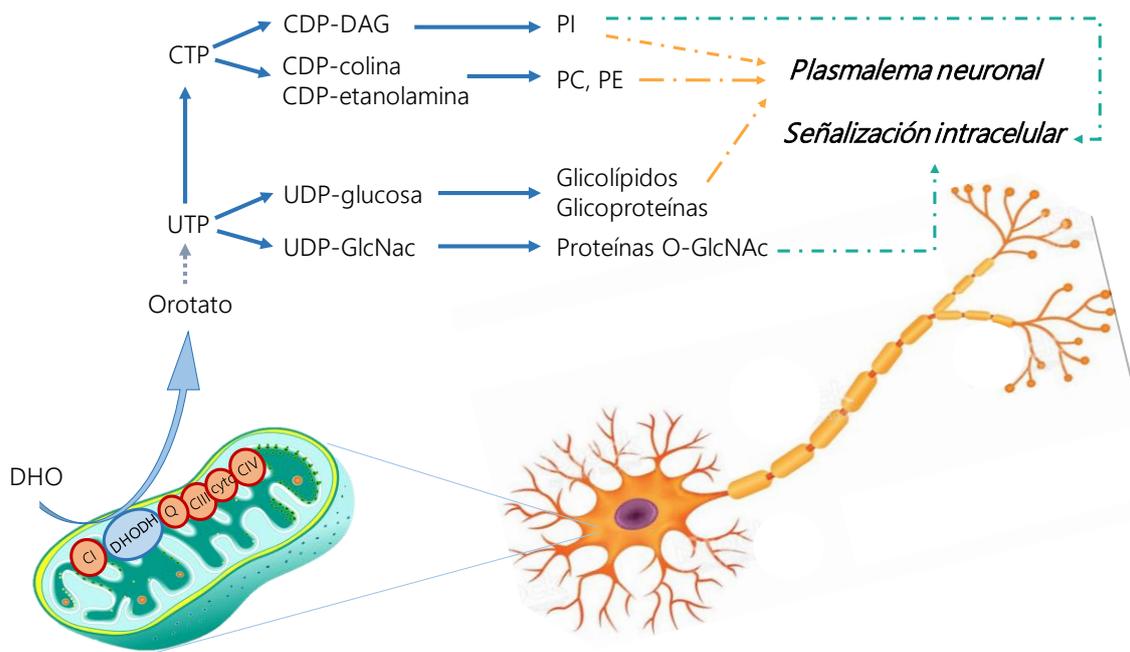
Aunque la existencia de grupos de nucleótidos distintos ha sido debatida [75], hay pruebas de que el origen del nucleótido puede desempeñar un papel en el dictado de su destino. Se ha visto que las pirimidinas incorporadas en UDP-azúcar se producen principalmente a partir de la vía de síntesis *de novo*, mientras que las derivadas de la vía de salvamento se destinan principalmente a la síntesis de RNA [78]. Estudios adicionales han apoyado la canalización de UTP derivados de orotato en la formación de UDP-azúcar en hepatocitos de rata [82], [83]. Por el contrario, se ha demostrado que el aumento, en los linfocitos T, inducido por mitógenos de nucleótidos de pirimidina o UDP-glucosa se produce tanto por las vías *de novo* como de salvamento [84].

### **1.5.3. Síntesis de RNA y DNA**

La síntesis de pirimidina es necesaria para la formación de RNA y DNA. UTP y CTP se incorporan directamente en las cadenas de RNA en crecimiento, mientras que las bases para la síntesis de DNA se derivan de los correspondientes desoxirribonucleótidos (dTTP y dCTP). La conversión de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos se produce a nivel de UDP y CDP y se cataliza mediante la ribonucleótido reductasa, la enzima limitante de la síntesis de DNA [51]. dCDP se convierte en dCTP en un solo paso por la nucleósido difosfato quinasa, mientras que el metabolismo de dUDP a dTTP requiere un mínimo de cuatro pasos adicionales. Una vez formado, dTTP y dCTP proporcionan los sustratos para la polimerización del DNA.

### **1.5.4. Síntesis de fosfatidilcolina**

PC es el lípido más abundante en células eucariotas. Además de su papel en la síntesis de membranas, proporciona el reservorio de numerosos derivados de lípidos, incluyendo lisofosfatidilcolina, ácido fosfatídico, diacilglicerol, ácido lisofosfatídico, factor activador de plaquetas y ácido araquidónico [73]. Estos derivados también tienen papeles importantes como segundos mensajeros y de ese modo influyen en múltiples procesos de señalización celular (Figura 1.8). Aunque hay dos vías establecidas por las cuales se puede sintetizar PC, en los mamíferos la ruta CDP-colina es la ruta principal de síntesis. Esta es iniciada por la CTP sintetasa, la enzima que convierte el UTP en CTP a través de una reacción de glutaminación dependiente de ATP. Se ha demostrado que la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de PC, CTP:fosfocolina citidiltransferasa, está regulada por la concentración de CTP en las células [85], [86]. Por lo tanto, la biosíntesis de PC y los fosfolípidos posteriores derivados de lípidos es absolutamente dependiente de la síntesis de CTP en mamíferos.



**Figura 1.8.** Representación esquemática de la utilización de los diferentes productos obtenidos a partir del UTP sintetizado en la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas. CDP-diacilglicerol (CDP-DAG), CDP-colina, CDP-etanolamina, UDP-azúcar, UDP-N-Acetilglucosamina (UDP-GlcNac), fosfoetfosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y proteínas O-GlucoNAcetiladas.

Por otro lado, la inhibición de la síntesis de PC es suficiente para provocar la detención del ciclo celular y la apoptosis [87]. Hay una inactivación rápida de la síntesis de PC durante la apoptosis, lo que sugiere que el desacoplamiento de este proceso es parte del programa de muerte celular [61]. Previsiblemente, la síntesis de PC es uno de los puntos finales esenciales relacionados con la ruta de las pirimidinas que influye en la viabilidad y el destino de las células.

## 1.6. Plasmalema neuronal

Los procesos mentales dependen de las redes neuronales, que dependen de las conexiones entre las neuronas, es decir, sinapsis, establecidas a través de sus superficies formadas por sus membranas plasmáticas. Las membranas plasmáticas de las neuronas (plasmalema) tiene normalmente un área de aproximadamente  $250,000 \mu\text{m}^2$ , mientras que la superficie de una célula esférica con un diámetro de  $20 \mu\text{m}$  asciende a solo  $1,256 \mu\text{m}^2$ . Una neurita de  $1 \mu\text{m}$  de diámetro que se alarga a  $0,5 \text{ mm}$  por día debe expandir su superficie a una velocidad de aproximadamente  $1 \mu\text{m}^2$  por minuto. Por lo tanto, la formación de axones y dendritas y el mantenimiento de la superficie neuronal requiere una síntesis de membrana continua [88].

En la AD, la pérdida neuronal es precedida por una pérdida de sinapsis [89]. Esta pérdida se ha relacionado con alteraciones en la composición y la estructura de membranas neuronales. De hecho, los fosfolípidos son significativamente más bajos en ratones doble trasgénicos para A $\beta$ PP/PS1 que sobreexpresan formas mutantes de A $\beta$ PP humano y presenilina 1, un componente del complejo  $\gamma$ -secretasa [90]. La fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina (PE), los fosfolípidos más abundantes en las neuronas, se encuentran disminuidos en las muestras cerebrales de pacientes con AD [91] [92], [93].

PC y PE se sintetizan a través de las vías de citidina difosfato, (CDP)-colina y CDP-etanolamina, y requieren CTP. CTP:fosfocolina/fosfoetanolamina citidiltransferasas (CCT) catalizan los pasos limitantes de las rutas de biosíntesis de PC y PE. Sus bajas afinidades por CTP sugieren que la actividad de estas enzimas y la tasa de síntesis de fosfolípidos depende en gran medida de la concentración celular de CTP [94], [95]. El vínculo entre la síntesis *de novo* de CTP y la función OXPHOS podría explicar que la inhibición del CIV por azida sódica afecte a la formación de extensiones de membrana plasmática en las células del linaje de oligodendrocitos de rata [96]. Por otro lado, en células de rata de feocromocitoma PC12 desacoplantes, como el CCCP y dinitrofenol (DNP), aumentan la producción CDP-colina [97]. Los desacoplantes mitocondriales aumentan el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria [98], facilitando así la actividad de DHODH al suministrar su aceptor de electrones, el coenzima Q<sub>10</sub> oxidado. Se ha demostrado que DNP estimula el crecimiento de neuritas, y por lo tanto la extensión de la membrana plasmática, en cultivos de neuronas corticales y del hipocampo de embriones de rata. Este compuesto también promueve la neuritogénesis y la diferenciación neuronal en el neuroblastoma de ratón, en la línea celular Neuroblastoma 2a y células madre embrionarias [99], [100].

En células de feocromocitoma PC12 de rata y de neuroblastoma humano LAN-5 y SH-SY5Y, la uridina o citidina exógena mejoran la diferenciación celular, como lo demuestra el crecimiento de neuritas (aumento del número de neuritas por célula, ramificación de neuritas, neurofilamentos de neurita y cantidad de fosfolípidos) [59][101]–[105]. Las secciones de núcleo estriado de rata incubadas con citidina muestran un aumento en la síntesis de PC y PE [106]. La suplementación de uridina o citidina a jerbos, cobayas, ratones y ratas aumenta los niveles en cerebro de fosfolípidos y neurofilamentos en neuritas, y una mayor complejidad dendrítica y densidad de la columna de las células piramidales de la capa V en el cerebro de rata [101], [107], [116]–[118], [108]–[115]. Células cultivadas con un inhibidor del CIII muestran una disminución significativa en la cantidad total de UDP-glucosa [55].

## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La enfermedad de Alzheimer se trata de un proceso neurodegenerativo crónico y progresivo del que, a pesar de todas las teorías e hipótesis, la causa exacta aún resulta desconocida. Por el momento la aparición de la enfermedad se asocia a diversos factores, pero el factor de riesgo más importante es la edad, más aún cuando las sociedades occidentales están envejeciendo tan rápidamente. Desafortunadamente los fármacos disponibles por el momento solo sirven para retrasar la aparición de los síntomas o ralentizar levemente su progresión. El empleo de nuevas terapias es urgente en esta enfermedad que por el momento es incurable. El desarrollo de un tratamiento eficiente solo se logrará comprendiendo completamente la etiología de la enfermedad. La identificación de los grupos de riesgo también supondrá un gran avance para el correcto tratamiento.

Pese a que las neuronas son células completamente diferenciadas, sus requerimientos de pirimidinas, para mantener y reparar la extensa membrana plasmática que compone sus neuritas, hacen suponer que la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas necesita estar activa en el cerebro humano adulto. Esta ruta está conectada con el sistema OXPHOS, a través de la enzima DHODH, y se ha visto que los pacientes con AD muestran daños mitocondriales antes que los demás síntomas. Por ello, nuestra hipótesis propone que un daño en el sistema OXPHOS conlleva a un daño en la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas y como consecuencia en la viabilidad neuronal.

## **Objetivos**

1. Confirmación de la presencia de la ruta de síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas en cerebro humano adulto. Para ello se determinará si el mRNA y la proteína DHODH se encuentran en cerebro adulto, si la enzima está activa y en que células en particular del tejido cerebral se localiza.
2. Estudio de la funcionalidad de la ruta de síntesis *de novo* y la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidinas en pacientes con AD. Para ello, se compararán los niveles de expresión de los mensajeros de las enzimas DHODH, de la ruta de síntesis *de novo*, y UCK2, de la ruta de salvamento, en diferentes regiones cerebrales de pacientes con distintos grados de la enfermedad y con respecto a cerebros de individuos sanos.
3. Caracterización de la conexión entre el sistema OXPHOS y la producción de pirimidinas en pacientes con AD. Para ello, se analizarán las diferencias en los valores de expresión del mensajero de una de las subunidades del complejo IV del sistema OXPHOS, estudiando como se modifican según el grado de enfermedad y como se correlacionan con los niveles de mRNA de los genes participantes en la obtención de nucleótidos de pirimidinas (*DHODH* y *UCK2*).
4. Analizar la conexión entre el sistema OXPHOS y la síntesis de nucleótidos de pirimidinas en un modelo celular. Utilizando la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y como modelo, estudiaremos como se afecta la formación de neuronas por un deterioro en el sistema OXPHOS y, por tanto, en la ruta de biosíntesis de pirimidinas, y como se podría evitar este daño administrando el producto final de la ruta, la uridina.

## ***RESULTADOS Y DISCUSIÓN***



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Estudio de la ruta de biosíntesis *de novo* de pirimidinas en cerebro humano adulto

##### 3.1.1. Expresión de mRNAs

##### 3.1.1.1. Revisión de bases de datos

Pese a las teorías de como suplen los tejidos no replicativos sus requerimientos de nucleótidos, son muchas las especies que expresan mRNA de DHODH en el tejido cerebral. En la base de datos Expression Atlas podemos encontrar numerosos estudios de RNA-Seq en cerebro, donde se observa la presencia de, no solo mRNA de DHODH, sino de las otras dos enzimas que completan la ruta, CAD Y UMPS. Estos mensajeros se pueden encontrar tanto en primates y otros mamíferos placentarios y marsupiales, como en aves y anfibios (Tabla 3.1). Al recopilar toda esta información, se observa como el número de transcritos por millón (TPM) entre los diferentes genes de la ruta de síntesis *de novo* no son muy diferentes. Lo mismo ocurre al compararlos con los niveles de mRNA de una de las enzimas de la ruta de salvamento, UCK2.

**Tabla 3.1.** Niveles de mRNA para las enzimas de la ruta de síntesis *de novo* (CAD, DHODH y UMPS) y de salvamento (UCK2) de pirimidinas en cerebro de diferentes especies. Los números indican los transcritos del gen en particular por millón de transcritos (TPM).

	Especie	CAD	DHODH	UMPS	UCK2
<b>Mamíferos placentarios</b>	<i>Chlorocebus sabaues</i>	4-32	1-10	6-24	5-18
	<i>Macaca Mulatta</i>	14-15	14-18	6	16-29
	<i>Papio anubis</i>	8-13	5-9	9-14	13-32
	<i>Rattus norvegicus</i>	4-11	4-6	22-34	11-26
	<i>Mus musculus</i>	6-27	6-10	11-30	13-71
	<i>Equus caballus</i>	6	7	53	26
	<i>Bos taurus</i>	8-9	-	6	42
	<i>Ovis aries</i>	1	4	4	7
<b>Mamíferos marsupiales</b>	<i>Monodelphis domestica</i>	23	32	39	22
<b>Aves</b>	<i>Gallus gallus</i>	8-9	6-10	8-12	62-79
<b>Anfibios</b>	<i>Xenopus tropicalis</i>	33	25	18	12

Mediante una segunda técnica, hibridación *in situ*, se detectó la presencia de mRNA para la enzima DHODH en hipocampo, corteza cerebral y neocortex de rata adulta (Gerlach et al. 2011). En este estudio, además de abordar la segunda enzima de la síntesis *de novo* de pirimidinas, también se estudió CAD y UMPS [119].

La presencia de mRNAs de CAD, DHODH y UMPS en cerebro de especies tan diferentes como mamíferos y anfibios, sugiere que también debería estar presente en otros animales como los humanos. En la base de datos *The Human Protein Atlas* se muestra que en la corteza cerebral hay expresión de las tres enzimas: CAD, 5,7 TPM; DHODH, 10,6 TPM; UMPS, 2,4 TPM.

Los valores mostrados en *The Human Protein Atlas* no van respaldados con un acceso al estudio en el que se obtuvieron, por lo que se desconoce la edad o el cuadro clínico de los individuos. Sin embargo, en la base de datos de *Expression Atlas* sí que se puede acceder al estudio del que provienen los datos. De este modo se realizó una revisión de los datos sobre la presencia de mRNA en diferentes regiones de cerebro humano adulto, observándose que los datos de diferentes estudios, genes o regiones cerebrales muestran niveles de mRNA comparables (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** Número de transcritos por millón (TPM) en diferentes regiones de cerebro humano adulto de cuatro estudios diferentes. F: individuos de sexo femenino; M: individuos con sexo masculino. La edad viene dada en años.

<i>Region Cerebral</i>	<b>CAD</b>	<b>DHODH</b>	<b>UMPS</b>	<b>UCK2</b>	<b>GAPDH</b>	<b>Sexo-Edad</b>	<b>Estudio</b>
<i>Amígdala</i>	1	6	11			F60, F76	68 Fantom
<i>Cerebro</i>	1	4	7			M18	68 Fantom
<i>Meninges</i>	1	2	8			F82	68 Fantom
<i>Núcleo caudado</i>	3	3	13			F60, F76	68 Fantom
<i>Cerebelo</i>	-	1	11			F60, F76	68 Fantom
<i>Diencéfalo</i>	0.7	4	12			M26(29)	68 Fantom
<i>Tálamo dorsal</i>	1	4	11			F60, F76	68 Fantom
<i>Dura madre</i>	2	4	13			F59	68 Fantom
<i>Globus pallidus</i>	2	5	11			F60, F76	68 Fantom
<i>Formación hipocampal</i>	2	4	10			F60, F76	68 Fantom
<i>Locus cerúleo</i>	1	4	9			F60, F76	68 Fantom
<i>Medula oblongada</i>	0.9	5	10			F60, F76	68 Fantom
<i>Giro frontal medio</i>	1	3	7			F60, F76	68 Fantom
<i>Giro temporal medio</i>	2	3	11			F60, F76	68 Fantom
<i>Cortex occipital</i>	2	4	10			F60, F76	68 Fantom
<i>Lóbulo occipital</i>	3	3	8			M27	68 Fantom
<i>Aparato olfatorio</i>	1	3	8			F87	68 Fantom
<i>Lóbulo parietal</i>	0.9	3	9			F60, F76	68 Fantom
<i>Glándula pineal</i>	1	3	11			F60, F76	68 Fantom
<i>Glándula pituitaria</i>	0.9	3	14			F60, F76	68 Fantom
<i>Putamen</i>	3	4	12			F60	68 Fantom
<i>Médula espinal</i>	3	3	13			F60, F76	68 Fantom
<i>Substantia nigra</i>	0.5	1	8			F60, F76	68 Fantom
<i>Cerebro</i>	5 10	2 2	2 6	10 9	1322 894	F77 M66	illumina Encode
<i>Cerebelo</i>	20	5	7	23	1484	F, M	Kaessmann
<i>Lóbulo frontal</i>	17	5	5	15	2332	F, M	Kaessmann
<i>Cortex prefrontal</i>	10	3	5	16	1891	M	Kaessmann
<i>Lóbulo temporal</i>	20	4	4	12	2975	M	Kaessmann

### 3.1.1.2. Análisis de los niveles de mRNA mediante RT-qPCR

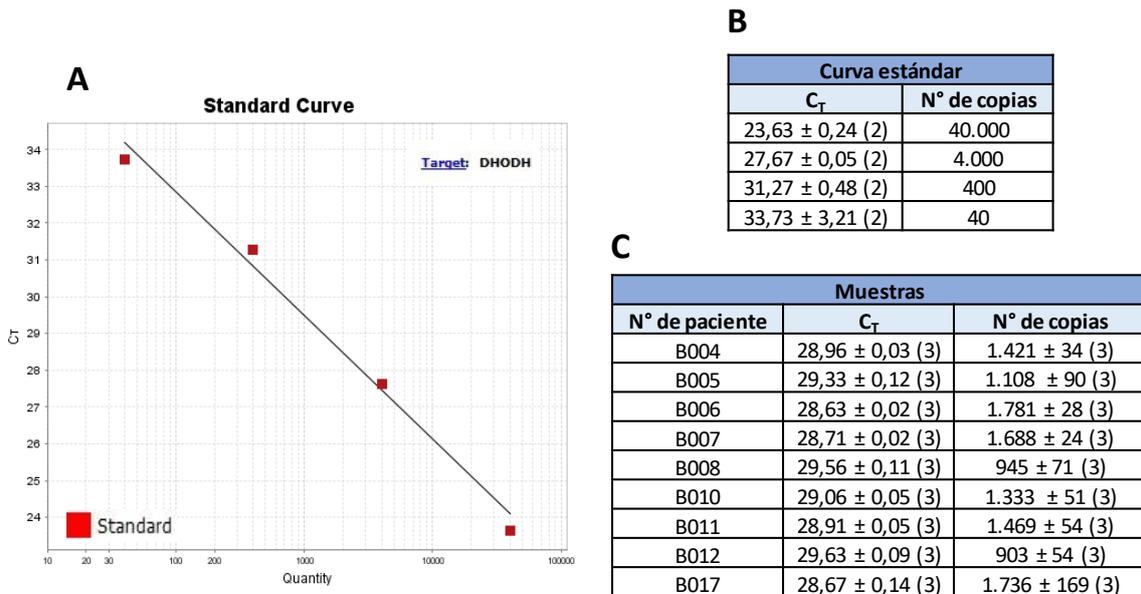
Para cuantificar el nivel de mRNA de DHODH en cerebro humano adulto se utilizó una tercera técnica, RT-qPCR. Con el objetivo de comparar las dos rutas de la síntesis de nucleótidos de pirimidina, además del mRNA para la enzima DHODH, se estudió el de la enzima UCK2. En primer lugar, se puso a punto la técnica y se verificó la expresión de mRNA de DHODH y UCK2 en cerebro humano. Con el fin de obtener un valor absoluto en número de copias, se creó un plásmido para los genes *DHODH* y *UCK2*. Una vez sintetizados los plásmidos y puesto a punto una curva estándar se repitieron los análisis de expresión (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Niveles de mRNA de DHODH y UCK2 en corteza entorrinal de individuos sanos. Se muestran las medias  $\pm$  su desviación estándar de los valores absolutos, en número de copias, que le corresponde al ciclo de amplificación ( $C_T$ ) para DHODH (A) y UCK2 (B). Los números de copias están normalizados por 10 ng de RNA. Individuos: B201: mujer, 83 años, PM de 5 h; B202: mujer, 47 años, PM: 9 h; B203: mujer, 48 años, PM: 14 h 30 min.

DHODH					A
Curva estándar		Muestras			
$C_T$	Nº de copias	Individuo	$C_T$	Nº de copias	
23,58 $\pm$ 0,19 (2)	40.000	B201	27,69 $\pm$ 0,40 (3)	1.925 $\pm$ 592 (3)	
26,97 $\pm$ 2,47 (2)	4.000	B202	28,31 $\pm$ 0,03 (3)	1.164 $\pm$ 32 (3)	
29,43 $\pm$ 0,04 (2)	400	B203	28,47 $\pm$ 0,15 (3)	1.032 $\pm$ 120 (3)	

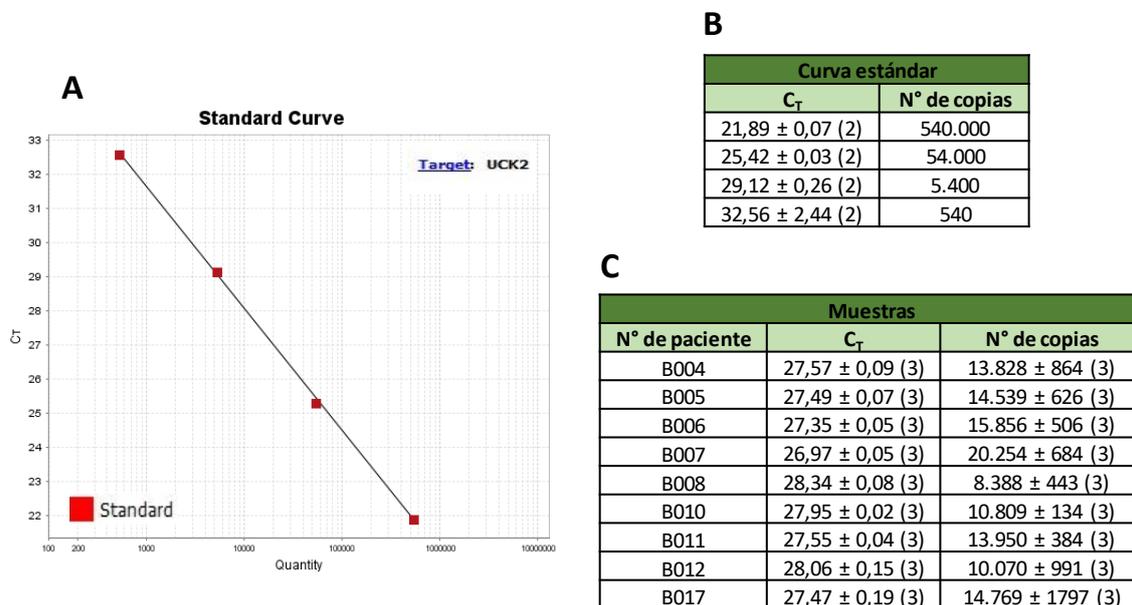
UCK2					B
Curva estándar		Muestras			
$C_T$	Nº de copias	Individuo	$C_T$	Nº de copias	
20,70 $\pm$ 0,03 (2)	540.000	B201	25,67 $\pm$ 0,62 (3)	17818 $\pm$ 7645 (3)	
24,19 $\pm$ 2,51 (2)	54.000	B202	25,99 $\pm$ 0,03 (3)	13523 $\pm$ 276 (3)	
27,43 $\pm$ 0,05 (2)	5.400	B203	25,94 $\pm$ 0,01 (3)	14050 $\pm$ 111 (3)	

Los resultados obtenidos confirman la presencia de mRNA de DHODH en el cerebro de humano adulto. Para determinar los valores normales en la población control extendimos el número de muestras, trabajando con hipocampo de 9 individuos sanos.



**Figura 3.1.** Niveles de mRNA de DHODH en el giro dentado de individuos sanos. A: Curva estándar; B: Tabla mostrando las medias ± su desviación estándar de los valores de C<sub>T</sub> y número de copias de los puntos de la curva estándar; C: Tabla mostrando las medias ± su desviación estándar de los valores de C<sub>T</sub> y número de copias de las muestras.

Por cada 10 ng de RNA se obtuvieron 1000 copias de mRNA de DHODH (Figura 3.1), mientras que para UCK2, fueron 15000 copias (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Niveles de mRNA de UCK2 en el giro dentado de individuos sanos. A: Curva estándar; B: Tabla mostrando las medias ± su desviación estándar de los valores de C<sub>T</sub> y número de copias de los puntos de la curva estándar; C: Tabla mostrando las medias ± su desviación estándar de los valores de C<sub>T</sub> y número de copias de las muestras.

Al comparar los valores de mRNA de los dos genes, se observa que los niveles de mRNA de UCK2 son mayores en una proporción de aproximadamente 1:10 para DHODH frente a UCK2. Sin embargo, en estos análisis se cargó, por un lado, el plásmido construido para la curva estándar que solo posee el gen analizado, siendo una muestra sencilla; mientras que, por otro lado, las muestras complejas cuentan con todos los mRNA obtenidos de la extracción directa del tejido. Por tanto, podría ocurrir que el número de copias estuviera infravalorado. Por ello, se puso a punto un protocolo en el que fuera posible analizar en el mismo pocillo los mRNA de los tres genes, DHODH y UCK2, más el gen para normalizar, que codifica la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), enzima implicada en la glucólisis. Se sintetizó para ello, un plásmido con GAPDH y se realizó una curva estándar. Además, los resultados anteriores se centraban en tan solo una región cerebral (giro dentado del hipocampo), por lo que también se amplió el análisis a tres zonas más: región CA1 del hipocampo (CA1), locus cerúleo (LC) y corteza entorrinal (CE) (Tabla 3.4).

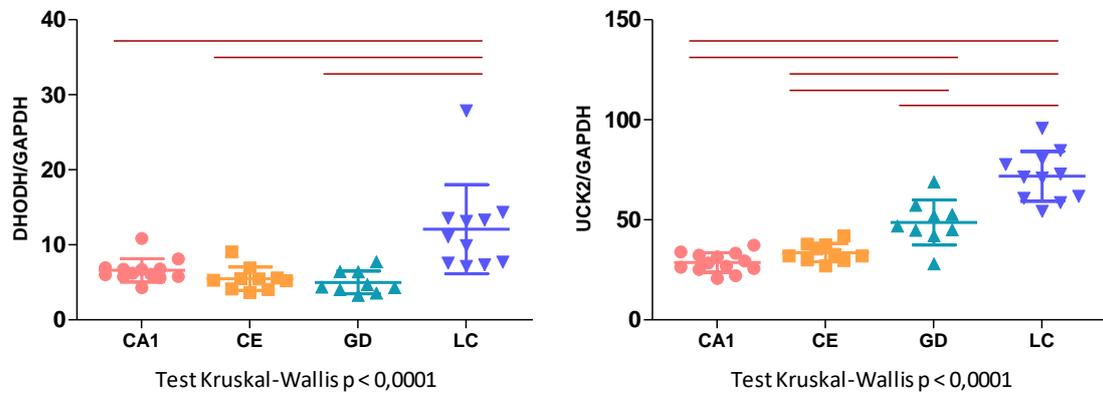
**Tabla 3.4.** Niveles de mRNA de DHODH y UCK2 normalizados por GAPDH y el cociente DHODH/UCK2 en diferentes regiones cerebrales. Se muestran las medias  $\pm$  su desviación estándar de los individuos sanos de cuatro regiones cerebrales. Los valores de DHODH y UCK2 normalizados con GAPDH indican los transcritos del gen particular por mil transcritos del gen normalizador.

mRNA	Región CA1	Corteza entorrinal	Giro dentado	Locus cerúleo
DHODH/GAPDH ( $\times 10^3$ )	6,61 $\pm$ 1,55	5,48 $\pm$ 1,57	5,07 $\pm$ 1,60	12,20 $\pm$ 5,96
UCK2/GAPDH ( $\times 10^3$ )	28,70 $\pm$ 4,87	33,62 $\pm$ 4,55	49,30 $\pm$ 11,96	71,83 $\pm$ 12,24
DHODH/UCK2 ( $\times 10^3$ )	0,29 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,12

Los cocientes de mRNA de DHODH frente al mRNA de GAPDH muestran unos valores muy similares a los descritos en la base de datos *Expression Atlas*, de entre 1,34 y 3,37 transcritos de DHODH por 1000 de GAPDH.

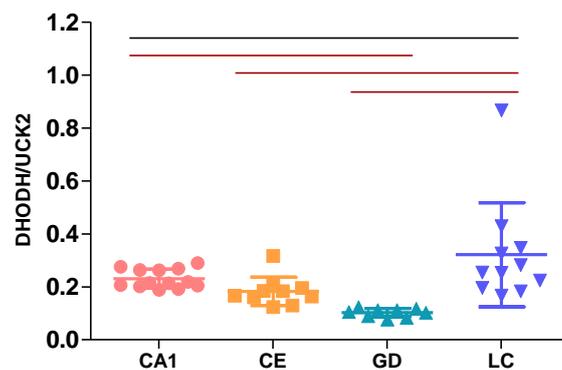
Los niveles de mRNA de DHODH y UCK2 presentaron una proporción de entre 1:5 y 1:10. Dependiendo de la región cerebral, los niveles de mRNA de DHODH son entre 4,3 y 9,7 veces más bajos que los niveles de UCK2, valores comparables con los mostrados en *Expression Atlas* (3,0 – 5,3). Estos resultados se obtuvieron en más de 40 muestras provenientes de tejido cerebral de individuos sanos.

Al comparar regiones cerebrales, se puede observar como los niveles de DHODH y UCK2 son significativamente más altos en las muestras del locus cerúleo que en el resto de regiones (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Representación mediante diagrama de puntos del número de copias de mRNA de DHODH y UCK2 normalizado por GAPDH en diferentes regiones cerebrales de individuos sanos. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Los valores representan el gen en particular por mil copias del gen normalizador. El diagrama muestra los valores de cada una de las muestras, su media y la desviación estándar. Las rayas rojas indican una significancia marcada por la prueba post hoc Dunn con un  $p < 0,0083$ .

Asimismo, se puede observar como el área del locus cerúleo también posee un cociente de expresión de mRNA de DHODH/UCK2 significativamente más elevado que giro dentado y corteza entorrinal (Test Kruskal-Wallis  $p < 0,0001$ ) (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Representación mediante diagrama de puntos del cociente de los niveles de expresión de DHODH y UCK2 en los individuos adultos sanos de las 4 regiones cerebrales. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. El diagrama muestra los valores de cada una de las muestras, su media y la desviación estándar. Las rayas rojas indican una significancia marcada por la prueba post hoc Dunn con un  $p < 0,0083$ .

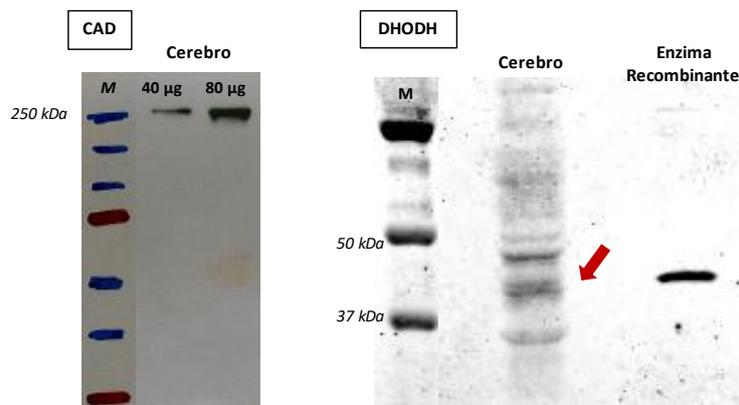
### 3.1.2. Proteínas

Una vez confirmada la transcripción del gen *DHODH* en cerebro humano adulto, quisimos ver si era posible la identificación de la proteína DHODH.

Estudios en enriquecido mitocondrial de cerebro ya revelaron la presencia de la proteína en este tejido en rata [120]. El Western blot, con un anticuerpo propio, mostró la presencia de DHODH en diferentes regiones de cerebro: cerebelo, tronco del encéfalo, hipocampo, corteza cerebral, estriado y médula espinal. En todas ellas, aunque con diferentes niveles de intensidad, se pudo apreciar la aparición de una banda a la altura adecuada.

#### 3.1.2.1. Proteína CAD en cerebro

Para confirmar la presencia de las enzimas de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas en cerebro humano adulto, en primer lugar, se realizó un Western blot de CAD. Se obtuvo una única banda con un peso de alrededor de 250 kDa, correspondiente con el tamaño de la enzima, 243 kDa (Figura 3.5).

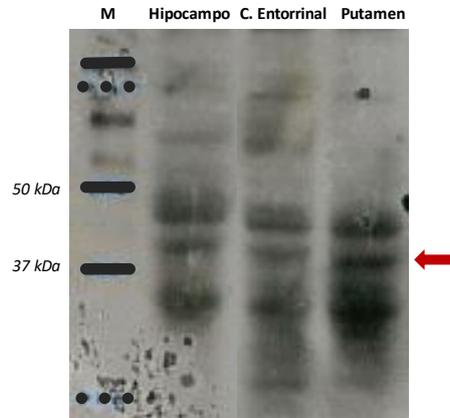


**Figura 3.5.** Imágenes representativas de las membranas obtenidas de Western blot de CAD (anticuerpo monoclonal) y DHODH (anticuerpo policlonal) en cerebro humano. M: marcador de pesos moleculares. CAD: Muestra de cerebro control, 40 y 80 µg de proteína cargada. DHODH: Muestra de cerebro control 180 µg de proteína cargada; Enzima recombinante comercial, 250 ng de proteína cargada. La flecha roja señala la banda cuyo peso se corresponde con el de la enzima DHODH.

#### 3.1.2.2. Proteína DHODH en cerebro

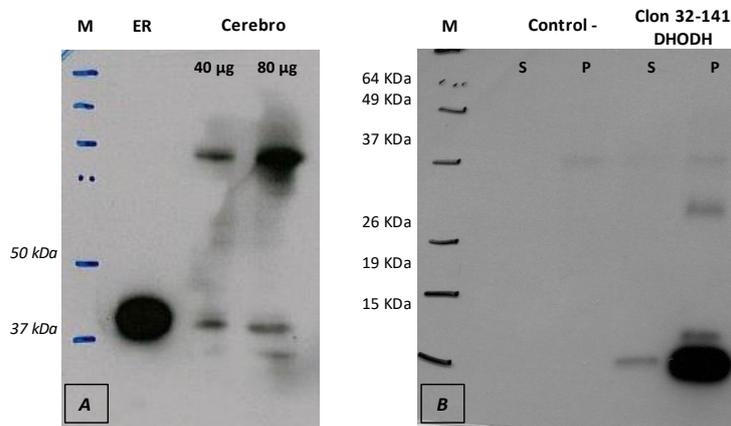
En el caso de la enzima DHODH, en primer lugar se utilizó un anticuerpo anti-DHODH policlonal. Y aunque al revelar las muestras, se vieron numerosas bandas, una de ellas se correspondía con el peso de la proteína (43 kDa) y, además, se encontraba a la misma altura que la banda de la enzima comercial. Enzima recombinante humana sintetizada por una casa comercial cuya secuencia contiene desde el aminoácido 31 hasta completar la proteína con el aminoácido 395, por lo que el peso se correspondió con el mismo esperado para las muestras (42 kDa) (Figura 3.5).

Iguals resultados se observaron al realizar el Western blot en diferentes regiones de tejido cerebral humano: hipocampo, corteza entorrinal y putamen. Y aunque igualmente se obtuvo más de una banda, una de ellas siempre coincidió con el peso esperado (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Imagen representativa de la membrana obtenida de un Western blot de DHODH (anticuerpo policlonal) en cerebro humano adulto. M: marcador de pesos moleculares. Se cargaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína de hipocampo y 180  $\mu\text{g}$  de proteína de corteza entorrinal y putamen. La flecha roja señala las bandas cuyo peso se corresponde con el de la enzima DHODH.

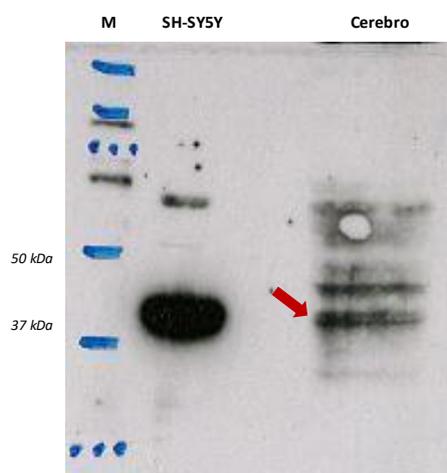
Al trabajar con un anticuerpo anti-DHODH monoclonal, aunque el revelado fue más limpio, también se obtuvo más de una banda. Pero de nuevo, una de ellas, además de tener el tamaño adecuado, también coincidió a la altura de la enzima comercial (Figura 3.7.A).



**Figura 3.7.** Imágenes representativas obtenidas de las membranas de Western blot de DHODH (anticuerpo monoclonal). M: marcador de pesos moleculares. A: WB en cerebro humano (40 y 80  $\mu\text{g}$  de proteínas cargadas) y enzima DHODH recombinante comercial (250 ng de proteína cargada). B: WB de sobrenadante y pellet (S y P) de sonicado bacteriano, control negativo (control -) y clon que expresa el fragmento de 28 aminoácidos (32-141) de la enzima DHODH.

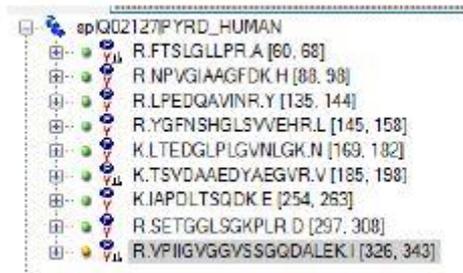
Asimismo, se sintetizó en nuestro laboratorio la región específica que la casa comercial utilizó para generar el anticuerpo monoclonal. Para ello se clonó la región de la proteína comprendida entre los aminoácidos 32 y 141. Al realizar el Western blot se confirmó que el anticuerpo reconoce el fragmento de la DHODH, ya que se obtuvo una banda del peso correspondiente a la región clonada (Figura 3.7.B).

Complementariamente se analizaron las bandas obtenidas en el Western blot de DHODH de cerebro en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Se enviaron las bandas recortadas de los geles de una muestra de corteza entorrinal de cerebro humano adulto y de la línea celular SH-SY5Y sin diferenciar, ya que se trata de una línea tumoral con alta capacidad replicativa y, por tanto, con altos requerimientos de pirimidinas (Figura 3.8) [121], [122].



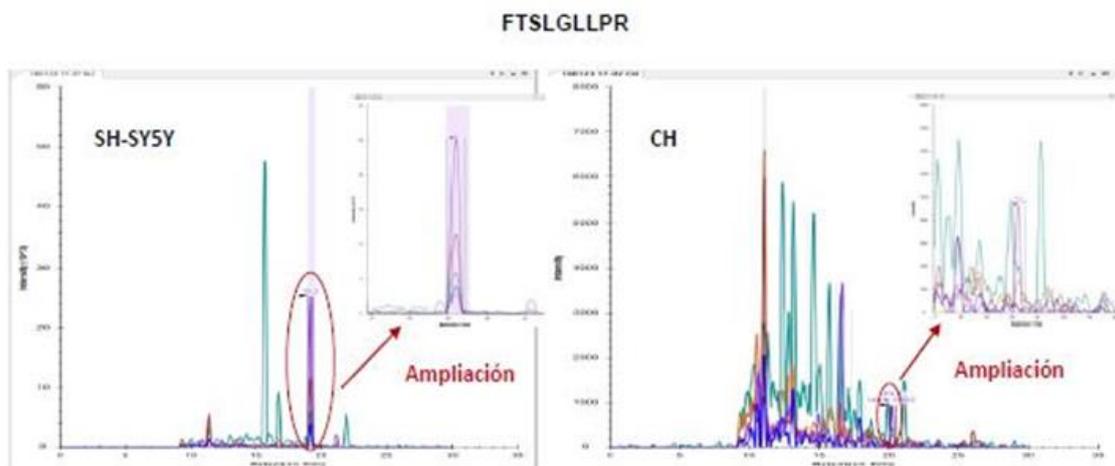
**Figura 3.8.** Imagen representativa de la membrana obtenida de un Western blot de DHODH (anticuerpo policlonal) en la línea celular SH-SY5Y y cerebro humano adulto. M: marcador de pesos moleculares. Se cargaron 70  $\mu$ g de proteína de la línea celular SH-SY5Y y 250  $\mu$ g de proteína de cerebro (corteza entorrinal). La flecha roja señala la banda cuyo peso se corresponde con el de la enzima DHODH y que, junto a la banda de la muestra de la línea celular SH-SY5Y, se envió a la Unidad de Proteómica.

En primer lugar, realizaron la huella peptídica, pero en ella no se identificó la enzima DHODH, tanto en la línea celular SH-SY5Y como en cerebro. Por ello, mediante nanocromatografía líquida se realizó el análisis de proteómica dirigida (PRM) en ambas muestras. Para la identificación se analizaron, al menos, cinco fragmentos peptídicos de la proteína DHODH denominado en UniProt como Q02127/ PYRD\_Human (Figura 3.9).



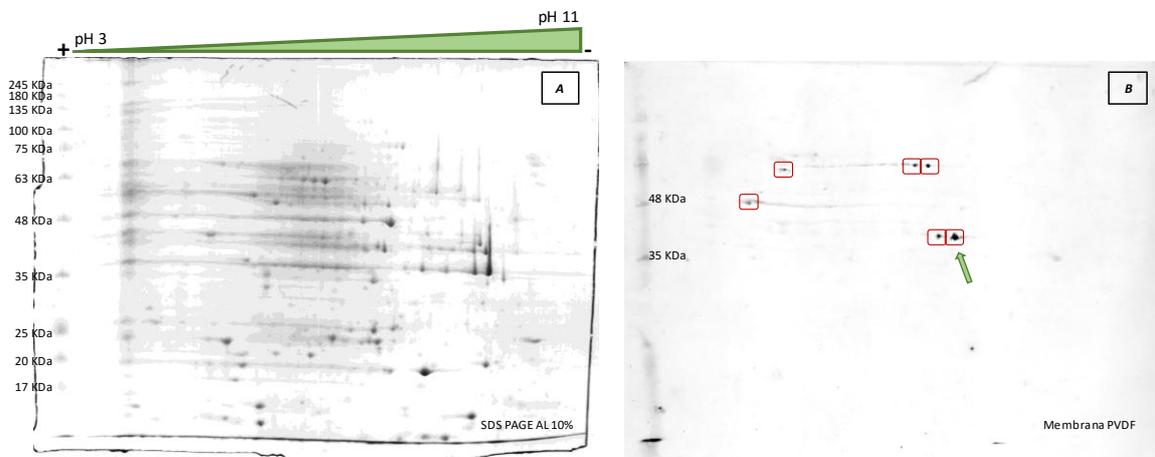
**Figura 3.9.** Péptidos de la proteína DHODH empleados para el análisis de proteómica dirigida (PRM).

En este caso, en la muestra procedente de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y sin diferenciar se identificaron claramente 3 de los péptidos de la proteína con sus correspondientes espectros de fragmentación (Anexo I). Sin embargo, en el tejido cerebral humano no se pudo confirmar la presencia de la proteína. Al comparar los perfiles cromatográficos de los péptidos identificados con los de la línea celular SH-SY5Y, se vio que no se parecían, lo cual podría deberse a que la muestra de cerebro contenía mucho ruido de fondo (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Representación de los perfiles cromatográficos del análisis de proteómica dirigida de cerebro y la línea celular SH-SY5Y. Comparación de 1 de los 3 péptidos identificados en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y (FTSLGLLPR) de la proteína DHODH con los perfiles cromatográficos del tejido cerebral humano (CH).

Para purificar más la proteína de interés se hizo una separación electroforética bidimensional con la muestra de cerebro humano (Figura 3.11).

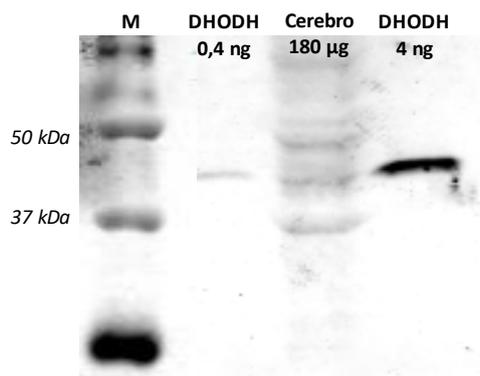


**Figura 3.11.** Gel y membrana obtenidos al realizar la separación electroforética bidimensional de DHODH en corteza entorrinal. A: Gel teñido con Azul de Comassie. B: Membrana PVDF revelada con el anticuerpo anti-DHODH policlonal. Recuadros rojos: puntos recortados para realizar la huella peptídica; flecha verde, punto analizado por proteómica dirigida.

Tras realizar esta técnica se reveló la membrana y se escogieron varios de los puntos fluorescentes para la huella peptídica. El resultado obtenido, como ya había ocurrido tanto con la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, como con la muestra de cerebro previa, no mostró la proteína de interés. A continuación, se realizó el análisis por proteómica dirigida, para ello se escogió el punto que mejor encajaba con el peso molecular de la proteína, y que además resultó ser el punto con mayor intensidad de fluorescencia al revelar la membrana.

Cromatográficamente se encontraron evidencias de la presencia de la proteína en la muestra de cerebro humano, pero estos resultados no superaron los parámetros de calidad necesarios para poder confirmar la presencia de la proteína en la muestra, quizá debido a la baja concentración de la enzima (Anexo II).

Para realizar una estimación de la cantidad de proteína, se realizaron varios Western blot con diferentes cantidades de la enzima recombinante DHODH hasta que la intensidad de la muestra de cerebro quedó dentro de las intensidades de dos concentraciones de la enzima comercial. Según el resultado obtenido, por cada 180  $\mu\text{g}$  de tejido cerebral cargado, se mostró una intensidad de fluorescencia intermedia entre los valores correspondientes a las concentraciones de 0,4 ng y 4 ng de enzima comercial. Por lo que podría decirse que por cada miligramo de cerebro se encuentran entre 2 y 22 ng de proteína DHODH (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Imagen representativa de la membrana obtenida de un Western blot para la cuantificación de la enzima DHODH por microgramo de proteína de cerebro. M: marcador de pesos moleculares. Se cargaron 0,4 y 4 ng de proteína de enzima recombinante DHODH y 180  $\mu\text{g}$  de proteína de cerebro.

### 3.1.3. Actividad

#### 3.1.3.1. Revisión bibliográfica

Aunque la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas no ha sido tan estudiada como la de las purinas, encontramos algún estudio, relativamente reciente, donde se mide la actividad de la enzima DHODH mediante espectrofotometría en células u homogenado de tejidos (cerebro no incluido) [64]. Pero al intentar adaptar estos protocolos a tejido cerebral no obtuvimos un buen resultado. Pese a ello, existen numerosos estudios que evidencian la presencia de la ruta de síntesis *de novo* en cerebro, demostrando la actividad de cada una de las enzimas que componen los diferentes pasos de la ruta. En los años 70, varios estudios acerca de la actividad de esta ruta fueron publicados. La mayoría de estos trabajos utilizaron sustratos de las diferentes enzimas, marcados radiactivamente, para ver la incorporación de esa radiactividad en los sucesivos productos de la ruta. Aunque la mayor parte de estos trabajos se realizaron en diferentes especies de roedores.

Algunos estudios se centraron en la evolución de las actividades de las distintas enzimas de la ruta a lo largo de la gestación y los primeros días de vida en ratas. En ellos se mostró como la actividad de la enzima multifuncional CAD poseía un pico máximo de actividad en los días posteriores al nacimiento [123]–[125]. Esto podría deberse a que el cerebelo en rata no completa su total desarrollo hasta la semana 3 [126]. El tejido nervioso, al igual que el resto de los tejidos en desarrollo que conforman un individuo, necesitaría un gran aporte de pirimidinas, moléculas necesarias tanto para la síntesis de DNA y RNA como para la formación de fosfolípidos, glucolípidos o glicoproteínas. Y por lo tanto un gran rendimiento de la ruta *de novo*.

Estudios en los que se inyectó intracranealmente alguno de los sustratos de la ruta marcados de forma radiactiva, revelaron tras el sacrificio, altos niveles de nucleótidos de pirimidina radiactivas en cerebro de rata, ratón y gato adulto [127]–[132]. Esto podría deberse a que los sustratos atraviesan la barrera hematoencefálica hacia otros tejidos, en donde se incorporan a la ruta, y posteriormente vuelven en forma de pirimidina al cerebro. Pero los tiempos de sacrificio tras la administración son muy bajos, entre 20 y 40 minutos, lo que sugiere que la ruta de síntesis *de novo* se encuentra en el cerebro [128], [130], [131].

Además, la administración intracraneal del inhibidor de UMPS, el ribonucleico de Azauridina, forma incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica, se ha visto que inhibe la actividad de la ruta en el cerebro [129]. Igualmente, también *in vivo*, la administración intracraneal de PALA, inhibidor de CAD, provoca una inhibición de la síntesis *de novo*, mientras que una administración sistémica estaría provocando daños al privar al cerebro del material necesario para la ruta de salvamento [132].

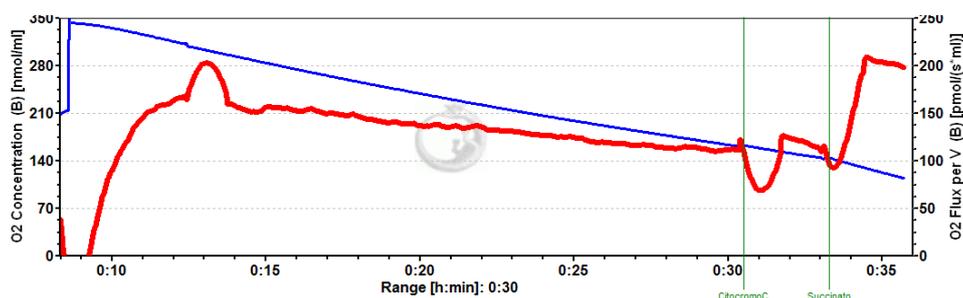
Del mismo modo, se realizaron estudios *in vitro* sobre la actividad de la ruta en secciones u homogenado de tejido. Los resultados positivos implican que la actividad medida pertenece tan solo a la generada en el cerebro. En estos casos, también se midió como la adición de alguno de los sustratos de la ruta, marcados radiactivamente, acaban produciendo nucleótidos de pirimidina marcados en cerebro de ratón y rata [123], [133]–[135]. Además, cuando se emplean, en cerebro de rata, inhibidores de las enzimas DHODH y UMPS, como Azauridina o barbitúricos, la actividad disminuye [123] [134].

### 3.1.3.2. Consumo de Oxígeno

Debido a su localización y función, la enzima DHODH tiene un importante papel en la respiración celular. Se encuentra en la membrana interior de la mitocondria y su función implica la oxidación, mediada por ubiquinona, de dihidroorotato a orotato. Por lo que una forma de determinar su actividad podría ser midiendo el consumo de oxígeno tras la adición de su sustrato, el dihidrorotato (DHO).

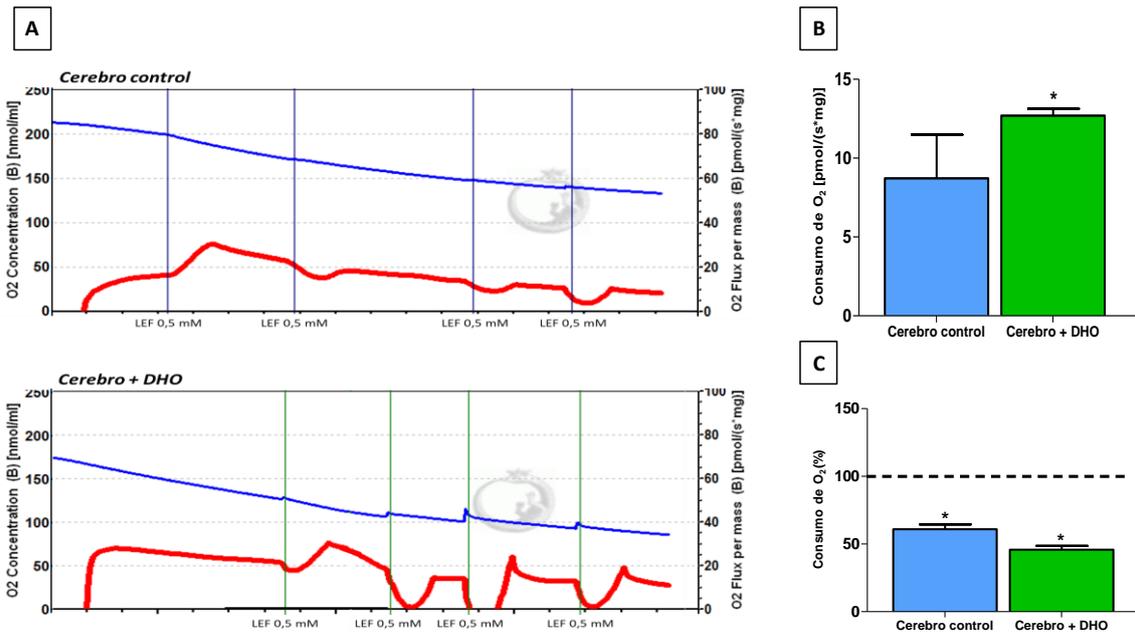
Por ello, se puso a punto un protocolo con el oxígrafo, para observar si el tejido cerebral, en presencia de DHO, provocaba un aumento en el consumo de oxígeno. Durante este apartado se trabajó solo con tejido cerebral de ratón, ya que la obtención de tejido cerebral humano en estas condiciones resultó imposible.

En primer lugar se confirmó si el proceso de preparación de las muestras era correcto. Para ello se realizó una medición previa en el oxígrafo y se observó, tras la adición de succinato, que se habían abierto poros en las membranas celulares y, con la adición de citocromo c, que las mitocondrias se encontraban intactas [136] (Figura 3.13).



**Figura 3.13.** Gráfica representativa del consumo de O<sub>2</sub> de cerebro de ratón en condiciones normales, en presencia de 15 µM de citocromo c y con 100 µM de succinato.

Una vez puesto a punto la extracción y procesado de las muestras, se diseñó un protocolo para la medición del consumo de oxígeno en cerebro en presencia de DHO, ya que en la bibliografía no se encontró ninguno. Para ello se midió el consumo de oxígeno de homogenado de cerebro de ratón en ausencia y presencia de DHO (10 mM). Las muestras a las que se les añadió el sustrato presentaban unos valores significativamente más altos de consumo de O<sub>2</sub> que las de los controles (Figura 3.14). Además, la administración del inhibidor leflunomida 2 mM disminuyó el consumo de oxígeno, mostrando la relación de la enzima DHODH y la síntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidinas con el sistema OXPHOS.



**Figura 3.14.** Representación del consumo de O<sub>2</sub> de tejido cerebral de ratón. A: Gráfica del oxígrafo de la muestra de cerebro en ausencia y presencia de DHO y la posterior administración de leflunomida (LEF). B: Gráfica comparativa del consumo de oxígeno en ambas condiciones. C: Gráfica representativa de cómo se inhibe el consumo de O<sub>2</sub> con leflunomida.

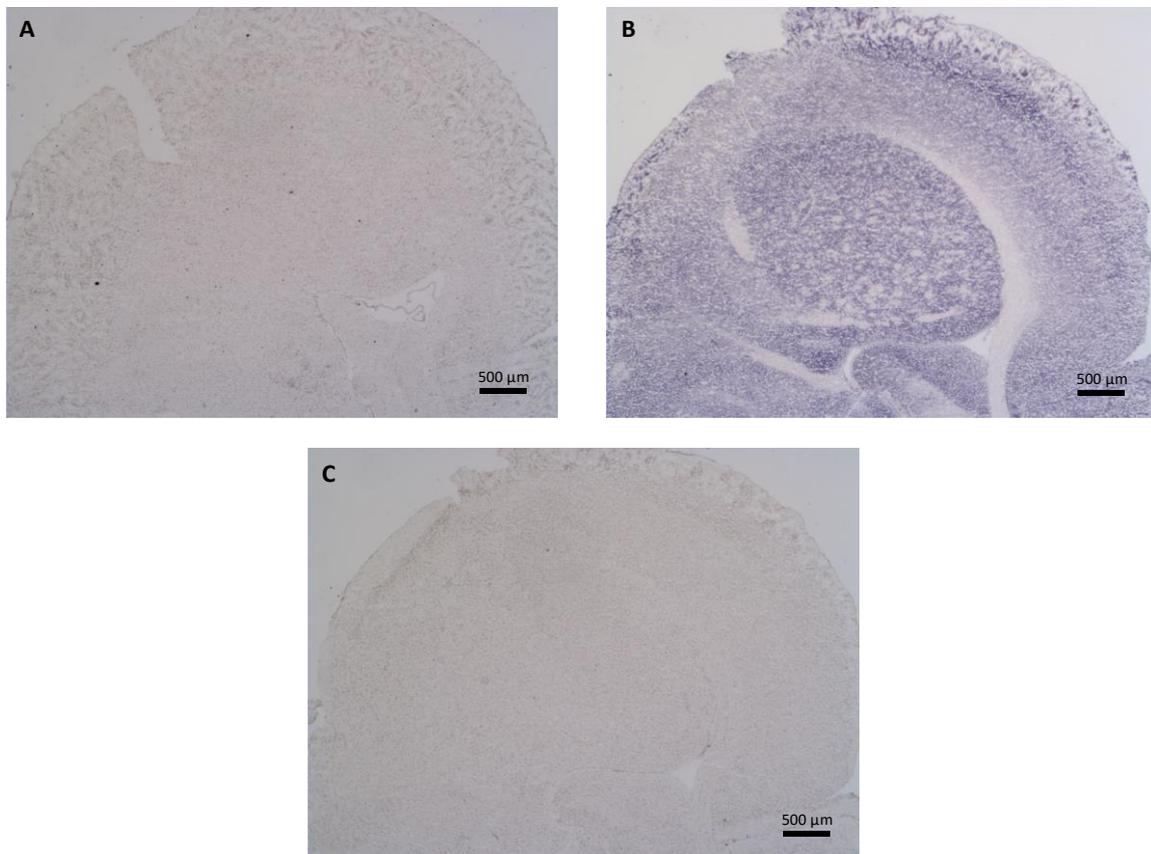
### 3.1.3.3. Histoquímica de DHODH

En lo referente a la actividad de la enzima DHODH, encontramos tan solo dos estudios que se centran en ella. Ambos trabajan *in vitro* con homogenado de cerebro de rata. En el primero se midió como el marcaje radiactivo pasaba desde el ácido dihidrorotico hasta los correspondientes nucleótidos de pirimidina [134], mientras que el segundo lo hizo mediante espectrofotometría, midiendo la formación de ácido orótico [137].

Ya que el estudio con homogenado de cerebro no fue efectivo en nuestro caso, realizamos una histoquímica para comprobar así que la DHODH estaba activa en cerebro. Debido a que, para la histoquímica, el tejido debe estar congelado de forma adecuado, no contábamos con este tipo de preparación en tejido humano y lo realizamos en ratón.

Tras comprobar mediante hematoxilina-eosina que el tejido cerebral, de una hembra adulta, se encontraba en buen estado, se realizó la tinción. Con la histoquímica se observó cómo, al añadir el sustrato de la enzima, se revelaba un marcaje a lo largo de toda la sección. El marcaje no fue homogéneo a lo largo de todo el tejido, viéndose zonas más intensas que otras (Figura 3.15).

Además, cuando se añadió uno de los inhibidores específicos de la enzima, brequinar (20  $\mu\text{M}$ ), no hubo marcaje. Confirmándose así que la coloración obtenida provenía específicamente de la actividad de la DHODH (Figura 3.15).



**Figura 3.15.** Imágenes representativas de la histoquímica de DHODH en secciones cerebrales de ratón. Secciones de 20  $\mu\text{m}$ . **A:** Control negativo 2x. **B:** Sección + DHO 2x. **C:** Sección + DHO + brequinar 2x.

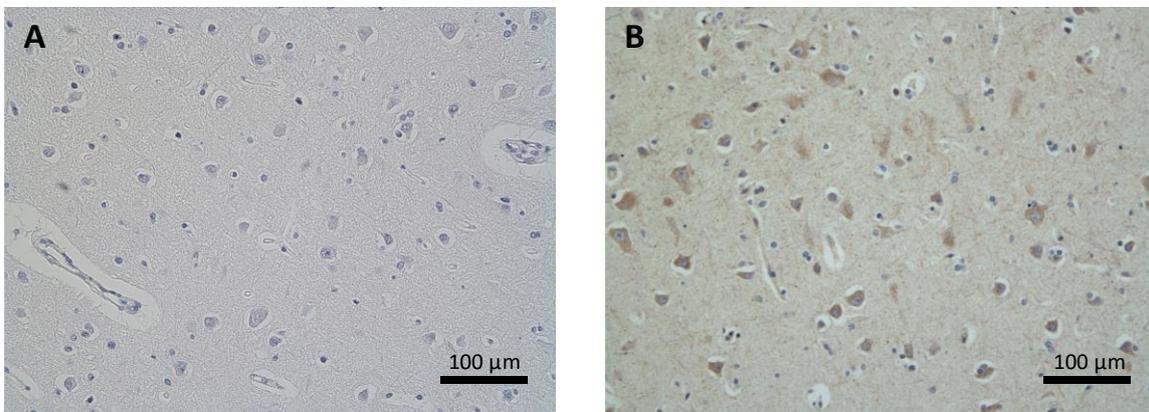
Por consiguiente, con estos resultados podríamos decir que la enzima DHODH está presente y activa en cerebro adulto.

### 3.1.4. Localización

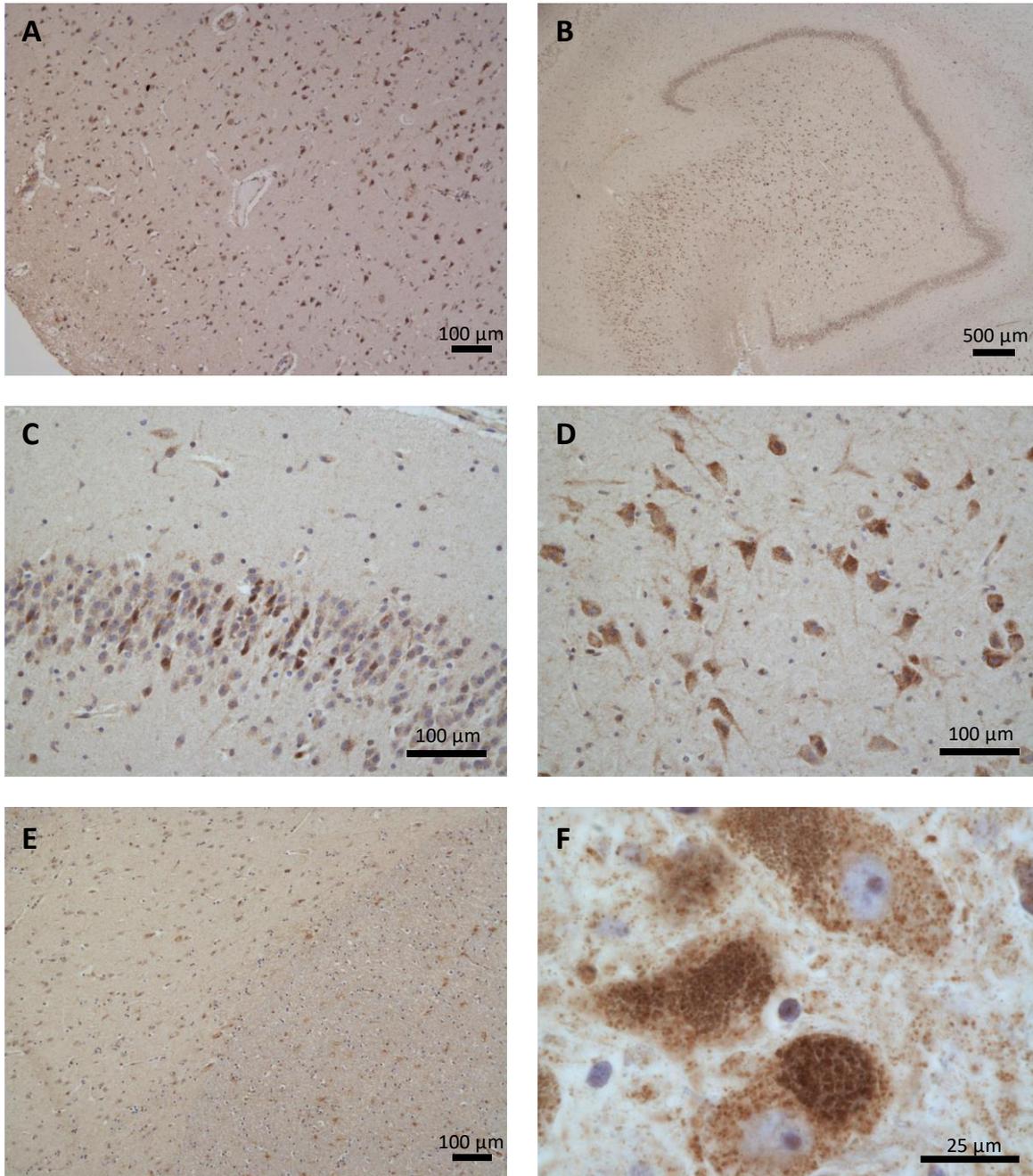
Los resultados anteriores nos confirman, por tanto, la presencia de la ruta *de novo* de pirimidinas en cerebro adulto humano. Sin embargo, ninguno de ellos nos indica en que células del cerebro se está expresando la ruta.

Previos estudios muestran, mediante inmunofluorescencia, que CAD se localiza en los astrocitos, pero éste está realizado en cerebro de ratón joven y según avanza la edad de los individuos, la señal se va perdiendo [138]. Sin embargo, la inmunohistoquímica de DHODH en cerebro de rata adulto reveló una localización neuronal [120]. Tanto en regiones de hipocampo, corteza frontal, estriado y sustancia negra se puede observar como la tinción se encuentra en los cuerpos neuronales y está ausente en astrocitos. Al centrarnos en humanos, la base de datos *The Human Protein Atlas*, apunta la presencia, tanto de CAD como DHODH, en diferentes regiones de cerebro. La expresión que se muestra en corteza cerebral, hipocampo y núcleo caudado se centra tan solo en neuronas, y no es detectada en las células de la glía.

Para corroborar estos datos, se realizó la inmunohistoquímica de CAD en cerebro humano adulto. Una vez confirmado que la técnica funcionaba en tejido parafinado (Figura 3.16), se repitió en diferentes regiones cerebrales de un individuo sano adulto (Figura 3.17).

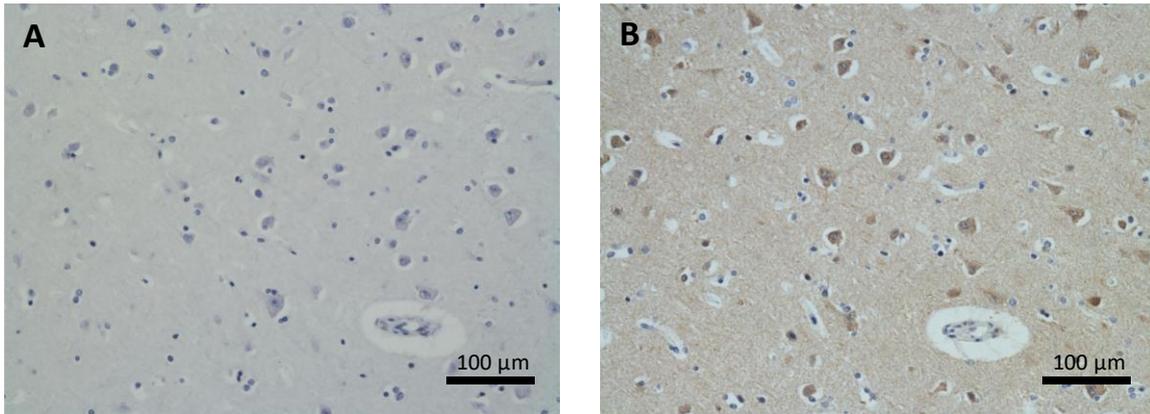


**Figura 3.16.** Imagen representativa de la inmunohistoquímica de CAD en cerebro humano. A: Control negativo (20x). B: Control positivo con el anticuerpo anti-CAD (20x).



**Figura 3.17.** Imágenes representativas de la Inmunohistoquímica de CAD en diferentes regiones de cerebro humano adulto. A: Corteza frontal (20x); B: Giro dentado (GD) (2x); C: Capa granular del GD (20x); D: Capa polimorfa del GD (20x); E: Estriado (10x); F: Mesencéfalo (100x).

Cuando realizamos este mismo proceso para la proteína DHODH, se comprobó de nuevo que la tinción funcionaba correctamente en el tejido (Figura 3.18), y que esta se revelaba en las mismas regiones de cerebro estudiadas para CAD (Figura 3.19).

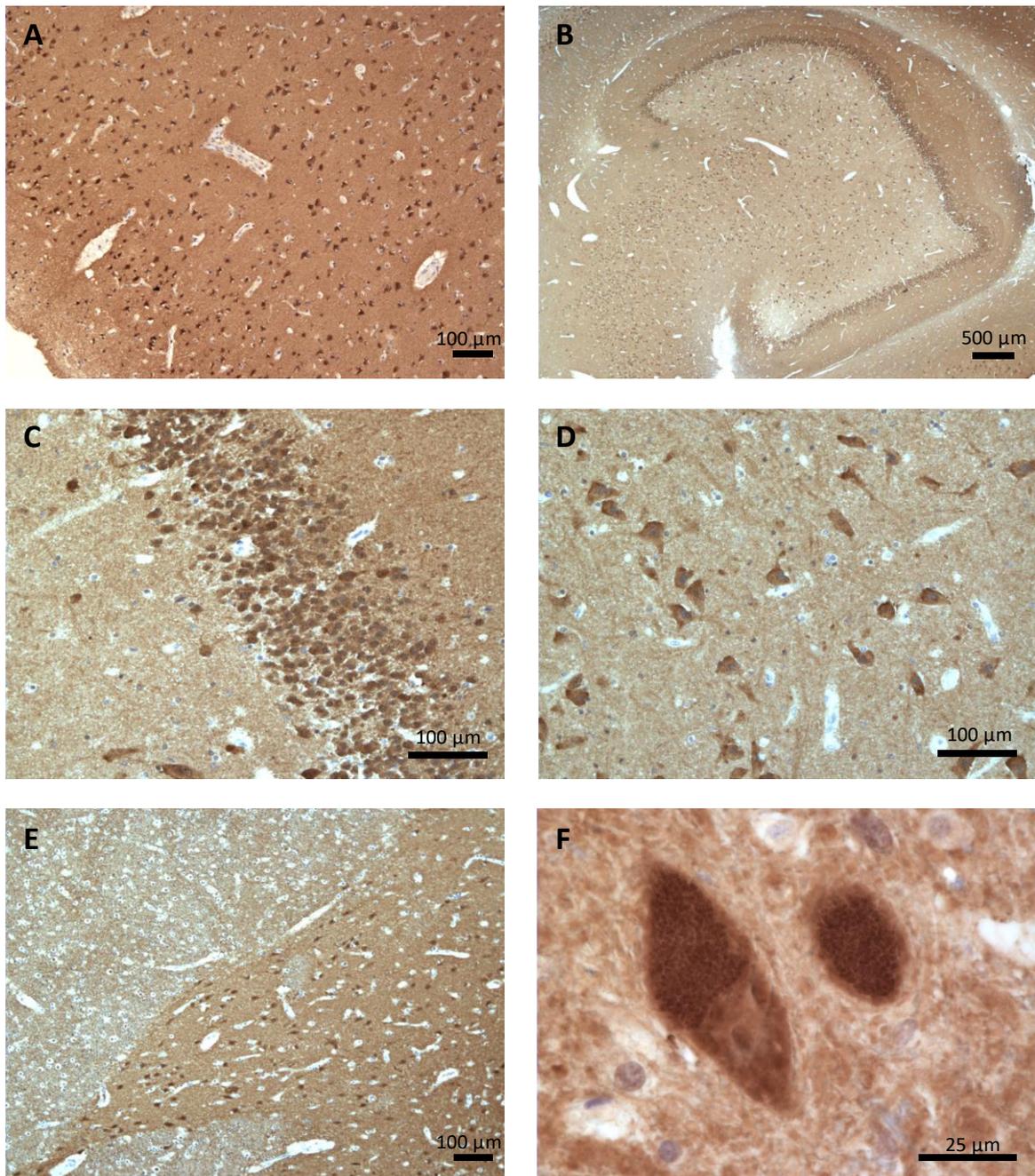


**Figura 3.18.** Imagen representativa de la inmunohistoquímica de DHODH en cerebro humano. A: Control negativo (20x). B: Control positivo con el anticuerpo anti-DHODH (20x).

Al observar detenidamente las tinciones podemos decir que ambas enzimas dan un marcaje positivo en todas las regiones estudiadas (giro dentado, estriado, protuberancia, amígdala, cerebelo, corteza frontal y mesencéfalo). Este marcaje está localizado en los cuerpos neuronales, siendo más intenso en regiones donde hay mayor densidad de neuronas, como ya señalaba Schaefer et al. 2010 anteriormente, y menos intenso en las regiones de sustancia blanca con baja proporción de neuronas. Además, las imágenes sugieren que no hay tinción en las células de la glía. Se aprecia como los núcleos de los astrocitos tienen a su alrededor el citoplasma no teñido.

Dentro de las neuronas, el marcaje de CAD y DHODH, se encuentra tanto en el cuerpo de la neurona, pericarion, como a lo largo de sus dendritas. La tinción se localiza por todo el citoplasma, aunque en alguna región del cerebro tiende a polarizarse en áreas de las que parte una de sus dendritas principales.

Si se comparan ambas inmunohistoquímicas se observa que siguen el mismo patrón de marcaje. Esto podría deberse a que, para una mayor eficacia de la ruta, las enzimas tienden a situarse muy próximas en el interior celular. Mediante microscopía electrónica (inmuno-oro) se ha visto cómo, tanto CAD como UMPS, están agrupadas alrededor de las mitocondrias en espermatozoides de mamíferos [139]. En el citosol, CAD y UMPS, se localizan alrededor de la mitocondria, además CAD está asociada al citoesqueleto, al cual están ancladas las mitocondrias [60]. Esta localización espacial permite una captura de dihidroorotato más eficiente por parte de la DHODH, previniendo el acúmulo de carbamoil aspartato en la célula. Acúmulo producido ya que, en condiciones fisiológicas, es la síntesis de carbamoil aspartato a partir de DHO la que está favorecida [60].



**Figura 3.19.** Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de DHODH de diferentes regiones de cerebro humano adulto. A: Corteza frontal (20x); B: Giro dentado (GD) (2x); C: Capa granular del GD (20x); D: Capa polimorfa del GD (20x); E: Estriado (10x); F: Mesencéfalo (100x).

Recopilando todos los datos, podríamos decir que la enzima DHODH está presente y activa en cerebro humano adulto, y que además esta actividad está localizada en células neuronales.

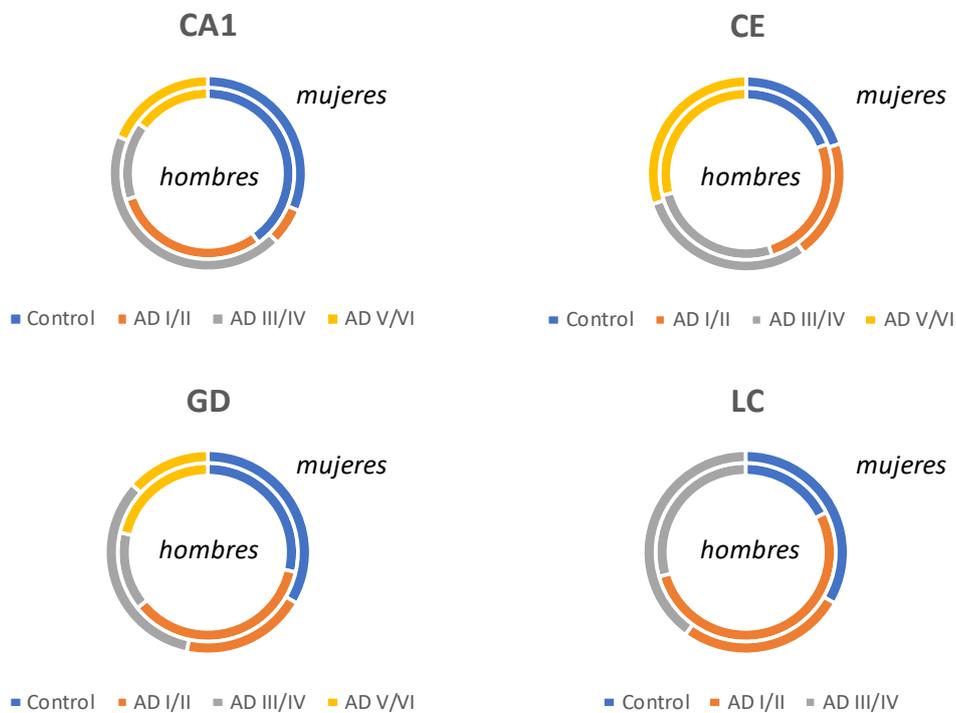
## 3.2. Alteraciones en la síntesis de nucleótidos de pirimidina en pacientes con la enfermedad de Alzheimer

### 3.2.1. Variables preclínicas

Para el estudio de los niveles de expresión de los mRNA de los genes relacionados con la síntesis y recuperación de los nucleótidos de pirimidina, se estudiaron diferentes regiones cerebrales de pacientes con diferentes grados de Alzheimer.

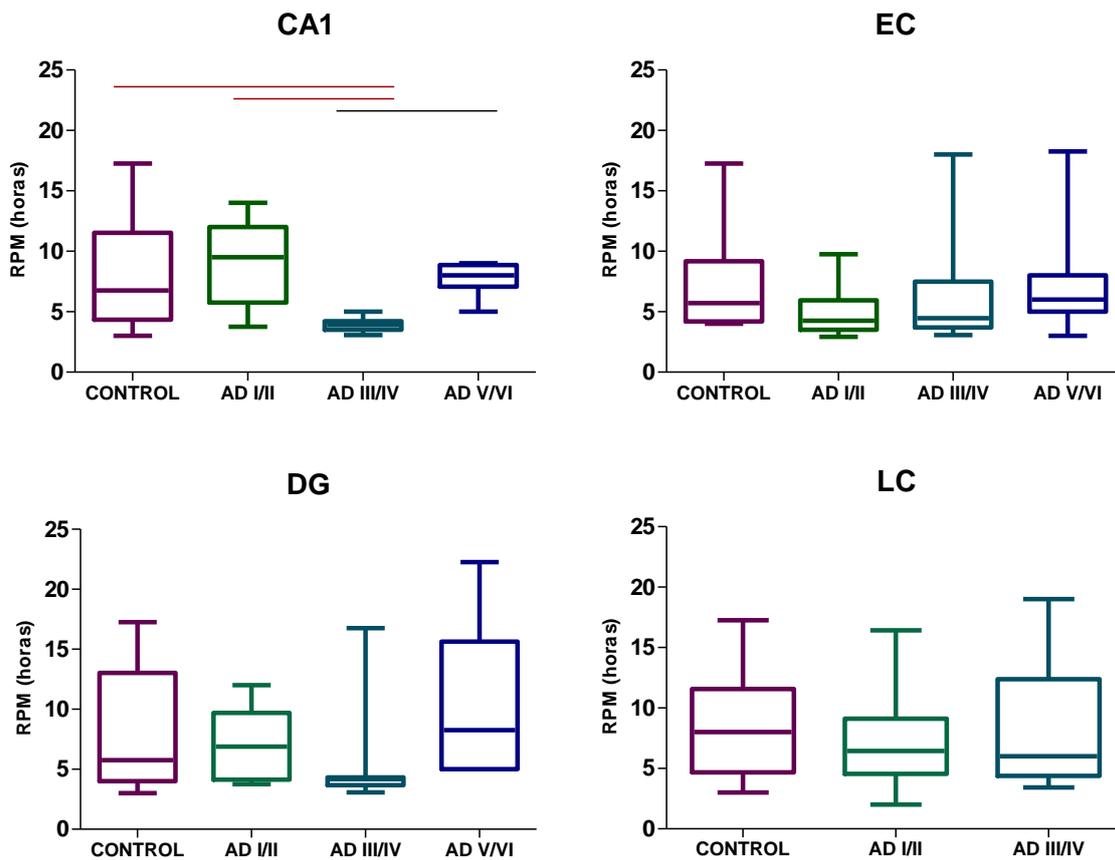
Se trabajó con más de 100 muestras pertenecientes a pacientes clasificados dentro de uno de los 6 grados de AD según *Braak & Braak* y un grupo de individuos control. Las regiones cerebrales fueron el giro dentado (GD) y la región CA1 (CA1) del hipocampo, la corteza entorrinal (CE) y el locus cerúleo (LC). De estas muestras se conocía, además de los datos histopatológicos que permiten catalogarlos dentro de un grado de AD, los datos clínicos, su edad, sexo y tiempo post-mortem (PM).

Al analizar más detenidamente las muestras, se estudió como estas se distribuían dentro de cada región y cada grado de la enfermedad. Dentro de cada grado, había individuos de ambos sexos distribuidos de forma uniforme. Y en ninguna de las regiones predominaba significativamente uno de los sexos (Figura 3.20).



**Figura 3.20** Representación mediante diagrama de sectores de la proporción de mujeres y hombres en las diferentes regiones en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI.

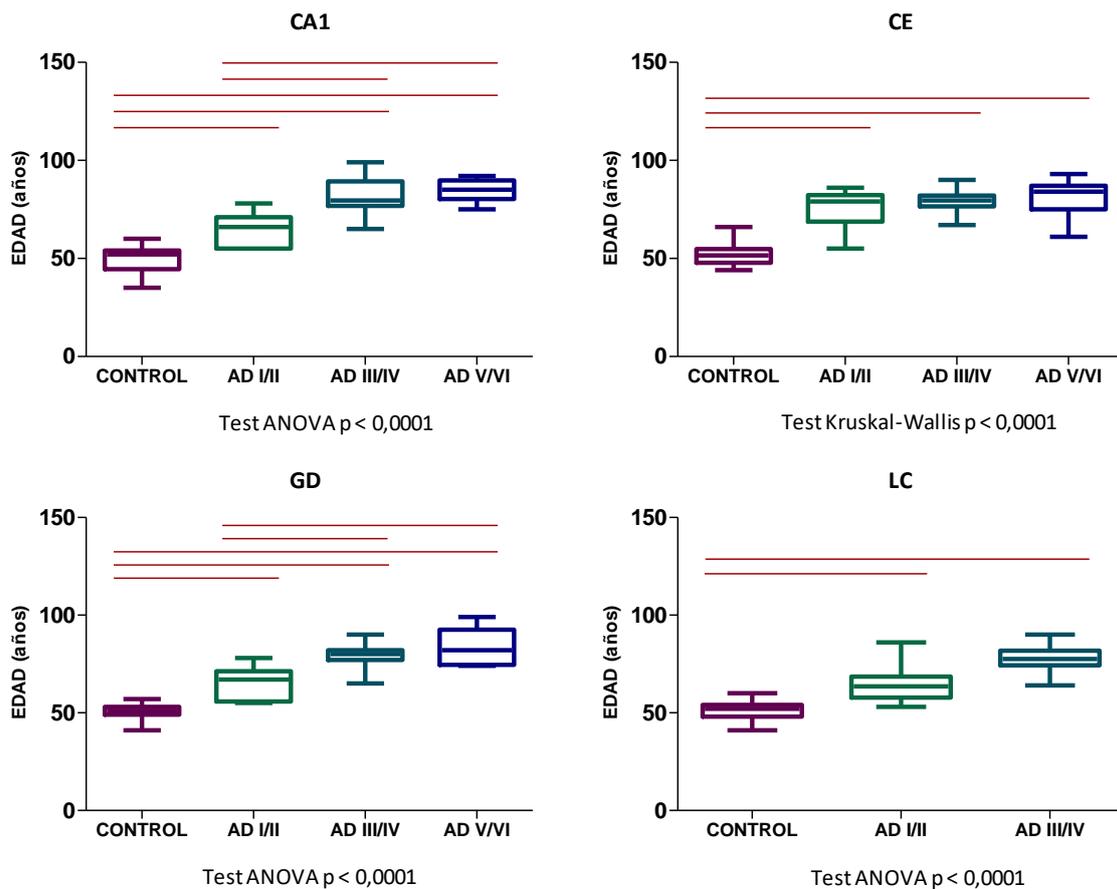
Para descartar que los resultados obtenidos provinieran de modificaciones sufridas posteriormente por las muestras, y no de su propia condición, se analizó si el tiempo post-mortem transcurrido entre que el individuo fallece y se recogen las muestras, poseía una relación significativa con el grado de enfermedad. No hubo asociación significativa entre el retardo post-mortem y el grado de AD, a excepción del grado AD III/IV de la región CA1 que muestra un retardo post-mortem menor que los demás grados (Figura 3.21).



**Figura 3.21.** Representación mediante diagrama de cajas del tiempo de retardo post-mortem (RPM) en las diferentes regiones cerebrales en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI. El diagrama muestra los valores mínimo y máximo, los cuartiles Q1 (25%), Q2 o mediana y Q3 (75%). Las rayas negras indican  $p < 0,05$  y las rojas representan un p-valor marcado por las pruebas post hoc para cada caso. Región CA1: Test Kruskal-Wallis:  $p < 0,0032$ ; prueba post hoc Dunn:  $p < 0,0082$ .

Por último, se analizó si existía alguna asociación entre las edades de los individuos y el grado de AD. Como es esperable, el grado de enfermedad está asociado con la edad de los individuos. La edad es uno de los factores de riesgo más importante para el AD. A medida que se envejece también aumentan las posibilidades de padecer la enfermedad. Además, en los individuos más mayores, el recorrido de la enfermedad suele ser mayor, de ahí que muestren las características histopatológicas que los encuadran en grados más altos. En nuestro estudio, los controles sanos son individuos adultos más jóvenes que los enfermos, esto se debe a que resulta bastante difícil encontrar una persona con la misma edad que los enfermos que no muestre ninguna de las características histopatológicas propias de la enfermedad. Por lo que para poder comparar con controles completamente sanos se escogen individuos algo más jóvenes.

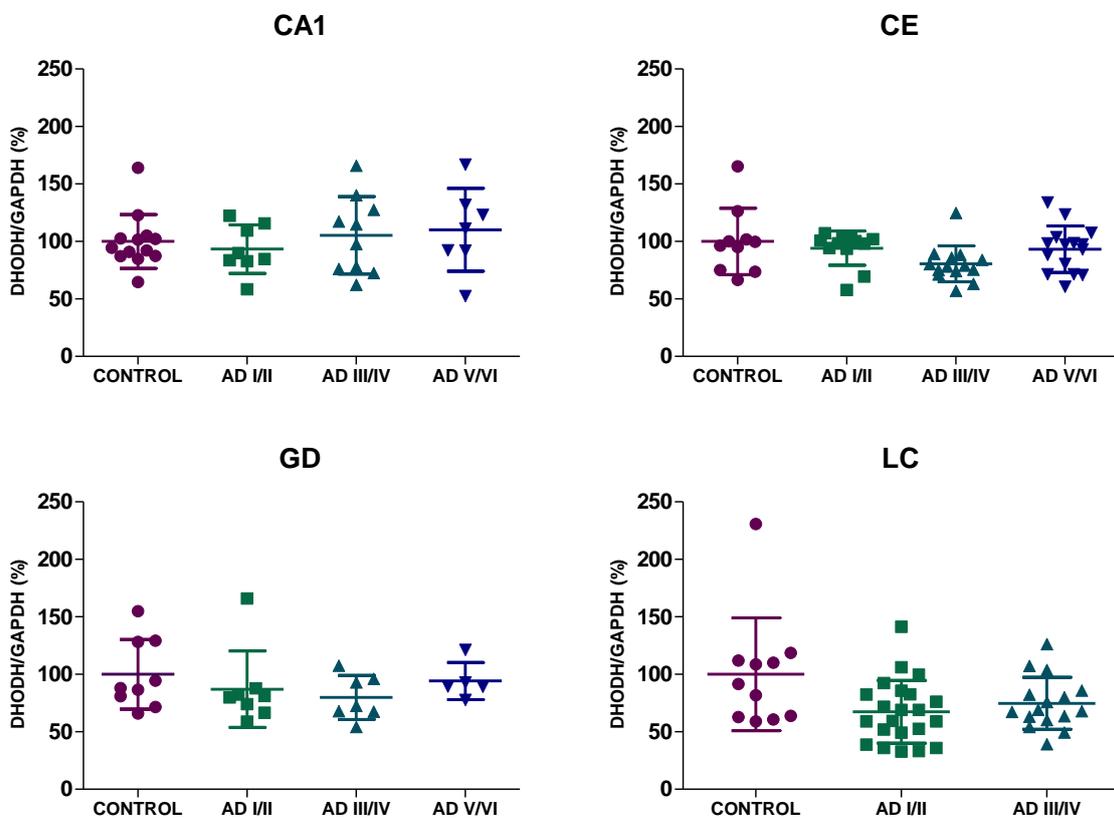
Los pacientes con AD son significativamente mayores que los controles en todas las regiones. Y los pacientes con los grados más avanzados (AD V/VI) son significativamente más mayores que los primeros grados (AD I/II) en algunas regiones (CA1, GD y LC). (Figura 3.22).



**Figura 3.22.** Representación mediante diagrama de cajas de la edad en las diferentes regiones cerebrales en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI. El diagrama muestra los valores mínimo y máximo, los cuartiles Q1 (25%), Q2 o mediana y Q3 (75%). Las rayas rojas indican una significancia de acuerdo con el p-valor marcado por las pruebas post hoc para cada caso.

### 3.2.2. Niveles de mRNA de DHODH

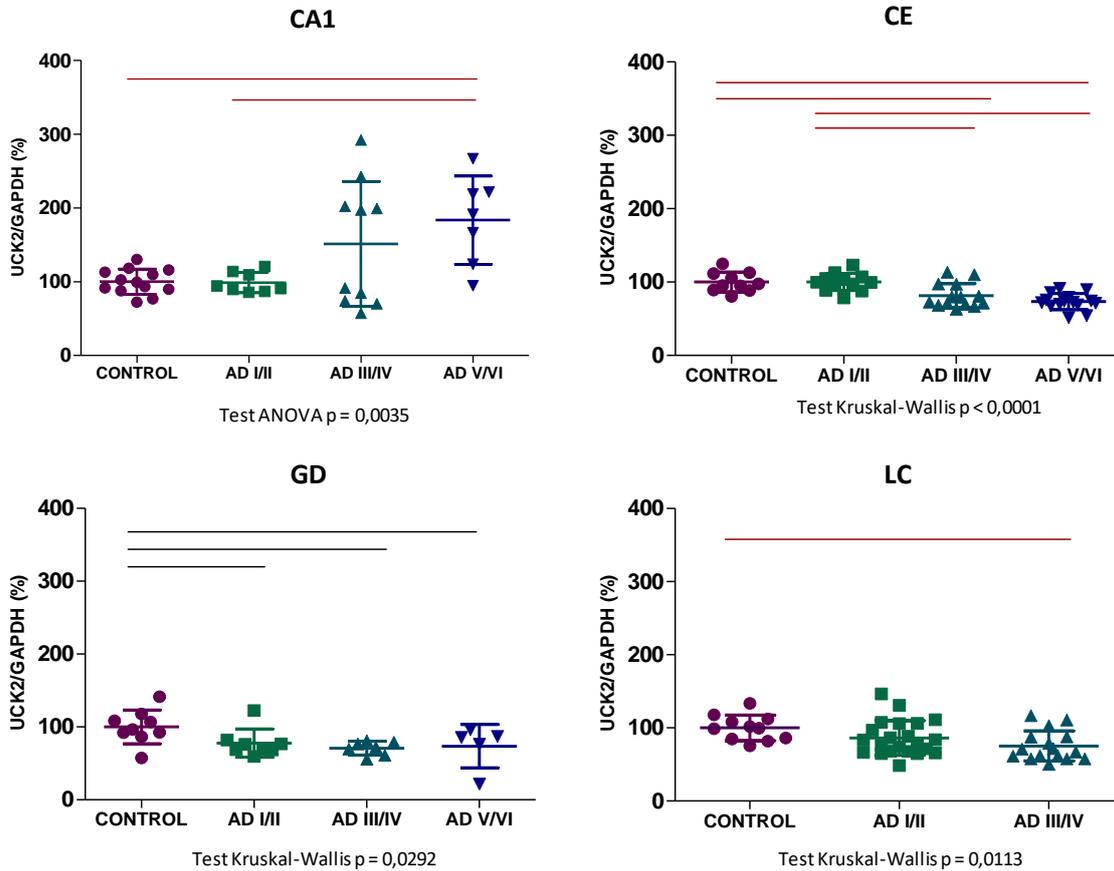
Cuando nos centramos en los niveles de mRNA de DHODH, normalizados por los niveles de mRNA de GAPDH, se observa que no hay variaciones entre grados de AD en ninguna de las regiones (Figura 3.23). Ya que los grados de AD tienen una relación significativa con las edades de los individuos, se estudió si había también una correlación entre las edades de los individuos y sus niveles de mRNA para DHODH en las diferentes regiones cerebrales, pero no existe. También se descartó una asociación entre estos valores de mRNA y el sexo de los individuos o el tiempo post-mortem de las muestras, ya que la relación no es significativa en las cuatro regiones.



**Figura 3.23.** Representación mediante diagrama de puntos de los niveles de mRNA de DHODH, normalizado para los niveles de mRNA de GAPDH, en las diferentes regiones cerebrales en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI. El diagrama muestra los valores de cada una de las muestras, su media y la desviación estándar.

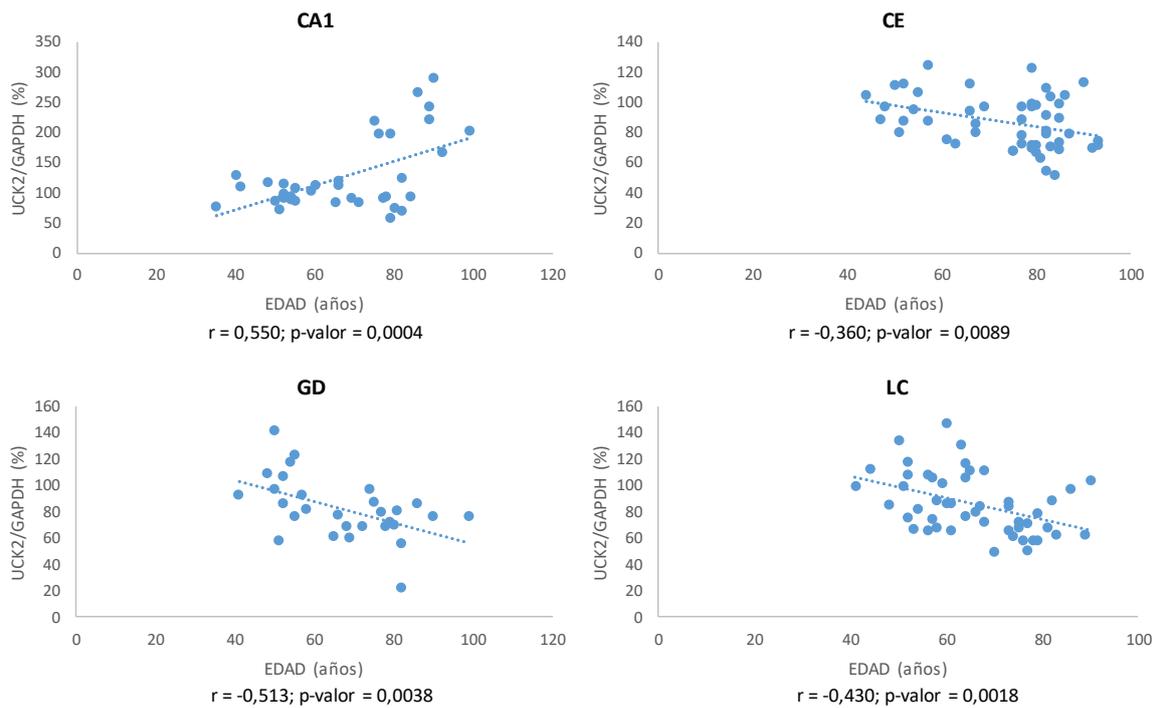
### 3.2.3. Niveles de mRNA de UCK2

Por otro lado, los niveles de mRNA de UCK2 sí que muestran una asociación con el grado de la enfermedad (Figura 3.24). El patrón de evolución señala que los niveles de mRNA de UCK2 disminuyen según progresa la enfermedad, a excepción de la región CA1 en la que los niveles aumentan con el grado de AD.



**Figura 3.24.** Representación mediante diagrama de puntos de los niveles de mRNA de UCK2, normalizado para los niveles de mRNA de GAPDH, en las diferentes regiones cerebrales en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI. El diagrama muestra los valores de cada una de las muestras, su media y la desviación estándar. Las rayas negras indican  $p < 0,05$  y las rojas representan un p-valor marcado por las pruebas post hoc para cada caso.

Dada la asociación de la edad de los individuos con el grado de AD se compararon los niveles de mRNA de UCK2 con las edades, encontrando una correlación significativa entre ambos factores (Figura 3.25). La correlación, al igual que ocurre con los grados de AD, fue negativa. Un aumento de la edad supone una disminución de los valores de mRNA de UCK2, a excepción, de nuevo, de CA1 donde los valores aumentan con la edad.



**Figura 3.25.** Representación de la correlación entre la edad en las diferentes regiones cerebrales y los niveles de mRNA de UCK2 normalizado para GAPDH. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo.

La asociación de los niveles de mRNA de UCK2 y el grado de enfermedad de los individuos, o su correlación con la edad, podría deberse a una variación en los niveles de mRNA del gen con el que se normaliza, *GAPDH*. Sin embargo, este aumento también estaría afectando a los niveles de mRNA de DHODH, y no es así. Además, la bibliografía señala que en cerebros de rata no se observa una alteración relacionada con la edad en los niveles de mensajero de GAPDH [140]. Asimismo, *GAPDH* se expresa de forma similar en muestras de cerebro de pacientes con AD e individuos sanos y no varía según la edad a la que mueren los individuos [141]. Estas observaciones sugieren que el gen *GAPDH* se puede usar como referencia endógena en el estudio de cerebros con AD y no es el responsable de las variaciones observadas en los niveles de mRNA de UCK2.

Una regulación de la transcripción de *UCK2* por sus productos UMP o CMP, u otros nucleótidos de pirimidina, podría explicar los resultados. Y aunque no se ha encontrado ningún estudio sobre los niveles de nucleótidos de pirimidina en pacientes con AD, o en cerebros sanos, o de cómo estos varían con la edad, se esperaría que un exceso de nucleótidos de pirimidina afectara a ambas vías, por lo que la expresión de DHODH también debería verse afectada.

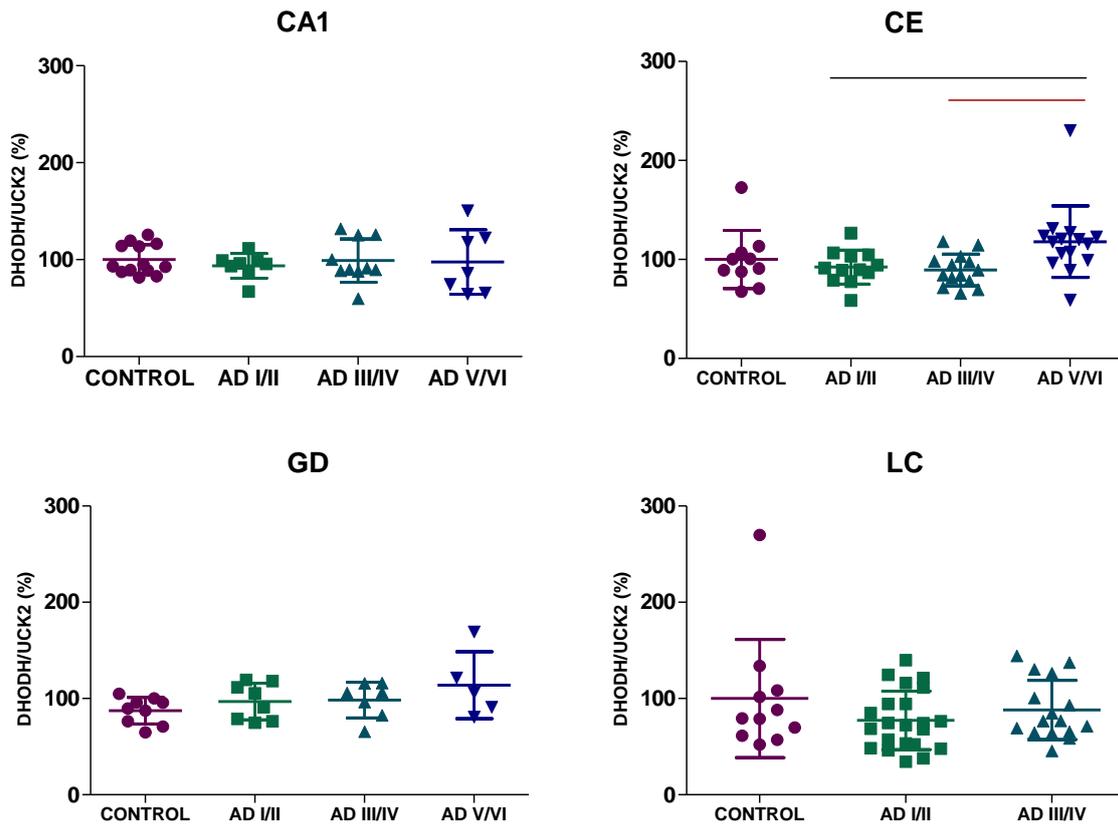
La enzima UCK2 requiere ATP para poder fosforilar uridina y citidina. Por lo que una disminución en la producción de energía podría acabar afectando a la transcripción de UCK2. Como el principal proveedor de energía para la actividad neuronal es el sistema OXPHOS [142], una posible explicación sería que la disfunción en el sistema OXPHOS, observada en los pacientes con AD, fuera lo que provocara la disminución de los niveles de mRNA de UCK2 en cerebro.

La sustitución de neuronas por astrocitos, astrogliosis, podría ser otra explicación para las variaciones en los niveles de mRNA de UCK2. Sin embargo, en pacientes con AD no existe una correlación significativa entre la edad de muerte y los niveles de astrogliosis en la corteza entorrinal o la región CA1 del hipocampo [143]. Además, en modelos de ratón con AD, la astrogliosis reactiva se desarrolla solo en algunas regiones del cerebro, pero no en todo él. La proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de las células de la glía, es la proteína distintiva en astrocitos. Se ha demostrado que los perfiles GFAP-positivos son sustancialmente mayores en CA1 y GD. En pacientes con AD se observaron valores de astrogliosis similares en CA1, GD y EC [143]. Sin embargo, nuestros resultados sobre los niveles de mRNA de UCK2 muestran un patrón similar en GD y EC, pero diferente al de CA1.

Si esta disminución de los niveles de mRNA de UCK2 se corresponde con una disminución en la actividad de la ruta de salvamento de pirimidinas, la vía de biosíntesis *de novo* no estaría compensando esta disminución, y los sujetos con AD mostrarían menores concentraciones de uridina en plasma y fluido cerebro espinal, como señalan algunos estudios [144]–[147]. Esto sugeriría que los pacientes con AD presentan también una deficiencia en numerosas funciones celulares en las que el metabolismo de la uridina está implicado y que su administración terapéutica mejoraría las vías bioquímicas relacionadas con ella. Se ha demostrado que el tratamiento con uridina atenúa los daños en el aprendizaje y en la memoria observados en ratas estresadas y en modelos de ratones con AD [59], [148]–[153].

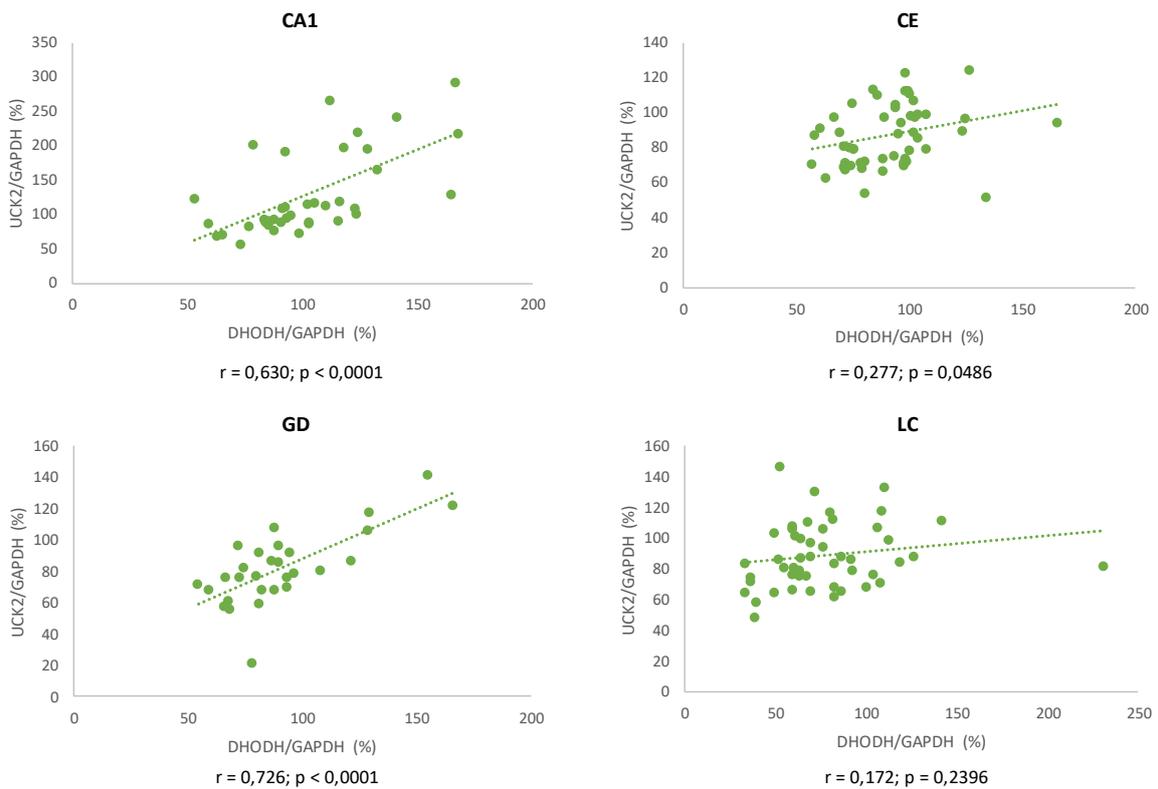
### 3.2.4. Relación entre los niveles de mRNA de DHODH y UCK2

Se realiza el cociente entre los niveles de mRNA de DHODH y UCK2 para ver si este varía con el grado de enfermedad (Figura 3.26). En la corteza entorrinal la asociación entre el cociente DHODH/UCK2 y el grado de AD fue significativa (Test Kruskal-Wallis  $p = 0,0085$ ). En esta, los grados V y VI presentaron valores significativamente más elevados que los grados más bajos.



**Figura 3.26.** Representación mediante diagrama de puntos de los niveles de mRNA del cociente de DHODH/UCK2 en las diferentes regiones cerebrales en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI. El diagrama muestra los valores de cada una de las muestras, su media y la desviación estándar. Las rayas negras indican  $p < 0,05$  y las rojas representan un p-valor marcado por las pruebas post hoc para cada caso

Al analizar la correlación de los niveles de mRNA de DHODH y los de UCK2 de los individuos, se observa que sí que hay una asociación significativa en tres de las cuatro regiones (CA1, GD y CE) (Figura 3.27). En los tres casos se trata de una correlación positiva, en la que los individuos con mayor porcentaje de expresión de mRNA de DHODH también poseen niveles más elevados de mRNA de UCK2. Esto podría estar indicando que no existe una compensación entre rutas, una alta obtención de nucleótidos de pirimidina por parte de la ruta de síntesis *de novo* no estaría provocando una inhibición de la ruta de salvamento de nucleótidos de pirimidina, y viceversa.

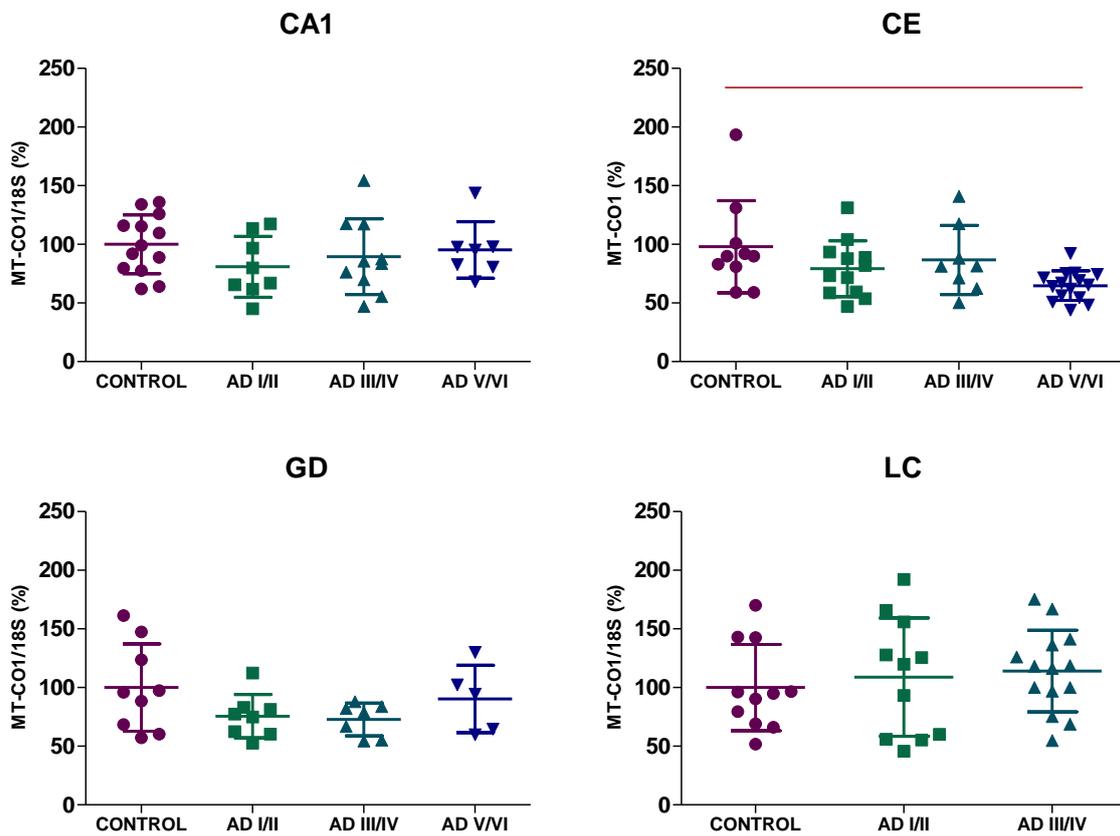


**Figura 3.27.** Representación de la correlación en las diferentes regiones cerebrales de los niveles de mRNA de DHODH y UCK2 normalizados para los niveles de mRNA de GAPDH. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo.

### 3.2.5. Relación con el sistema OXPPOS

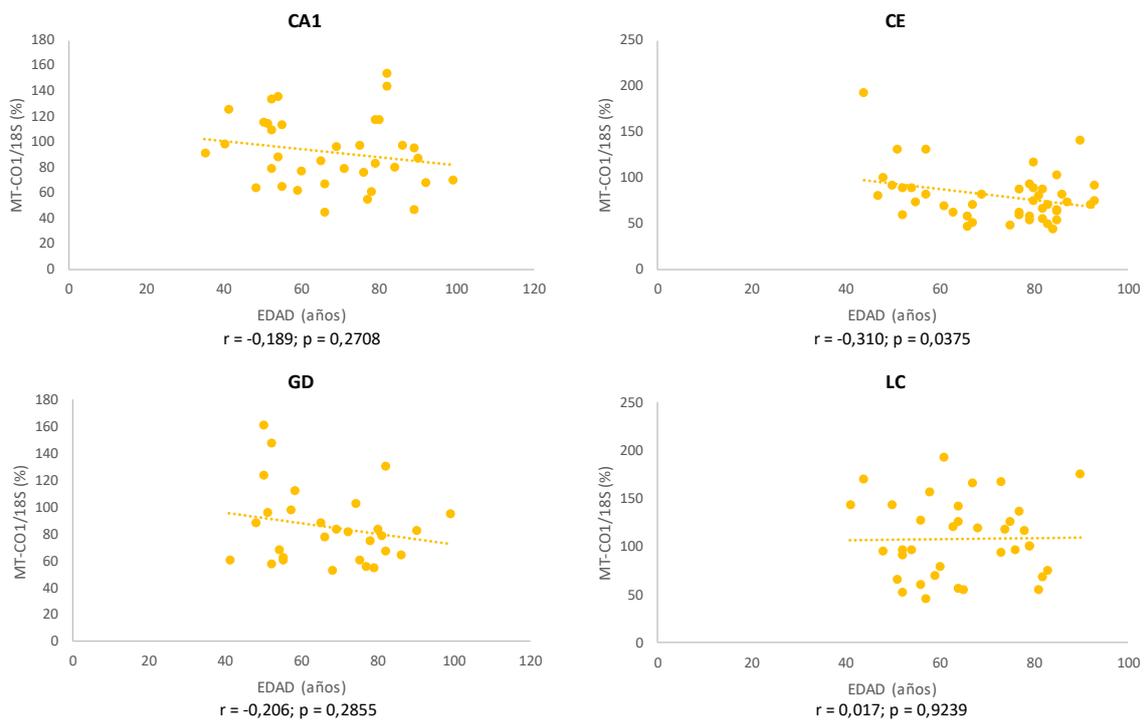
Si la hipótesis de la caída de los niveles de mRNA de la enzima UCK2 debido a bajos niveles de ATP por parte del sistema OXPPOS fuera cierta, quizás alguna variable relacionada con el sistema OXPPOS debería presentar alguna asociación con los grados de AD. Por ello, se estudió los niveles de mRNA de la subunidad 1 de la citocromo c oxidasa (MT-CO1), el CIV del sistema OXPPOS.

Aunque la asociación entre niveles de mRNA de MT-CO1 con los grados de AD no fue significativa en tres de las regiones, sí que existe una asociación significativa de los niveles de mRNA de MT-CO1 con el grado de AD en CE (Test Kruskal-Wallis  $p = 0,0287$ ). En este caso, los pacientes con grado V y VI presentan unos valores significativamente menores que los individuos sanos (Figura 3.28).



**Figura 3.28.** Representación mediante diagrama de puntos de los niveles de mRNA de MT-CO1 en las diferentes regiones cerebrales en cada uno de los grados de la enfermedad. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo. Grados de AD: AD I/II: grado I y II; AD III/IV: grado III y IV; AD V/VI: grado V y VI. El diagrama muestra los valores de cada una de las muestras, su media y la desviación estándar. Las rayas rojas indican una significancia de acuerdo con el p-valor marcado para cada caso por las pruebas post hoc.

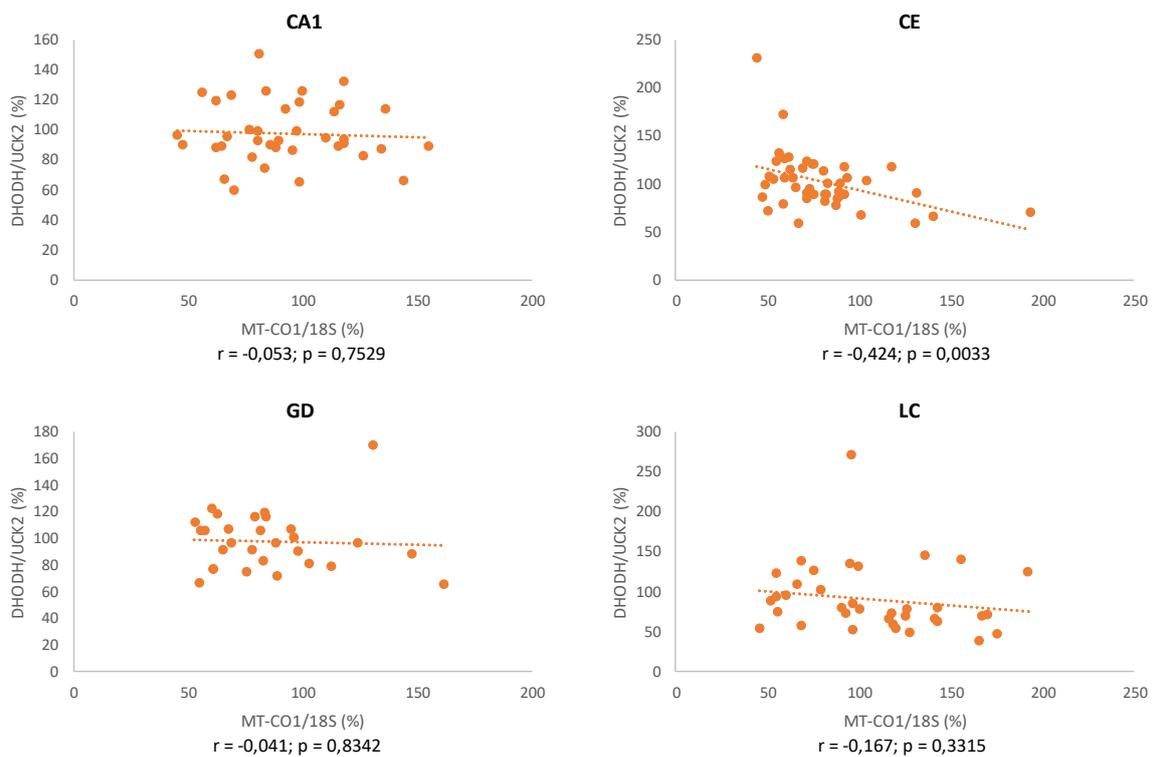
Se estudió la correlación de los niveles de mRNA de MT-CO1 con la edad de los individuos y se observó que existe una correlación significativa entre la edad y los niveles de mRNA de MT-CO1 en la corteza entorrinal, donde los niveles bajan según avanza la edad de los pacientes (Figura 3.29). Estos resultados concordarían con los obtenidos al estudiar los niveles de mRNA para MT-CO1 en ratas y ratones, donde se muestra que los valores de mRNA son más bajos en ratas de 28 meses que en las de 9 [154] y que los niveles de mRNA para las tres subunidades del CIV codificadas por el mtDNA son menores en la corteza cerebral de ratones de 24 que en los de 18 meses [155].



**Figura 3.29.** Representación de la correlación entre la edad y los niveles de mRNA de MT-CO1, normalizados para los niveles de rRNA de 18S, en las diferentes regiones cerebrales. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo.

Esta disminución en los niveles de mRNA de MT-CO1 asociada a la edad o al grado de AD podría deberse a un aumento en la expresión del gen que normaliza, el 18S rRNA. Se ha demostrado que la normalización de los niveles de expresión génica usando 18S rRNA o GAPDH produce resultados similares [156]. Además, en cerebros con AD y sanos, la expresión del 18S rRNA no se ve gravemente afectada por la edad de la muerte [141]. Más aún, existe un estudio en el que no se ven diferencias en los niveles de 18s rRNA en corteza entorrinal entre los pacientes con AD y los individuos sanos [157].

Curiosamente, los niveles de mRNA de MT-CO1 no se correlacionan con los niveles de mRNA de DHODH o UCK2, pero si se correlacionan negativamente con el cociente DHODH/UCK2 en la CE (Figura 3.30). Esta relación DHODH/UCK2 eliminaría un posible efecto del gen GAPDH que se usó para normalizar. En la CE, como ya se ha mostrado, este cociente se asocia con los grados de AD, siendo significativamente mayor en los grados AD V/VI.



**Figura 3.30.** Representación de la correlación entre los niveles de mRNA de MT-CO1, normalizados para los niveles de rRNA de 18S, y el cociente de DHODH/UCK2 en las diferentes regiones cerebrales. CA1: región CA1; CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; LC: locus cerúleo.

Como ya se señaló al tratar la hipótesis de la cascada mitocondrial, pacientes con AD presentan un déficit de CIV cerebral [159]–[181]. También se observan niveles bajos de mRNA de los genes del CIV codificados por el nDNA en pacientes con AD [181], [182]. Además, se ha descrito una disminución en los niveles de mRNA para las subunidades del CIV codificadas por el mtDNA en algunas regiones cerebrales de pacientes con AD [179], [183]–[190]. Esto concordaría con nuestros resultados, que muestran que en la corteza entorrinal los individuos con mayor grado de enfermedad tienen unos niveles de mRNA de MT-CO1 significativamente más bajos.

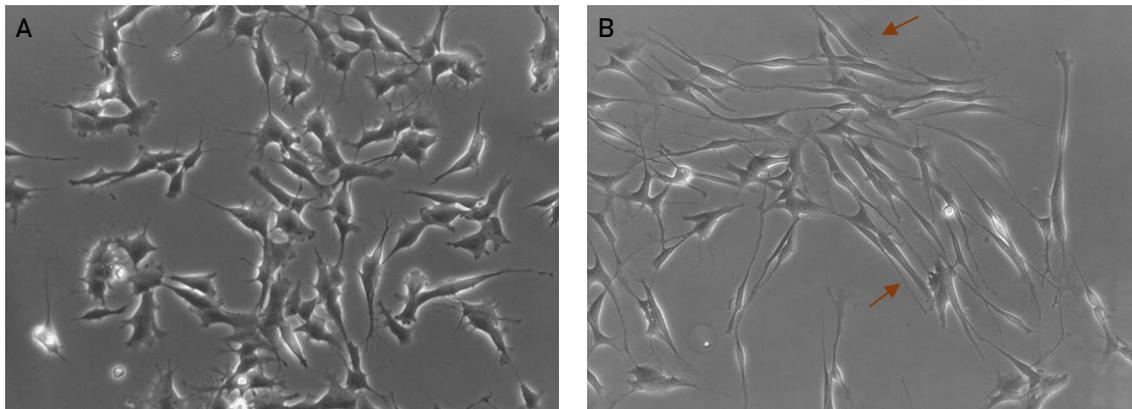
La deficiencia del CIV cerebral es causada por altos niveles de mutaciones del mtDNA, que se acumulan con la edad, en pacientes con AD [191]–[193]. Se ha demostrado que las deleciones del mtDNA, que generalmente incluyen genes del CIV codificados por el mtDNA, reduce la expresión de los genes delecionados [194]. Este hecho podría explicar los niveles más bajos de mRNA para los genes del CIV codificados por mtDNA y la actividad de CIV en cerebros con AD. Al tratar de eludir este bloqueo metabólico, podrían verse aumentadas otras vías que llevan los electrones a la cadena respiratoria, como ocurre con la actividad de la succinato deshidrogenasa, que se ve aumentada en cerebros con AD [195]. La proporción más alta del cociente de los niveles de mRNA de DHODH/UCK2 en la CE en los grados AD V/VI es, quizás, otro intento de compensar el defecto del CIV.

### 3.3. Función OXPPOS, biosíntesis de nucleótidos de pirimidina y diferenciación neuronal

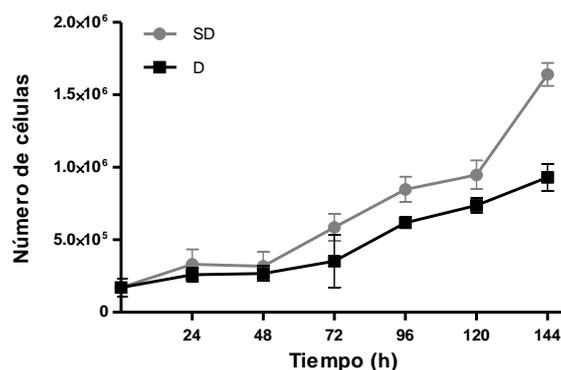
#### 3.3.1. Presentación del modelo celular

Para verificar el efecto de una disfunción del sistema OXPPOS sobre la síntesis de nucleótidos de pirimidina en las neuronas, se utilizó la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y como modelo. Esta línea celular se ha utilizado con frecuencia para estudios de AD. De hecho, considerando los términos "SH-SY5Y" y "Alzheimer's", aparecen más de 1.300 publicaciones en el buscador PubMed.

Estas células se pueden diferenciar a neuronas dopaminérgicas [42]. El protocolo consiste en tratar las células con ácido retinoico (RA) y 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) [196]. El tratamiento con 10  $\mu$ M de RA durante 7 días y 180 nM de TPA durante 3 días induce la diferenciación morfológica hacia un fenotipo neuronal con la extensión de neuritas y la atenuación del crecimiento (Figura 3.31 y 3.32).

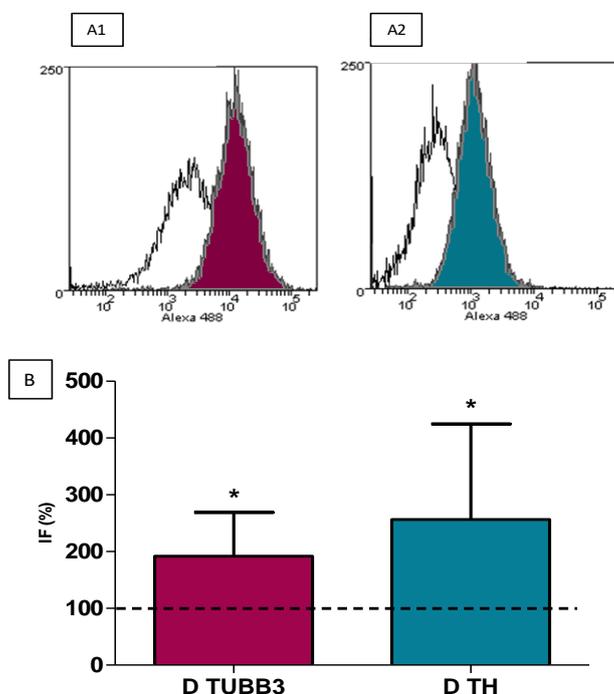


**Figura 3.31.** Imágenes representativas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A: Células sin diferenciar. B: células diferenciadas a neurona. Se señala con flecha rojas las neuritas.

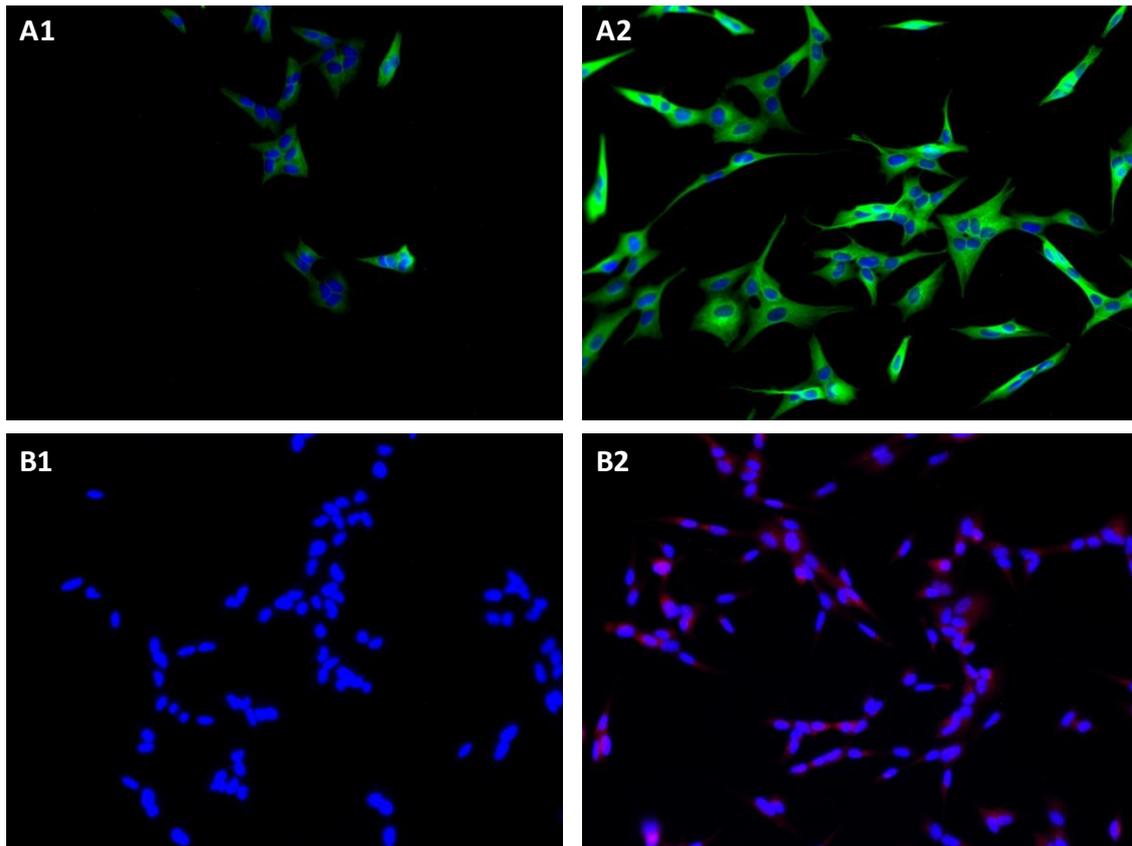


**Figura 3.32.** Gráfica representativa de la curva de crecimiento de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y. SD: células sin diferenciar,  $y=1842990,01492x$ ,  $R^2=0,9483$ ,  $D_T=46,4$  h; D: células con el tratamiento de diferenciación,  $y=1755430,001014x$ ,  $R^2=0,9086$ ,  $D_T=58,9$  h.

Estos cambios morfológicos fueron acompañados de cambios en el fenotipo celular que se analizaron por citometría de flujo e inmunocitoquímica (figura 3.33 y 3.34). Para ello se analizó el marcador neuronal  $\beta$ III-tubulina (TUBB3), constituyente principal de los microtúbulos que permite la adecuada orientación y mantenimiento del axón. También se estudió un marcador de neurona dopaminérgico, la tirosina hidroxilasa (TH), una enzima crítica para la síntesis de dopamina. En ambos casos se produjo un aumento significativo en las células diferenciadas con respecto a las sin diferenciar.



**Figura 3.33.** Niveles de marcadores neuronales en la línea celular SH-SY5Y determinados mediante citometría de flujo. Se muestran imágenes representativas de los histogramas (A1 y A2) y una gráfica de la media de la intensidad de fluorescencia (IF) de cada marcador (B). TUBB3:  $\beta$ -III-Tubulina, D:  $192,1 \pm 76,8$  (11); TH: tirosina hidroxilasa, D-C:  $256,3 \pm 168,6$  (11). D: células diferenciadas. Los valores de las medias de las células sin diferenciar (SD) se consideran el 100 %, representado por la línea de puntos. Test Mann Whitney:  $*p < 0,006$  (D vs. SD).



**Figura 3.34.** Imágenes representativas de la inmunocitoquímica en células SH-SY5Y. Células sin diferenciar (A1) y diferenciadas (A2) marcadas con anti-TUBB3. Células sin diferenciar (B1) y diferenciadas (B2) marcadas con anti-TH.

### 3.3.2. Enzimas de la síntesis de pirimidinas en las células SH-SY5Y

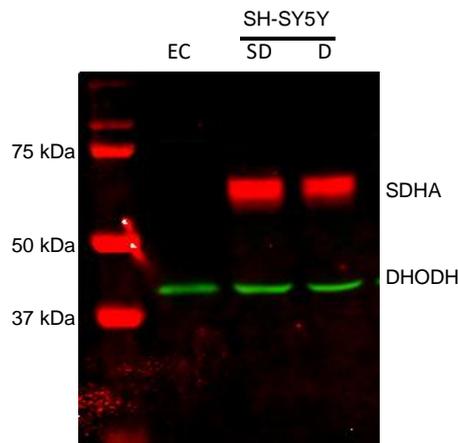
En primer lugar, se estudió si las células de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y expresaban mRNA para DHODH y UCK2. Mediante qPCR se obtuvieron unos niveles que, al normalizarlos con GAPDH, resultan ser similares a los mostrados en la base de datos *The Human Protein Atlas* para la línea SH-SY5Y (Tabla 3.5). Además, el resultado obtenido en la línea celular SH-SY5Y es comparable con el obtenido en el cerebro humano adulto (entre 5-12 para DHODH/GAPDH, 28-71 para UCK2/GAPDH y 0,10-0,23 para el cociente DHODH/UCK2).

**Tabla 3.5.** Niveles de mRNA para DHODH y UCK2 en la línea celular SH-SY5Y. Los números indican los transcritos del gen particular por mil transcritos del gen normalizador, *GAPDH*.

	DHODH/GAPDH	UCK2/GAPDH	DHODH/UCK2
<i>The Human Protein Atlas</i> (SH-SY5Y SD)	3,0	21,1	0,14
SH-SY5Y sin diferenciar	8,3 ± 1,6	48,3 ± 9,1	0,17
SH-SY5Y diferenciada	7,4 ± 1,5	40,3 ± 3,9	0,18

Se confirmó, de este modo, que las células proliferativas expresan mRNA de DHODH y UCK2. Además, se observó que la diferenciación neuronal no afectaba a los niveles de mRNA para estas proteínas, DHODH y UCK2. Los niveles de mRNA de DHODH son 5,8 y 5,4 veces más bajos en las células proliferantes y diferenciadas, respectivamente, que los del mRNA de UCK2. Estos valores son, una vez más, similares a los del cerebro humano (entre 4,3 y 9,7, dependiendo de la región).

Igualmente, el Western blot para la proteína DHODH confirma su expresión tanto en las células sin diferenciar como en las diferenciadas a neurona (Figura 3.35). La única banda que se observó se corresponde con el tamaño esperado para la enzima (43 kDa) y coincide con la de la enzima recombinante comercial. Además, anteriormente, mediante el análisis de proteómica dirigida, se confirmó que la banda observada en el Western blot pertenecía a la proteína de interés (Anexo II).



**Figura 3.35.** Imagen representativa del Western blot de DHODH en células SH-SY5Y sin diferenciar (SD) y diferenciadas (D), y enzima DHODH comercial (EC). SDHA: subunidad A de la succinato deshidrogenasa (70 kDa).

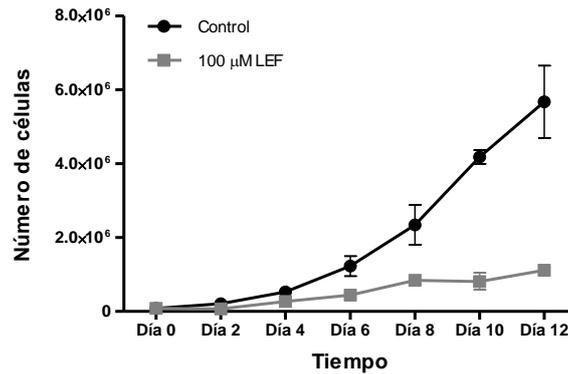
De esta manera, se puede señalar que la expresión de mRNA para las enzimas de las dos rutas de obtención de nucleótidos de pirimidina en la línea celular SH-SY5Y es similar a la observada en el cerebro. Además, no se aprecian diferencias en los niveles de proteína DHODH entre las células sin diferenciar y diferenciadas, sugiriendo que la ruta de síntesis *de novo* de pirimidina sigue estando presente una vez que las células se diferencian.

### **3.3.3. Efecto de la inhibición directa de la enzima DHODH sobre la diferenciación neuronal**

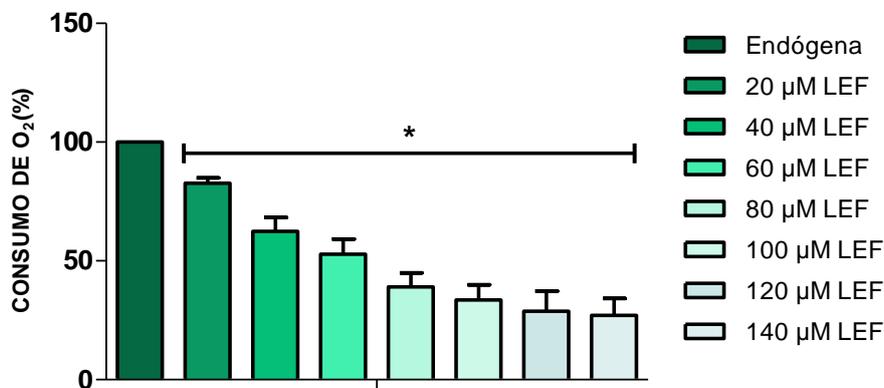
La vía de síntesis *de novo* de pirimidinas es importante para las células en proliferación. La leflunomida, administrada por vía oral, se convierte casi por completo en su metabolito activo, teriflunomida, que inhibe la enzima DHODH. Al inhibirse la actividad de la enzima disminuye la disponibilidad de nucleótidos de pirimidina y con ello la proliferación celular. Por ello, este inhibidor, se utiliza para el tratamiento de la artritis reumatoide y como potente medicamento contra el cáncer [197]. Se ha visto que, durante el tratamiento, los pacientes pueden alcanzar concentraciones plasmáticas en estado de equilibrio de 200  $\mu\text{M}$  de teriflunomida [198].

Las pruebas que conectan esta enzima con la funcionalidad mitocondrial son numerosas. En células de ratón y humanas, la disminución de los niveles de DHODH disminuye la producción de ATP mitocondrial y el potencial de membrana interna [66], [199]. La concentración de ATP mitocondrial depende del potencial de membrana interna mitocondrial. Potencial de membrana que se ve reducido por la leflunomida en células humanas [200]. Además, este potencial de membrana interna mitocondrial es generado por el flujo de electrones a través de la cadena respiratoria que, a su vez, está asociado al consumo de oxígeno, y la leflunomida, o su metabolito teriflunomida, disminuyen el consumo de oxígeno en células de ratón y humanas [57], [198], [201], [202].

En nuestro caso, se observó que en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, una concentración de leflunomida de 100  $\mu\text{M}$  redujo en gran medida la proliferación celular (Figura 3.36). También se redujo el consumo de oxígeno hasta un 33,5% residual (Figura 3.37). Estos resultados sugieren que una parte importante del consumo de oxígeno y la producción de energía en las células en proliferación se debe a la biosíntesis de pirimidinas. En las células humanas, la leflunomida causa proliferación mitocondrial [200], lo que sugiere una respuesta compensatoria.



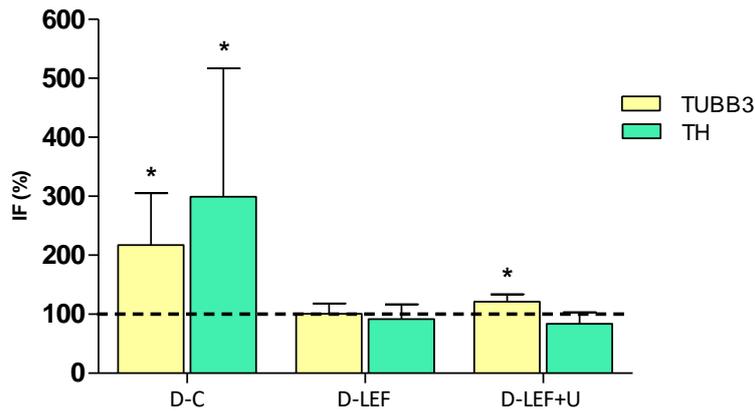
**Figura 3.36.** Efecto de la leflunomida (LEF) en la viabilidad celular en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y. Control:  $y=305394^{0,01032x}$ ,  $R^2=0,9466$ ,  $D_T=67,2$  h; 100  $\mu$ M LEF:  $y=157699^{0,006982x}$ ,  $R^2=0,8476$ ,  $D_T=99,3$  h.



**Figura 3.37.** Gráfica representativa del consumo de oxígeno de la línea SH-SY5Y en presencia de leflunomida (LEF). Los valores obtenidos al considerar la respiración endógena de la línea SH-SY5Y cultivada en medio control se consideran el 100 %. Test Mann Whitney: \* $p < 0,0209$  (consumo de O<sub>2</sub> en presencia de LEF vs en ausencia). Existe una correlación significativa entre el consumo de O<sub>2</sub> y las concentraciones de leflunomida,  $r = -0,959$ ,  $p < 0,0001$ ;  $y = -0,5237x + 89,956$ ,  $R^2 = 0,9204$ .

El efecto de la leflunomida sobre la función OXPHOS, la relevancia de esta función en la diferenciación neuronal [203], la presencia de la vía de síntesis *de novo* de pirimidinas en neuronas y su alteración en pacientes grado V/VI de AD en la corteza entorrinal, sugieren que esta vía también es importante en las células no proliferativas. Por ello, para estudiar el papel de esta vía en las neuronas, se analizó el efecto de la leflunomida sobre la diferenciación neuronal.

La presencia de 100  $\mu$ M de leflunomida durante el proceso de diferenciación neuronal evitó que ésta se produjera, acorde con los valores de TUBB3 y TH, respectivamente (Figura 3.38). Cuando se añadió uridina 200  $\mu$ M, esta fue capaz de aumentar ligeramente los niveles de TUBB3, pero no de TH, en las células tratadas con leflunomida.

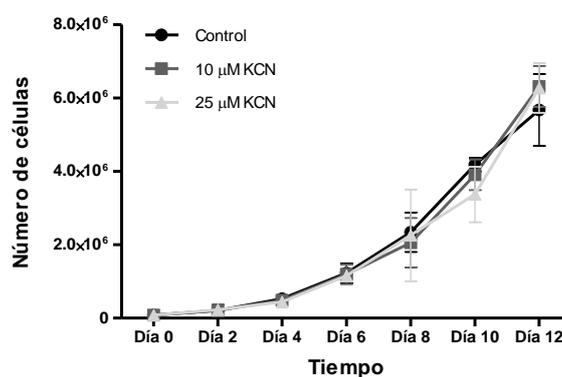


**Figura 3.38.** Niveles de marcadores neuronales en la línea celular SH-SY5Y en presencia de leflunomida determinados mediante citometría de flujo. D-C: células diferenciadas; D-LEF: células diferenciadas con leflunomida 100  $\mu$ M; D-LEF+U: células diferenciadas con leflunomida 100  $\mu$ M y uridina 200  $\mu$ M. Gráfica representativa de la media de la intensidad de fluroescencia (IF) de cada marcador. TUBB3:  $\beta$ III-Tubulina, D-C: 235,1  $\pm$  88,2 (6); D-LEF: 100,7  $\pm$  17,6 (6); D-LEF+U: 121,4  $\pm$  12,6 (6). TH: tirosina hidroxilasa, D-C: 336,7  $\pm$  217,5 (6); D-LEF: 91,6  $\pm$  24,9 (6); D-LEF+U: 83,6  $\pm$  19,7 (6). Los valores de las medias de las células sin diferenciar se consideran el 100 %, representado por la línea de puntos. Test Mann Whitney: \*p < 0,05 (D vs. SD).

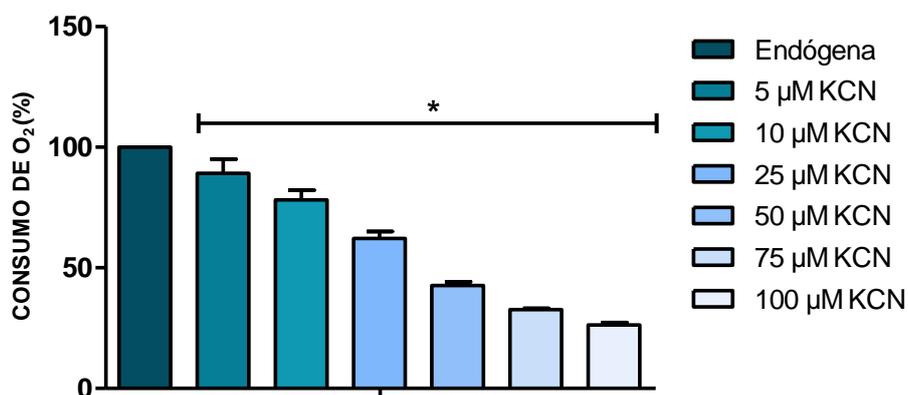
Además del efecto de la leflunomida en la vía de biosíntesis *de novo* de pirimidinas, la inhibición de otras funciones celulares, como el consumo de oxígeno y la producción de energía, podría ser la razón por la que la uridina no consiguiera recuperar la diferenciación. Apoyando este resultado, se ha observado que la uridina añadida externamente al medio de cultivo no mejora el potencial de membrana interna mitocondrial ni la proliferación mitocondrial en una línea celular humana tratada con leflunomida, a pesar de que la uridina es capaz de normalizar la progresión del ciclo celular [200].

### 3.3.4. Efecto de la inhibición indirecta de la enzima DHODH sobre la diferenciación neuronal

El cianuro de potasio (KCN) es un inhibidor del CIV. Este compuesto se ha visto que suprime el consumo de oxígeno inducido por DHO en las mitocondrias de diferentes tejidos de rata y células de ratón [57], [63]. En la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, KCN 10 y 25  $\mu\text{M}$  no afectan la proliferación celular (Figura 3.39). Sin embargo, estas concentraciones de KCN disminuyen el consumo de oxígeno a un 78 y 62 % residual, respectivamente (Figura 3.40).

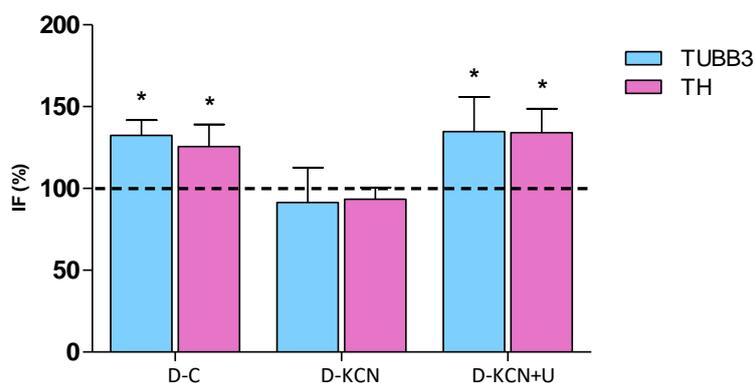


**Figura 3.39.** Efecto del cianuro (KCN) en la viabilidad celular en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y. Control:  $y=305394^{0,01032x}$ ,  $R^2=0,9466$ ,  $D_T=67,2$  h; 10  $\mu\text{M}$  KCN:  $y=157699^{0,006982x}$ ,  $R^2=0,9737$ ,  $D_T=58,7$  h; 25  $\mu\text{M}$  KCN:  $y=196220^{0,12032x}$ ,  $R^2=0,9403$ ,  $D_T=57,6$  h.



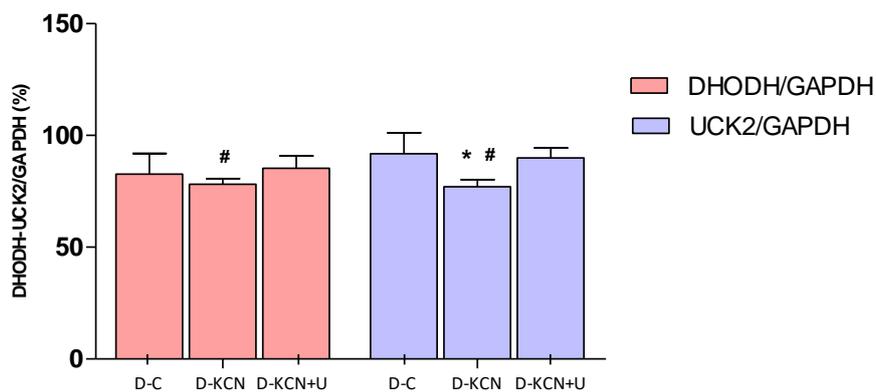
**Figura 3.40.** Gráfica representativa del consumo de oxígeno de la línea SH-SY5Y en presencia de cianuro (KCN). Los valores obtenidos al considerar la respiración endógena de la línea SH-SY5Y cultivada en medio control se consideran el 100 %. Test Mann Whitney:  $*p < 0,05$  (consumo de O<sub>2</sub> en presencia de KCN vs en ausencia). Existe una correlación significativa entre el consumo de O<sub>2</sub> y las concentraciones de KCN,  $r = -0,956$ ,  $p = 0,0001$ ;  $y = -0,7154x + 88,687$ ,  $R^2 = 0,9142$ .

Destacando la importancia de la función OXPHOS para la diferenciación neuronal, se ha observado que el KCN es capaz de inhibir significativamente la diferenciación de las células progenitoras neurales, derivadas de células madre pluripotentes inducidas humanas, en neuronas dopaminérgicas [199]. Similares resultados se obtuvieron en las células de neuroblastoma SH-SY5Y, donde las células diferenciadas en presencia de KCN 10  $\mu$ M no mostraron niveles incrementados de TUBB3 y TH (Figura 3.41). Por lo tanto, este compuesto, que reduce la actividad de la cadena respiratoria, evita la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas.



**Figura 3.41.** Niveles de marcadores neuronales en la línea celular SH-SY5Y en presencia de cianuro determinados mediante citometría de flujo. D-C: células diferenciadas; D-KCN: células diferenciadas con cianuro 10  $\mu$ M; D-KCN+U: células diferenciadas con cianuro 10  $\mu$ M y uridina 200  $\mu$ M. Gráfica representativa de la media de la intensidad de fluorescencia (IF) de cada marcador. TUBB3:  $\beta$ III-Tubulina, D-C: 132,4  $\pm$  9,3 (3); D-KCN: 91,4  $\pm$  21,4 (3); D-KCN+U: 134,8  $\pm$  21,1 (3). TH: tirosina hidroxilasa, D-C: 125,6  $\pm$  13,4 (3); D-KCN: 93,4  $\pm$  7,2 (3); D-KCN+U: 134,8  $\pm$  14,7 (3). Los valores de las medias de las células sin diferenciar se consideran el 100 %, representado por la línea de puntos. Test Mann Whitney: \*p < 0,05.

Curiosamente, KCN 10  $\mu$ M no provoca una variación en los niveles de expresión de mRNA de DHODH en células diferenciadas, pero sí en los niveles de UCK2 (Figura 3.42). Este resultado apoya la idea, previamente comentada, acerca de una potencial regulación negativa de la expresión de UCK2 por bajos niveles de ATP.



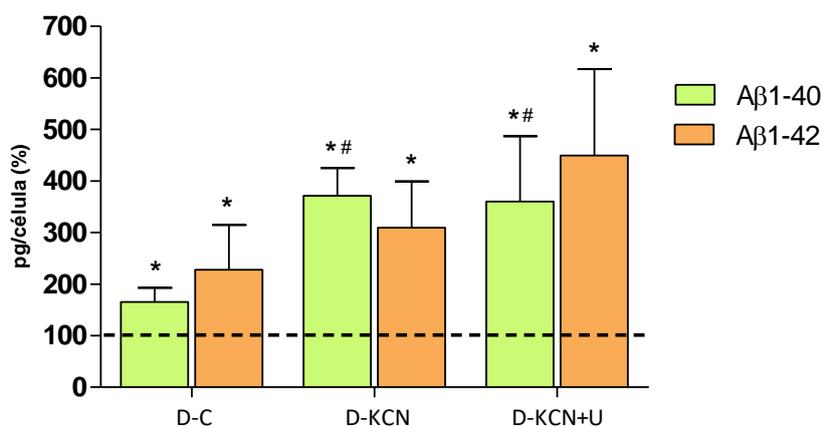
**Figura 3.42.** Gráfica representativa de los niveles de mRNA de DHODH y UCK2 corregidos para los niveles de mRNA de GAPDH en células SH-SY5Y. D-C: células diferenciadas; D-KCN: células diferenciadas en presencia de cianuro 10  $\mu$ M; D-KCN+U: células diferenciadas en presencia de cianuro 10  $\mu$ M y uridina 200  $\mu$ M. DHODH: D-C:  $82,6 \pm 9,3$  (3); D-KCN:  $78,2 \pm 2,6$  (3); D-KCN+U:  $85,2 \pm 5,6$  (3). UCK2: D-C:  $91,9 \pm 9,3$  (3); D-KCN:  $77,0 \pm 3,1$  (3); D-KCN+U:  $89,9 \pm 4,5$  (3). Los valores de las medias de las células sin diferenciar se consideran el 100 %. Test Mann Whitney: \* $p < 0,05$  (frente a D-C); # $p$ -valor  $< 0,05$  (frente a D-KCN+U).

La uridina es capaz de proteger fibroblastos de pacientes con AD y células progenitoras neuronales humanas normales (NHNP) contra la toxicidad de azida, otro inhibidor de CIV [58], [59]. La administración de uridina a ratas envejecidas aumenta los niveles de neurofilamentos cerebrales [114]. Por otro lado, ya se conocía uno de los efectos de la uridina sobre la diferenciación neuronal. Así, en células de feocromocitoma PC12 de rata y células de neuroblastoma LAN-5 y SH-SY5Y humanas y N2a de ratón, la uridina exógena potencia la diferenciación celular evidenciada por un mayor número de células con neuritas, de neuritas por célula, ramificación de neuritas, longitud de neurita y niveles de neurofilamentos neuríticos [59], [103], [105], [204].

Cuando las células de neuroblastoma SH-SY5Y fueron tratadas con KCN, se observó que la uridina 200  $\mu$ M puede restaurar los niveles de TUBB3 y TH (Figura 3.40). La uridina también recupera los niveles de mRNA de UCK2 en las células tratadas con KCN (Figura 3.41). Quizás, un exceso de sustrato esté estimulando la transcripción de UCK2.

Aunque no existe ningún estudio de cómo se afectan los niveles de  $A\beta$  con KCN en cultivos celulares, sí que se ha estudiado la inhibición del CIV con azida sódica. En neuronas de pollo, retina de rata, líneas celulares de rata, mono y humano, plaquetas humanas y fibroblastos de pacientes con AD, la inhibición por azida sódica desplaza el metabolismo de  $A\beta$ PP desde la ruta no amiloidogénica a la amiloidogénica [25], [26], [32], [34], [59], [205]–[208].

En la línea celular empleada, SH-SY5Y, se ha visto que los niveles de mensajeros de la familia de proteínas APP están aumentados en células SH-SY5Y diferenciadas [209]. Cuando, en el laboratorio, se analizaron los niveles de A $\beta$  secretados en presencia de cianuro y con cianuro y uridina en células diferenciadas se vio que tanto los valores de A $\beta$ 1-40 como A $\beta$ 1-42 son mucho más elevados que sus correspondientes niveles en células sin diferenciar (Figura 3.43). Resultado esperado, ya que la proteína APP tiene un papel en el crecimiento neuronal [210], [211] y además está sujeta a una regulación por parte del ácido retinoico empleado para diferenciar las células a neuronas [209].



**Figura 3.43.** Gráfica representativa de los niveles de A $\beta$ 1-40 y A $\beta$ 1-42 en células SH-SY5Y. D-C: células; D-KCN: células diferenciadas en presencia de cianuro 10  $\mu$ M; D-KCN+U: células diferenciadas en presencia de cianuro 10  $\mu$ M y uridina 200  $\mu$ M. A $\beta$ 1-40: D-C: 165,6  $\pm$  27,3 (3); D-KCN: 371,5  $\pm$  53,2 (3); D-KCN+U: 360,3  $\pm$  126,7 (3). A $\beta$ 1-42: D-C: 227,9  $\pm$  86,7 (3); D-KCN: 309,3  $\pm$  89,8 (3); D-KCN+U: 449,3  $\pm$  167,9 (3). Los valores de las medias de sin diferenciar se consideran el 100 %, representado por la línea de puntos. Test Mann Whitney: \*p < 0,05 (D vs SD), #p < 0,05 (frente a D-C).

La administración de uridina aumenta los niveles de los compuestos derivados de esta, como la CDP-colina, UDP-GlcNAc o fosfolípidos [115], [212], [213]. Este aumento de CDP-colina y fosfolípidos aumenta la síntesis de membrana plasmática y mejora la función neuronal [212]. Aunque la uridina no recupera los valores de A $\beta$ , sí que es capaz de recuperar el daño provocado por el KCN en la diferenciación y en la expresión de mRNA de las enzimas implicadas en la síntesis de pirimidinas (Figura 3.43).

Un aumento en la O-GlcNAc cerebral también protege frente al daño de tau y A $\beta$  [214]. Actualmente, la uridina es uno de los compuestos que se incluyen en los complejos multinutrientes, como el Souvenaid, recetados a enfermos de Alzheimer para mejorar la memoria [215]. Se ha visto que estos compuestos son capaces de mejorar la reparación y mantenimiento neuronal en ratones transgénicos que sobreexpresan A $\beta$ , mejorando el comportamiento motor, el aprendizaje espacial y reduciendo la ansiedad [59], [216]–[218].



***CONCLUSIONES***



## 4. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas de la realización de la presente tesis son las siguientes:

1. La ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas está activa en cerebro de humano adulto y se localiza en las neuronas.
2. Los pacientes con AD, en los estadios más avanzados de la enfermedad, muestran una alteración de las rutas de síntesis de nucleótidos de pirimidina.
3. La inhibición de la ruta de síntesis *de novo* de pirimidinas, ya sea de forma directa o indirectamente a través de la inhibición del sistema OXPHOS, afecta la diferenciación neuronal. La administración de uridina es capaz de revertir el daño cuando la función OXPHOS, aunque disminuida, aún es suficiente.



## ***MATERIAL Y MÉTODOS***



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. Muestras biológicas y líneas celulares**

En el presente trabajo se utilizó la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y procedente de médula ósea de una niña de 4 años de edad [219].

También se trabajó con muestras de tejido cerebral cedidas por el banco de cerebros del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Universitario de Bellvitge. Estas fueron clasificadas en dos bloques: por un lado, muestras de diferentes regiones cerebrales de tres individuos, enviadas en secciones de tejido congelado a -80 °C y cortes parafinados. Por otro lado, RNA de cuatro regiones cerebrales de 167 muestras, procedentes de individuos con diferentes estadios en la enfermedad de Alzheimer (Anexo III).

### **5.2. Cultivos celulares**

#### **5.2.1. Equipos, materiales y reactivos de cultivo celular**

En el cultivo de células se emplearon diferentes medios y suplementos: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4,5 g/l (25 mM), DMEM libre de glucosa, tampón fosfato (PBS) y suero fetal bovino (FBS) de Gibco™, Invitrogen; uridina, galactosa y piruvato, Sigma.

Para la disociación de las células se utilizó tripsina y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Sigma y TrypLE Express, Invitrogen. Y para su congelación crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma.

Las placas de 100 mm empleadas, así como el resto del material plástico estéril (placas de 6, 12, 24 ó 96 pocillos, tubos Falcon, pipetas, criotubos, etc) y los filtros de 0.22 µm de tamaño de poro (Acrodisc) utilizados para la esterilización de soluciones procedieron de TPP, Suiza.

El trabajo con líneas celulares fue realizado en campanas de flujo laminar modelos LaminAir y NU-437-400E de las marcas Holten y Nuair, respectivamente. Las líneas celulares se mantuvieron durante su crecimiento en incubadores de CO<sub>2</sub>, modelos DHD AutoFlow Incubator de la marca Nuair. Las células se visualizaron en un microscopio invertido modelo DMIL, de la marca Leica.

El conteo del número de células se determinó mediante un contador celular modelo Z2, de la marca Beckman Coulter. Se utilizó una centrifuga Allegra X-22 de la marca Beckman Coulter para la centrifugación de suspensiones celulares. Los medios de cultivo y otros reactivos se aatemperaron, previamente a su utilización, en un baño termostatzado modelo Precistern de la marca P-Selecta. Para el manejo de volúmenes en condiciones de esterilidad se utilizó un pipeteador automático de la marca PipetBoy. La congelación de líneas celulares se realizó en sistemas Mr. Frosty, Sigma.

### **5.2.2. Mantenimiento de cultivos celulares**

Todas las manipulaciones de las células se realizaron en campanas de flujo laminar vertical en condiciones estériles. Las células se cultivaron en ausencia de antibióticos. Las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en placas de 100 mm. Las células se sembraron a densidades que iban desde  $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^6$  células/ml dependiendo del tamaño de placa utilizada y los requerimientos del tipo celular.

El material usado en la manipulación de las células se esterilizó previamente en una autoclave durante 20-30 min a 1,2 atmosferas de presión. Las disoluciones añadidas a los cultivos se esterizaron usando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Las células se cultivaron en un incubador termostatzado a 37 °C, en aire saturado de humedad y con 5 % CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada 2 días. Cuando las células alcanzaron un 80 % de confluencia se lavaron con PBS para eliminar las proteínas del suero que inhiben el efecto de la tripsina y se incubaron con tripsina (0,05 % de tripsina y 0,02 % de EDTA) o TryPLE durante 2-3 min a 37 °C. Se comprobó con un microscopio invertido que las células se hubieran despegado de la placa y se resuspendieron en un volumen de medio 5 veces mayor que el volumen de tripsina utilizado y se centrifugaron a 378 x g durante 5 min. Una vez obtenido el pellet celular este fue procesado según el uso que se le fuera a dar.

Para crecer las células de las líneas de neuroblastoma se empleó DMEM 25 mM suplementado con 10 % de FBS o DMEN libre de glucosa con galactosa 5 mM, según el requerimiento de experimentación.

### **5.2.3. Congelación y descongelación de las líneas celulares**

Para la congelación celular se utilizaron criotubos resistentes al nitrógeno líquido. Las células se tripsinizaron y recogieron en un pellet celular por centrifugación (según condiciones expuestas anteriormente), se resuspendieron en medio de congelación, que consistió en DMEM suplementado con 20 % de FBS y un 10 % de DMSO, este último compuesto actúa como crioprotector. A continuación, los criotubos se introdujeron en un Mr. Frosty, que fue guardado en un congelador a una temperatura de -80 °C. El sistema de congelación Mr. Frosty consiste en un contenedor de policarbonato que contiene alcohol isoamílico y que, al ser sometido a congelación, permite un descenso gradual de la temperatura de 1 °C/min, lo que favorece una buena conservación celular. Las células se mantuvieron en el recipiente aproximadamente durante 24 h en el congelador de -80 °C y a continuación se pasaron a nitrógeno líquido donde se almacenaron hasta su posterior utilización. La cantidad de células congeladas por criotubo fue de entre 1 y 2 millones aproximadamente.

Para la descongelación se tomó un criotubo de células conservado en nitrógeno líquido y el contenido del mismo se resuspendió en un tubo falcon de 15 ml con medio de cultivo. Las células se centrifugaron a 378 x g durante 5 min. El sobrenadante se decantó para eliminar el DMSO, y el pellet de células obtenido se sembró en una placa de cultivo de 100 mm.

### **5.2.4. Recuento celular**

El recuento celular se realizó con el contador Countess™ Automated Cell Counter de Invitrogen. Este contador de células automatizado analiza la viabilidad celular y el conteo de células (concentraciones que van desde  $1 \times 10^4$  hasta  $1 \times 10^7$  células/ml) utilizando el método del azul tripán. El azul tripán es un colorante capaz de penetrar en las células muertas, ya que estas células presentan la membrana plasmática desestructurada. De esta forma solo se tiñen de azul estas células. Para el contaje se mezclaron 10 µl de la suspensión celular y 10 µl del colorante azul tripán.

### 5.2.5. Curvas de crecimiento

Para hacer curvas de crecimiento, con el fin de determinar la velocidad de crecimiento celular en un medio de cultivo determinado, fueron sembradas  $2 \times 10^5$  en una placa de 6 pocillos. Se sembró por triplicado para el conteo de cada día.

Una vez que se adhirieron las células (entre 6 y 24 h), las células de tres de los pocillos de la placa (de cada línea celular en estudio) fueron recogidas (por tripsinización y posterior centrifugación) y el número de células fue contado (según apartado 5.2.4) para establecer el tiempo cero de la curva de crecimiento. Cada 24-48 h se recogieron las células por tripsinización y se contaron por triplicado. El medio de los pocillos restantes se cambió siempre que fue necesario.

Para los cálculos, se representó en una gráfica el número de células frente al tiempo transcurrido entre cada recuento, y se ajustó a una curva exponencial del tipo  $N = ax10^{bt}$ , donde el tiempo de duplicación fue  $DT = \log 2/b$ .

### 5.2.6. Tratamientos con drogas

En los ensayos donde se utilizaron drogas y con el propósito de evidenciar defectos en el sistema de fosforilación oxidativa, limitando para ello la glucólisis, se utilizó DMEM libre de glucosa y suplementado con galactosa 5 mM, piruvato 1 mM y FBS al 10 %. En los experimentos con drogas, éstas se añadieron al medio DMEM suplementado con galactosa a las concentraciones deseadas. El medio se cambió cada 48 horas. Las células fueron expuestas a distintas drogas y determinadas concentraciones, indicadas a continuación:

#### -Inmunosupresor

Leflunomida, LEF (Sigma): inhibe la síntesis de pirimidinas bloqueando la enzima dihidroorotato deshidrogenasa. Stock disuelto en DMSO.

#### -Inhibidores del complejo IV

Cianuro potasio, KCN (Fluka): inhibe el CIV. Stock disuelto en agua.

### **5.3. Diferenciación celular a neuronas dopaminérgicas**

Las células de neuroblastoma fueron sembradas a una densidad de  $2 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 6 pocillos, o  $10^5$  células en las placas de 100 mm, con medio DMEM 25 mM de glucosa, suplementado con 10 % de FBS. Los experimentos se realizaron en galactosa 5 mM. Para la diferenciación se siguió el protocolo de Presgraves [196]. A las 24 h de haber sido sembradas, las células fueron tratadas con ácido trans-retinoico (RA) de Sigma, a una concentración de 10  $\mu$ M durante 5 días. El medio fue reemplazado por medio fresco con RA cada dos días. Al finalizar los 5 días, el RA fue reemplazado del medio por 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) de Sigma, a 180 nM durante 3 días.

### **5.4. Extracción, manipulación y análisis de ácidos nucleicos**

#### **5.4.1. Equipos y materiales utilizados**

Para la extracción de ácidos nucleicos se emplearon los kits comerciales NucleoSpin<sup>®</sup> RNA de Macherey-Nagel y Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche. Para el proceso se utilizó la centrifuga Eppendorf Mini Spin<sup>®</sup> PLUS. Y para la electroforesis de geles horizontales de agarosa de DNA se utilizó el sistema Bio-Rad.

La amplificación de ácidos nucleicos por PCR se realizó en el termociclador de la marca Biometra modelo T3 Thermocycler, en el de la marca Applied Biosystems modelo Veriti Thermalcycler y el de la marca Eppendorf modelo Mastercycler personal.

Los oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa, así como otros reactivos utilizados, el material consumible y los instrumentos StepOne<sup>™</sup> y ViiA 7 fueron de Applied Biosystems.

#### **5.4.2. Extracción del RNA**

##### **5.4.2.1. Obtención de RNA a partir de cultivos celulares**

El RNA total a partir de células en cultivo se extrajo utilizando el kit NucleoSpin RNA II de Macherey-Nagel. Antes de la extracción, las células en cultivo se recogieron por tripsinización. A continuación, se realizaron dos lavados del pellet celular con PBS frío mediante resuspensión y posterior centrifugación. Una vez obtenido el pellet celular, se congeló a  $-80$  °C. En el momento de la extracción se siguieron las instrucciones del fabricante.

También se extrajo RNA de células con trizol. Para ello, trabajando en campana de flujo laminar, el pellet celular fue lisado con 500 µl de TRIZOL (atemperado previamente) durante 5 min. Posteriormente se añadió 100 µl de cloroformo, se dejó actuar durante 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a un nuevo eppendorf al que se añadió 250 µl de isopropanol, y tras invertir el eppendorf varias veces y dejarlo incubar 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 x g 10 min a 4 °C. Una vez retirado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en etanol al 75 % y se centrifugó a 7500 x g 5 min a 4 °C. Por último, tras dejar retirar el etanol y dejar que se evaporaran los restos en un bloque a 55 °C, el RNA se resuspendió en 100 µl de agua libre de RNAsas y se incubó 10 min en un baño a 55-60 °C en agitación.

#### 5.4.2.2. Obtención de RNA a partir de tejido cerebral

En el caso de tejido, para la extracción con el kit NucleoSpin RNA II, como paso previo se homogenizaron secciones de 20 a 30 mg de tejido en el mortero con nitrógeno líquido.

#### 5.4.3. Obtención del cDNA

El cDNA monocatenario se obtuvo utilizando como molde el RNA total extraído a partir de las líneas celulares o tejidos, empleando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. Se cargó 1 µg de RNA o bien, si la concentración no alcanza, se cargó 10 µl de RNA, junto con los reactivos necesarios (Tabla 5.1) en un volumen final de 20 µl:

**Tabla 5.1.** Reactivos necesarios para sintetizar cDNA por PCR de transcripción reversa (RT-qPCR).

Reactivos	Volumen de reacción (µl)
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5
Reaction Buffer 5x	4,0
Protector RNase Inhibitor	0,5
Deoxynucleotide Mix	2,0
Ramdon Hexamer Primer	2,0
H <sub>2</sub> O	Hasta completar volumen

Una vez obtenida la mezcla de reacción se llevaron a cabo los siguientes ciclos de temperatura a distintos tiempos en un termociclador: 25 °C durante 10 min, 55 °C durante 30 min, 85 °C durante 5 s y 4 °C durante 5 min. La muestra de cDNA obtenida se cuantificó y se conservó a -20 °C hasta su uso.

#### **5.4.4. Cuantificación de ácidos nucleicos**

La cantidad de ácidos nucleicos obtenidos se determinó utilizando un ND-1000 spectrophotometer de la marca Nanodrop. Se realizó una lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm de longitud de onda, utilizando un volumen de trabajo muy pequeño (1-2 µl). Tras la realización de un blanco, utilizando para ello el mismo disolvente en el que esté disuelta la muestra de ácidos nucleicos (generalmente agua destilada), la medida de las muestras dio directamente el valor de la concentración de ácidos nucleicos. El cálculo se realizó utilizando la fórmula:

$$DNA (ng/\mu L) = Abs_{260} \times 50 \times V_{dilución}$$

El ratio de absorbancia a 260/280 nm sirve para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos, considerándose un valor óptimo un ratio entre 1,8 y 2. También se utiliza el ratio de pureza secundario 230/280 nm. Los valores óptimos aceptados para esta relación se encuentran en el intervalo de 2,0-2,2.

#### **5.4.5. Cuantificación de la expresión de genes**

##### **5.4.5.1. Genes estudiados**

Los transcritos cuantificados mediante esta técnica fueron:

-Mitocondriales: subunidad 1 del complejo IV (*MT-CO1*).

-Nucleares: Los genes de referencia: el gen ribosómico nuclear 18S y el Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Dihidroorotato deshidrogenasa (*DHODH*), Uridina-citidina quinasa 2 (*UCK2*).

#### 5.4.5.2. Cuantificación de mRNAs a partir de cDNA

La cuantificación de los niveles de mRNA de los distintos genes estudiados se llevó a cabo utilizando como molde los cDNAs previamente sintetizados. La metodología empleada fue la de las sondas Taqman sintetizadas en la casa comercial Applied-Biosystems. Para cada muestra, además de los genes deseados, se realizó la amplificación de un gen constitutivo o de referencia (*18S* O *GAPDH*).

#### 5.2. Reactivos necesarios para la expresión de genes.

	Concentración stock	Volumen reacción
TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	10 $\mu$ l
Sonda gen a estudiar (FAM)	20X	1 $\mu$ l
Sonda 18S (VIC)	20X	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O estéril		7 $\mu$ l

Los genes estudiados se determinaron mediante la utilización de sondas que presentaban un fluoróforo FAM, mientras que el gen de referencia estaba marcado con un fluoróforo VIC, lo que permitió el análisis de los dos genes de forma paralela.

La cantidad de cDNA para cada reacción fue 100 ng en 1  $\mu$ l. Los reactivos necesarios para la amplificación se muestran a continuación (tabla 5.2) y las condiciones utilizadas para la reacción fueron las siguientes: 50 °C – 2 min, 95 °C – 10 min, 95 °C – 15 s, y 40 ciclos de 60 °C – 1 min y 50 °C – 30 s.

Los resultados se analizaron utilizando programa StepOne v2.0. y se expresaron como  $\Delta$ Ct entre el gen de interés y el gen de referencia, o en valor absoluto cuando se disponía del plásmido para la realización de una curva estándar.

### 5.4.5.3. Cuantificación de mRNAs a partir de RNA

La cuantificación de los niveles de mRNA a partir de RNA se realizó con los kits de Applied Biosystems, TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix y TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step kit. De nuevo, además de los genes deseados, se realizó la amplificación de un gen constitutivo o de referencia (*18S* o *GAPDH*).

Los genes estudiados se determinaron mediante la utilización de sondas que presentaban un fluoróforo FAM, mientras que el gen de referencia estaba marcado con un fluoróforo VIC, lo que permitió el análisis de los dos genes de forma paralela. Para alguno de los estudios, en el que fue necesario la medición de tres mensajeros en un mismo pocillo, se utilizó un tercer fluoróforo ABY.

**Tabla 5.3.** Reactivos necesarios para el estudio de niveles de mRNA. A. Estudio en el ViiA 7. B. Estudio en el StepOne™.

ViiA7		StepOne™	
Reactivos	Volumen (μl)	Reactivos	Volumen (μl)
4x TaqPathe™ 1-Step Multiplex Master Mix	5 μl	TaqMan® RT Enzyme Mix (40x)	0,5 μl
Sonda ABY	1 μl	TaqMan® RT-PCR Mix (2x)	1 μl
Sonda FAM	1 μl	Sonda FAM	1 μl
Sonda VIC	1 μl	Sonda VIC	1 μl
H <sub>2</sub> O	10 μl	H <sub>2</sub> O	5,5 μl

La cantidad de RNA para cada reacción fue 10 ng en 2 μL. Los reactivos necesarios para la amplificación (Tabla 5.3) y las condiciones utilizadas (Tabla 5.4) fueron diferentes dependiendo del número de sondas utilizadas por pocillo. Para el caso de las sondas ABY, FAM y VIC en un solo pocillo se empleó el kit TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix en el ViiA 7 Real-Time PCR System. Y para los estudios con sonda FAM Y VIC, se utilizó el TaqMan® RNA-to-Ct™ 1-Step kit, en el StepOne™.

**Tabla 5.4.** Condiciones para el estudio de niveles de mRNA. A. Estudio en el ViiA 7. B. Estudio en el StepOne™.

ViiA7			StepOne™		
Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
25 °C	2 min	1	48 °C	15 min	1
53 °C	10 min	1	95 °C	10 min	1
95 °C	2 min	1	95 °C	15 s	40
95 °C	3 s	40	60 °C	1 min	
60 °C	30 s				

## 5.5. Clonaje en el vector pCRTM-Blunt II-TOPO®

Se clonaron los genes *UCK2*, *DHODH* y *GAPDH* en el vector comercial pCRTM-Blunt II-TOPO® de Invitrogen para construir una curva de calibración con la que cuantificar de forma exacta el número de copias de mRNA en las muestras analizadas por qPCR.

### 5.5.1. Diseño de oligonucleótidos para amplificar

Se accedió a la secuencia codificante de los genes en la base de datos Ensembl. De todos los transcritos posibles, se eligió el que codificaba la proteína y poseía la secuencia de referencia en NCBI. En base a esta secuencia, se diseñó manualmente una pareja de cebadores, cuyas características se analizaron con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 de IDT (Tabla 5.5).

**Tabla 5.5.** Secuencia de oligonucleótidos. Los cebadores directo y reverso de los genes *DHODH*, *UCK2* y *GAPDH*, en dirección 5'-3' y caracterización de los mismos. GTTAAA: sitio de corte de PmeI; GGATCC: sitio de corte de BamHI; GCCACC: secuencia Kozak.

Gen		Cebador reverso	Tm
<i>DHODH</i>	Directo	GTTTAAACGCCACCTGGGGAAGGTGAAGGTCGG	61 °C
	Reverso	GGATCC TCACCTCCGATGATCTGC	
<i>UCK2</i>	Directo	GTTTAAACGCCACCATGGCCGGGACAGCGAG	72 °C
	Reverso	GGATCCTCAATGCGGCCTGCTGCTGG	
<i>GAPDH</i>	Directo	GTTTAAAC GCCACC ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG	59 °C
	Reverso	GGATCCTTACTCCTGGAGGCCATGTGG	

Para diseñar las parejas de oligonucleótidos se procuró que la temperatura de hibridación (Tm) de los cebadores directo y reverso sin los sitios de corte fuera lo más parecido posible entre sí y que el contenido en G+C estuviera comprendido entre un 40-60 %.

### 5.5.2. Obtención de cDNA a partir de RNA de la línea celular SH-SY5Y

Se extrajo RNA de un pellet de la línea celular SH-SY5Y por medio del método basado en el reactivo Trizol. Se eliminaron las estructuras secundarias y se sintetizó el cDNA mediante el kit Transcription first strand cDNA synthesis kit de Roche, con un programa recomendado para fragmentos inferiores a 4000 bp (55 °C 30 min, 85 °C 5 min para inactivar la enzima, y hielo 5 min).

### 5.5.3. Amplificación por PCR

Se amplificó el número de copias de la secuencia codificante de los genes mediante PCR para su posterior clonaje en el vector comercial (Tabla 5.6).

**Tabla 5.6.** Reactivos para la PCR y programa del termociclador para amplificar el cDNA del producto de la retrotranscripción. X: temperatura de hibridación específica para cada gen.

Reactivos	Programa de PCR
10 µl de buffer de la polimerasa 5X 1 µl de dNTPs (0,2 mM) 1 µl de cebador directo (10 µM) 1 µl de cebador reverso (10 µM) 1 µl de <i>Phusion Hot Start</i> 5 µl de cDNA 31 µl de H <sub>2</sub> O	98 °C 5 s (desnaturalización inicial)
	98 °C 10 min (desnaturalización)
	X °C 20 s (hibridación)
	72 °C (extensión, 15 s/1 kb)
	98 °C 10 min (desnaturalización)
	72 °C 20 s (hibridación)
	72 °C 20 s (extensión)
	72 °C 5 min (elongación)
	4 °C ∞ (almacenamiento)

Los primeros ciclos de la PCR se realizaron a la temperatura recomendada para los cebadores sin las secuencias de corte, mientras que los restantes ciclos se realizaron a 72 °C, que es la temperatura recomendada para la *Phusion Hot Start* DNA polimerasa.

El producto amplificado por PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 %. El tampón de electroforesis utilizado fue Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y se añadió bromuro de etidio como agente intercalante a una concentración final de aproximadamente 0,75 µg/ml. El marcador de peso molecular empleado fue Low Mass Ladder, que contiene bandas cuyo peso molecular oscila entre 100-2000 bp. Las electroforesis se desarrollaron en condiciones de voltaje constantes (50-100 V) y los resultados se visualizaron con un transiluminador Gel Doc de Bio-Rad.

#### 5.5.4. Clonaje del producto de PCR en el vector

Una vez obtenido el producto de amplificación esperado, se procedió a su clonaje en el vector pCRTM-Blunt II-TOPO®. Para ello, se utilizó el kit Zero Blunt Topo PCR cloning Kit de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este vector permite incorporar productos de PCR de extremos romos. La cantidad de producto de PCR añadida depende de la intensidad de la banda de PCR obtenida, pudiendo variar entre 0,5-4 µl (Tabla 5.7).

Una vez preparada la mezcla, se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, la topoisomerasa I del virus Vaccinia unida covalentemente a los extremos 3' de cada hebra del vector interviene en una reacción química cuyo resultado final es la inserción del producto de PCR en el vector.

**Tabla 5.7.** Mezcla de reactivos necesaria para la ligación del producto de PCR en el vector pCRTM-Blunt II-TOPO®.

Reactivos	Volumen (µl)
Producto de PCR	0,5-4 µl
Sales	1 µl
Vector	1 µl
H <sub>2</sub> O	hasta 6 µl

#### 5.5.5. Transformación de bacterias DH5α por choque térmico

La mezcla de ligación se transformó por choque térmico en bacterias competentes de la cepa DH5α de Escherichia coli, con 2 µl de ligación por 50 µl de suspensión bacteriana, el procedimiento fue el siguiente: 4 °C 30 min, 42 °C 45 s y hielo 2-3 min.

Tras el choque térmico, se añadieron 250 µl de medio LB (sin antibiótico) y las bacterias se incubaron durante 1 h, a 37 °C y en agitación a fin de permitir su recuperación. Pasado este tiempo, la suspensión bacteriana se sembró en una placa de LB con kanamicina (50 µg/ml) y se incubó hasta la mañana siguiente a 37 °C.

Se seleccionaron las bacterias que contuvieran vectores plasmídicos recombinantes por la resistencia a kanamicina codificada en el vector y por la interrupción del gen letal ccdB. Por lo que, las colonias que crecieron en el medio con kanamicina tenían el inserto clonado.

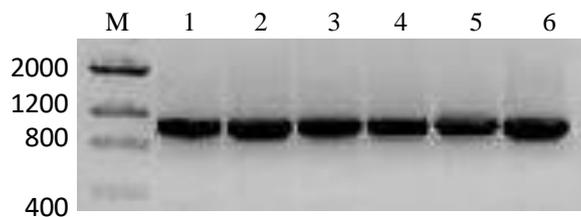
### 5.5.6. PCR de colonias bacterianas

Se verificó por PCR que las colonias que habían crecido sobre la placa con kanamicina contenían el gen buscado. Para ello, se picaron colonias individuales, se pusieron a crecer en medio LB y se incubaron durante 5 min a 95 °C. Las bacterias lisadas se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min en una microcentrífuga Sorvall Legen micro 17 (rotor 24 x 1.5/2.0 ml), y con el sobrenadante obtenido se preparó la reacción de PCR detallada en la tabla 5.8.

**Tabla 5.8.** Reactivos para la PCR y programa para amplificar la secuencia codificante del gen *GAPDH* clonada en el plásmido aislado de las bacterias. X: temperatura de hibridación específica para cada gen.

Reactivos	Programa de PCR
5 µl de buffer de la polimerasa 10X	94 °C 5 min (desnaturalización inicial) 94 °C 1 min (desnaturalización) X °C 1 min (hibridación) 72 °C 1,5 min (extensión, 30 s/0,5 kb) 72 °C 5 min (elongación) 4 °C ∞ (almacenamiento) <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">} 30 ciclos</div>
1 µl de dNTPs (0,2 mM)	
1 µl de cebador directo (10 µM)	
1 µl de cebador reverso (10 µM)	
0,5 µl de <i>Taq Ibian</i>	
5 µl de DNA (sobrenadante)	
36,5 µl de H <sub>2</sub> O	

Se eligió una temperatura intermedia entre las temperaturas de hibridación de la secuencia completa de los cebadores directo y reverso. El producto amplificado se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en TAE 1X (Figura 5.1). Las colonias positivas para el gen requerido se pusieron a crecer en 6 ml de medio LB con kanamicina, a 37 °C y en agitación.



**Figura 5.1.** Screening por PCR del sobrenadante de 6 colonias que han crecido en la placa de LB+kanamicina con los cebadores GAPDH-F y GAPDH-R. Gel de agarosa al 1 % en TAE 1X. Condiciones: 100 V, 30 min.

### **5.5.7. Secuenciación del gen clonado en las colonias recombinantes**

Se utilizó el servicio de secuenciación de DNA de la empresa Secugen S.L. (Madrid) para comprobar que el gen de interés se clonó en el vector comercial sin mutaciones.

Para ello, se extrajo DNA plasmídico de cultivos bacterianos utilizando el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit de Sigma, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la concentración y pureza del DNA aislado y se prepararon muestras de vector para la secuenciación. Se utilizaron los cebadores universales M13 Forward y M13 Reverse, cuyos puntos de hibridación delimitan la región en la que se ha introducido el producto de PCR. Por último, se analizó la lectura de las reacciones de secuenciación con los cebadores directo y reverso mediante el programa BioEdit.

## **5.6. Clonación del fragmento de DHODH**

Para asegurar el correcto reconocimiento del anticuerpo de DHODH utilizado, se construyó el fragmento de la proteína que la casa comercial empleó para generar el anticuerpo.

### **5.6.1. Clonación y transformación en E. Coli BL21**

El fragmento DHODH (aminoácidos 32-141) se amplificó a partir de cDNA de una línea de fibroblastos humanos y se clonó en el vector de expresión bacteriano pET-28a, entre los sitios de restricción NdeI y NotI. Los primers usados fueron:

- 32-141DHODH-F: 5'3' CATATGGGAGATGAGCGTTTC
- 32-141DHODH-R: 5'3' GCGGCCGCTAAGCTTGGTCCTCAGGGA

Se transformaron células E. Coli BL21 con el plásmido pET-28a- DHODH (32-141) utilizando el método de shock térmico a 42 °C durante 45 s.

## **5.6.2. Expresión y purificación del péptido**

La colonia de E.Coli BL21 con el plásmido pET-28a- DHODH (32-141) se inoculó en 10 ml de cultivo en tubos de 50 ml (conteniendo medio LB con 30 µg/ml de kanamicina). El cultivo se incubó, durante toda la noche, en un agitador orbital a 180 rpm y 37 °C. Posteriormente, se inocularon 100 µl del cultivo en 10ml de LB fresco con 30 µg/ml de kanamicina. Se incubó en agitación orbital hasta alcanzar un OD de 0,8-1. El cultivo se indujo por adición de IPTG a una concentración final de 100 mM IPTG durante 24 h. Las células se recogieron por centrifugación a 2585 x g, 20 min a 4 °C y se resuspendieron en 600 µl de tampón fosfato potásico 50mM, pH 8. La solución se lisó en un equipo de ultrasonidos Up200S (Hieslscher), con 6 ciclos de 30 s y una amplitud del 80 %, 6 ciclos de 0,5 s y 30 s de descanso entre ciclos. Este proceso se repitió entre 10 y 12 veces, manteniendo el tubo en baño de hielo, para posteriormente, centrifugar la suspensión durante 5 min a 12100 x g y 4 °C.

La expresión de la proteína se analizó en geles de poliacrilamida del 14 %.

## **5.7. Manipulación y análisis de proteínas**

### **5.7.1. Determinación de la cantidad de proteínas totales por el método de Bradford**

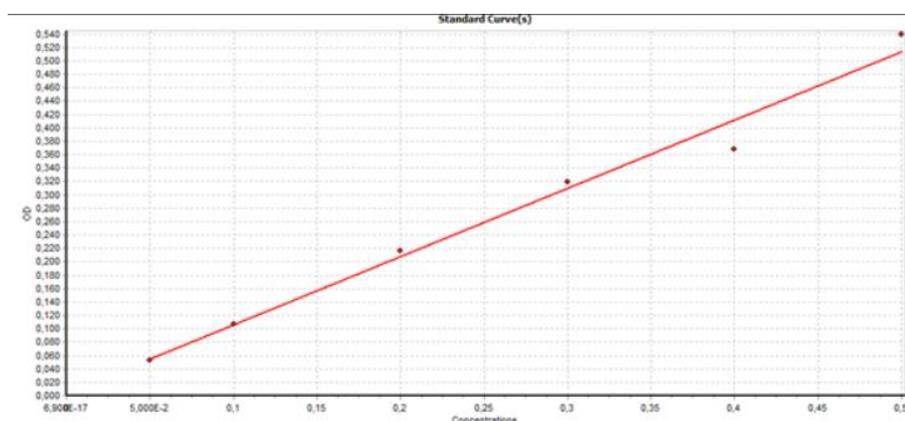
Esta técnica permitió corregir las actividades enzimáticas o calcular el volumen de muestra necesario para las técnicas basadas en detección de proteínas (Western blot en nuestro caso), obteniendo la cantidad de proteínas totales presentes en un homogenado celular. El procedimiento está basado en la medida de la cantidad de proteínas totales por una reacción colorimétrica. Se realizó una recta de calibrado con albúmina sérica bovina, BSA (Sigma), partiendo de un stock de 1 mg/ml. Para ello, se preparó en agua destilada una serie de diluciones de concentración conocida, como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 5.8.** Tabla con las cantidades para preparar las diluciones de la recta de calibrado, en la determinación de proteínas totales por el método de Bradford.

Concentración (mg/ml)	Agua (μl)	BSA (μl)
Blanco	1000	0
0,05	950	50
0,1	900	100
0,2	800	200
0,3	700	300
0,4	600	400
0,5	500	500

El reactivo de Bradford se diluyó en una proporción 1:5 en agua destilada, y se conservó tapado de la luz. Se utilizaron placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas Novostar de BMG-Labtech. En cada pocillo de la placa se añadieron 10 μl de muestra o patrón de la recta y 200 μl de reactivo de Bradford.

Con los valores de absorbancia de las diluciones de BSA se construyó una recta de calibrado (Figura 5.2) y se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras. La dilución se tuvo en cuenta para calcular la concentración de las muestras.



**Figura 5.2.** Representación gráfica de la recta de calibrado. Concentraciones de BSA frente a absorbancia a 595 nm.

## **5.7.2. Método para el análisis de proteínas por Western blot**

### **5.7.2.1. Materiales y equipos utilizados**

El Tris/HCl, cloruro de sodio (NaCl), desoxicolato de sodio (NaDOC), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Tritón X-100, cocktail de inhibidores de proteasas, glicina, N,N, N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED), β-mercaptoetanol, azul de bromofenol, y Tween 20, inhibidor de proteasas, azul de Coomasie y ácido acético procedieron de Sigma. La acrilamida, bisacrilamida, persulfato amónico (APS) y dodecilsulfato sódico (SDS) procedieron de Serva. El metanol (grado HPLC) procedió de Panreac.

Los geles Mini-PROTEAN TGX™ Precast Gels y las membranas Trans-Blot® Turbo™ Transfer Pack (0,2 μm PVDF) fueron de Bio-Rad. Las membranas de PVDF para la fijación de proteínas fueron membranas Hybond™ –P de Amersham. Las autorradiografías utilizadas en la detección de proteínas fueron Hyperfilm™ ECL de Amersham. Los reactivos utilizados para el revelado por quimioluminiscencia fueron SuperSignal® West Pico Mouse IgG Detection Kit de Pierce.

Cuando se hicieron geles SDS-TRIS-Glicina se utilizó el sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell. La transferencia de proteínas se realizó mediante transferencia húmeda utilizando el sistema de MiniTrans-Blot o empleando el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ Transfer Stacks, todo procedente de Bio-Rad. Se empleó también una centrifuga Eppendorf modelo 5415R, el sistema de imágenes Odyssey® de LI-COR Biosciences.

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se muestran a continuación:

**Tabla 5.9.** Tabla resumen de anticuerpos primarios y secundarios empleados para la inmunodetección de proteínas por Western-blot. Mc: monoclonal, Pc: policlonal.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Anti-DHODH	Pc, conejo	1:500	Biorbyt
Anti-DHODH	Mc, ratón	1-5 µg/ml	Abcam
Anti-CAD	Mc, conejo	1:500	Abcam
Anti-p.MTCO1	Mc, ratón	1:500	Abcam
Anti-α-Tubulina	Mc, ratón	1:4000	Sigma
Anti-SDHA	Mc, ratón	1:1000	Thermo Scientific
Anti-β-actina	Mc, ratón	1:1000	Sigma
Anti-conejolgGDyLight™ 680	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti-conejolgGDyLight™ 800	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti-ratónlgGDyLight™ 680	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti-ratónlgGDyLight™ 800	Cabra	1:15000	Thermo Scientific
Anti-conejo (H+L) peroxidasa conjugada	Cabra	1:5000	Thermo Scientific
Anti-ratón (H+L) peroxidasa conjugada	Cabra	1:5000	Thermo Scientific

### 5.7.2.2. Extracción de proteínas

#### 5.7.2.2.1. Extracción de proteínas de líneas celulares

Después de someter las células a diversos tratamientos, se tripsinizaron y centrifugaron 5 min a 378 x g. El pellet celular resultante se lavó con 1 ml de PBS y tras otra centrifugación se resuspendió en un volumen de tampón de lisis (Ripa): 50 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, 0.5 % NaDOC, 5 mM EDTA y 1 % de Tritón X-100. A continuación, la muestra se incubó en una noria giratoria durante 15 min a 4 °C, para favorecer la rotura de las membranas celulares mediante el detergente y se centrifugó a 4 °C durante 15 min a 15700 x g para eliminar los restos celulares. Después se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80 °C hasta su uso.

#### 5.7.2.2.2. Extracción de proteínas de tejido cerebral

Para la extracción de proteína a partir de tejido de cerebro, se prepararon homogenados de 100 mg de tejido que se resuspendieron en 400 µl de Buffer TBS pH 7,4 (Tris Base 20 mM, NaCl 150 mM) e inhibidor de proteasas 1:10. Las muestras se homogenizaron en el potter 10 veces a 500 revoluciones. Posteriormente, se centrifugaron a 4 °C durante 30 min a 15700 x g. Después se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80 °C hasta su uso.

### 5.7.2.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

La separación electroforética de las proteínas se realizó en geles de poliacrilamida, que permiten la separación de las mismas en función de su peso molecular. Para ello, se utilizó el método de Laemmli [220] o SDS-tris-glicina. Los geles SDS-TRIS-Glicina realizados se hicieron utilizando el sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell.

A continuación, se resumen las disoluciones necesarias para la realización de estos geles.

**-Acrilamida stock:** Acrilamida/bisacrilamida 29:1 (30 %).

**-Tampón separador:** Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4 %; EDTA 8 mM.

**-Tampón concentrador:** Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4 %; EDTA 8 mM.

**-Tampón electroforesis 10X:** Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1 %.

**-Tampón de carga 4X:** Glicerol 20 %; Tris-HCl 0,16 M pH 6,8; EDTA 20 mM; SDS 8 %, azul de bromofenol 0,4 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 4 %.

Para la preparación del gel, se añadió primero la fase del gel separador, cuya composición viene descrita a continuación:

**Tabla 5.10.** Composición del gel de separación de SDS-tris-glicina: Las cantidades son para geles de 10 % de Acrilamida

Componente	0,75 mm	1,5 mm
Acrilamida stock	1,7 ml	3,3 ml
Tampón separador 4x	1,25 ml	2,5 ml
Agua	2 ml	4 ml
10 % Persulfato amónico (APS)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

La mezcla se añadió en el montaje evitando formar burbujas hasta que llegó a ocupar más o menos tres cuartas partes del montaje. A continuación, se adicionó isopropanol para estabilizar el frente del gel y evitar el contacto del mismo con el oxígeno del aire (que dificulta la polimerización) y se esperó hasta que gelificara. Seguidamente se retiró el isopropanol, se lavaron los restos 2 ó 3 veces con agua destilada y se secó bien el montaje con papel de filtro. Después se añadió la fase del gel concentrador (Tabla 5.11).

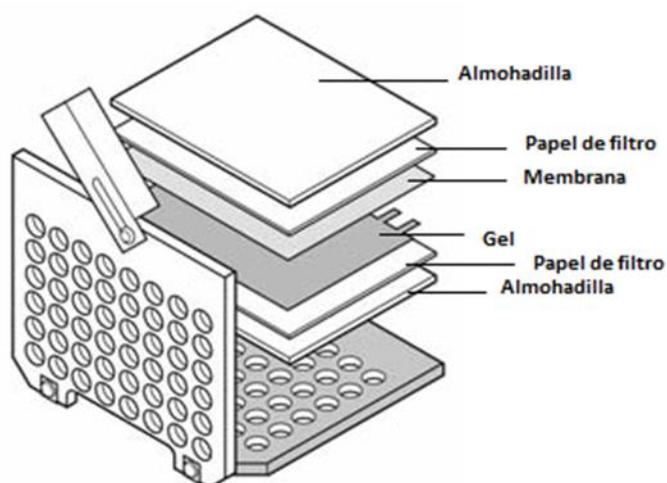
**Tabla 5.11.** Composición del gel concentrador de SDS-tris-glicina. Las cantidades son para espaciadores de 0,75 mm.

Componente	0,75 mm	1,5 mm
Acrilamida stock	325 $\mu$ l	650 $\mu$ l
Tampón separador 4x	630 $\mu$ l	1,26 ml
Agua	1,5 ml	3 ml
10 % Persulfato amónico (APS)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Después de añadir el volumen necesario de esta fase, se colocó el peine. Una vez polimerizado se sacó el peine, se lavaron bien los pocillos con tampón de electroforesis, y se prepararon las muestras para cargar. Las muestras preparadas (apartado 5.4.2.2.) y cuantificadas tal y como se explica en el apartado 5.4.1, se mezclaron con tampón de carga y se desnaturalizaron durante 5 min a 100 °C. A continuación, se cargaron en el gel entre 20 y 60  $\mu$ g de proteínas totales. La electroforesis se realizó con el tampón de electroforesis 1X a un amperaje constante de 10 mA hasta que las muestras entraron en el gel separador, y a 20 mA el resto del tiempo, hasta que el frente alcanzó la parte inferior del gel. Cuando se utilizaron geles comerciales, la electroforesis se realizó a 50 V hasta que las muestras salieron de los pocillos y a continuación se mantuvo a un voltaje constante de 200 V hasta que se alcanzó la parte inferior del gel.

#### **5.7.2.4. Transferencia a membranas PVDF**

Para la transferencia de proteínas a membranas PVDF se utilizó el sistema Mini Trans-Blot para transferencia húmeda. Una vez terminada la electroforesis, el gel se equilibró en tampón de transferencia (Tris 38 mM, Glicina 39 mM, Metanol 20 %). Paralelamente se preparó la membrana para la transferencia. Para ello se realizaron los siguientes lavados para equilibrarla: 30 segundos en metanol, agua destilada y tampón de transferencia. Los papeles de filtro y las almohadillas también se humedecieron en tampón de transferencia. Cuando se equilibró la membrana y el gel, se realizó el montaje de los elementos necesarios para la transferencia húmeda, el casete se montó con la parte más oscura hacia abajo y se ordenó de la siguiente forma (de abajo hacia arriba): almohadilla, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro y almohadilla (Figura 5.3). El casete se cerró y se colocó en el módulo de electrodos.



**Figura 5.3.** Montaje del casete para transferencia húmeda.

En la cubeta de transferencia se colocó un bloque de hielo y un agitador para ayudar a mantener la temperatura del tampón y permitir su distribución uniforme. La transferencia se realizó a una temperatura de 4 °C y un voltaje constante de 80 V durante 2 h. Al terminar la transferencia, la membrana se tiñó con una solución de rojo Ponceau, colorante que se une específicamente a las proteínas y permite comprobar la eficacia de la transferencia. Finalmente, la membrana se lavó bien con agua destilada y con PBS, tras lo cual o bien se conservó a 4 °C envuelta en film de plástico hasta su uso, o se continuó con la inmunodetección de proteínas.

También se realizó transferencia de proteínas en el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ siguiendo las instrucciones del equipo, se utilizó el programa HIGH MW para proteínas menores de 150 kDa con una duración de 10 min en geles de acrilamida de 0,75 mm, o el programa 1,5 mm GEL para proteínas de cualquier tamaño en geles de 1,5 mm.

### **5.7.2.5. Inmunodetección de proteínas mediante Western-blot**

#### **5.7.2.5.1. Incubación con los anticuerpos primario y secundario**

La membrana se bloqueó con PBS al 5 % p/v de leche desnatada en polvo y se incubó 1 h a temperatura ambiente, o bien toda la noche en la cámara fría. En los casos donde la detección de proteínas se llevó a cabo a través del sistema de imagen Odyssey, el bloqueo se realizó con PBS al 5 % p/v en leche desnatada sin Tween, y para peroxidasa con Tween 1x. Después se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tween (PBS-T), para eliminar los restos de la solución de bloqueo. El anticuerpo primario se incubó en PBS-T al 1 % de leche desnatada en polvo durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a una temperatura de 4 °C.

Transcurrido este tiempo, se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 min con PBS-T, para arrastrar posibles restos de anticuerpo primario. Seguidamente, se incubó la membrana durante 1 h con el anticuerpo secundario en PBS-T al 0,1 % de leche desnatada en polvo. Después de esto, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con PBS-T para eliminar las trazas de anticuerpo secundario y se procedió a la detección, tal y como se explica en el apartado (5.4.2.5.2). Las concentraciones adecuadas de anticuerpo primario y secundario se muestran en la tabla 5.2.

#### **5.7.2.5.2. Detección de proteínas**

La membrana se incubó durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente del kit SuperSignal®West Pico IgG Detection Kit y la luminiscencia de dicha reacción se detectó mediante una placa autorradiográfica y su posterior revelado. El tiempo de revelado dependió de la cantidad de muestra aplicada y de la sensibilidad del anticuerpo utilizado. Tras el revelado las películas radiográficas se secaron al aire y digitalizaron para su posterior cuantificación.

También se utilizó el sistema de imágenes Odyssey® que utiliza dos canales fluorescentes infrarrojos (700 y 800 nm) para la detección y análisis simultáneo de proteínas. Las membranas fueron escaneadas y procesadas según los requerimientos del equipo. Una vez obtenidas las imágenes las bandas fueron cuantificadas con el programa Imagen Studio (IS) versión 2.0.

#### **5.7.2.6. Reutilización de membranas**

Cuando se quiso reutilizar una membrana después de la detección, ésta se incubó con solución de Stripping (2-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2 %, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) a 58 °C durante 20-30 min. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 10 min a temperatura ambiente con PBS-T para eliminar las trazas de solución de stripping, y se procedió a la siguiente inmunodetección repitiendo los procesos anteriormente descritos.

## **5.8. Huella peptídica**

### **5.8.1. Preparación de las muestras**

Las muestras a estudiar se cargaron en un gel SDS-PAGE por duplicado. Una mitad de gel se transfirió a una membrana para la posterior inmunodetección por Western blot de la proteína de interés, mientras que la otra mitad se tiñó con azul de Coomassie. Una vez realizado el Western blot, la autorradiografía se superpuso con el gel teñido y se recortó, con la ayuda de un bisturí estéril, la banda correspondiente, que se almacenó sumergida en agua milliQ y se envió al Centro de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Las proteínas presentes en las bandas o spots de gel se digirieron con Tripsina. Las muestras fueron reducidas con 10 mM de ditioneitol (DTT) en 25 mM de bicarbonato amónico a 56 °C durante 30 min y luego se alquilaron con 25 mM de Iodacetamida (IAM) en 25 mM de bicarbonato amónico durante 15 min en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5 ng/μl de tripsina grado secuenciación (Roche Molecular Biochemicals) en bicarbonato amónico 25 mM (pH 8.5) y se incubó overnight a 37 °C. Los péptidos resultantes se recogieron para ser analizados por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF.

### **5.8.2. Análisis mediante MALDI-TOF/TOF**

#### **5.8.2.1. Aplicación en Placa de MALDI**

Se depositó 1 μl de los péptidos obtenidos de cada una de las muestras en cada pocillo de la placa portamuestras de MALDI y se dejó secar al aire a Tª ambiente. Se añadió 0.6 μl de matriz (ácido α-cyano-4-hydroxy-cinnamic (Sigma) a una concentración de 3 mg/ml en 50 % acetonitrilo, 0.1 % de TFA) a cada una, y se dejó secar antes de introducir la placa para su análisis en el espectrómetro de masas.

#### **5.8.2.2. Adquisición de espectros MS**

El análisis de masas se realizó en un espectrómetro de masas en tándem, 4800 Plus Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, MDS Sciex, Toronto, Canadá) equipado con un láser de Nitrógeno (Nitrogen laser diode-pumped Nd:YAD 355 nm), extracción retardada y reflector. El equipo operó en modo reflector positivo con un voltaje de aceleración de 20.000 V para la adquisición de los espectros MS. Todos los espectros fueron calibrados internamente utilizando los valores m/z conocidos de los péptidos procedentes de la autólisis

de la tripsina. Como resultado de este primer análisis de masas se obtuvo un espectro MS o huella peptídica de la proteína (PMF: peptide mass fingerprint) que se utilizó para su identificación contra la base de datos.

Para la confirmación de las proteínas identificadas por PMF y/o para la búsqueda de proteínas adicionales en cada banda del gel se realizaron análisis MS/MS o fragmentación de péptidos.

Así, en el espectro MS se seleccionaron péptidos precursores, con el fin de confirmar sus secuencias de aminoácidos. Intentando que tuvieran buena señal de intensidad y que estuvieran separados de otros péptidos como mínimo en +/- 4 Da (ventana de Masa), para poder ser aislados, cada uno de ellos en un análisis independiente, en una cámara y fragmentados por colisión con gas atmosférico (Collision Induced Dissociation, CID) con el método de operación de 1Kv ion reflector en modo positivo. Los espectros MS/MS obtenidos de cada uno de los péptidos precursores se enfrentaron a los espectros de fragmentación teóricos de los péptidos anotados en las bases de datos para confirmar su secuencia y la proteína a la que pertenecen.

### **5.8.3. Búsqueda en bases de datos**

#### **5.8.3.1. Identificación por huella peptídica**

La identificación de las proteínas por huella peptídica se realizó con el motor de búsqueda MASCOT v 2.3 a través del software Global Protein Server (GPS) v. 3.6 (ABSCIEX), utilizando las bases de datos de proteínas SwissProt 20170116 (553231 secuencias; 197953409 residuos) con restricción taxonómica a "Human" (20130 secuencias). Los parámetros de búsqueda fueron: carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, tolerancia de error de masa para los péptidos, 50 ppm y hasta un punto de corte perdido permitido para la tripsina.

Las proteínas identificadas superan la puntuación (score) que estima el algoritmo MOWSE de MASCOT para ser estadísticamente significativa con un  $p < 0.05$ .

### **5.8.3.2. Identificación por huella peptídica combinada con MS/MS**

Los parámetros de búsqueda fueron los mismos utilizados en la identificación por huella peptídica a excepción de la tolerancia del error para la masa del precursor que podía llegar hasta 100 ppm y la tolerancia en las masas de los fragmentos (MS/MS) de 0.3 Da.

Los péptidos fragmentados identificados superaron la puntuación individual del ion que determina MASCOT como significativa con un  $p < 0.05$ .

## **5.9. Análisis de Proteómica Dirigida: PRM**

### **5.9.1. Preparación de las muestras**

Los péptidos procedentes de la digestión de las bandas o spots se desalaron y concentraron mediante cromatografía de fase reversa C18 en punta (ZipTip, Merck Millipore). Los péptidos fueron disueltos con acetonitrilo al 80 % y ácido trifluoroacético 0,1 %. Finalmente, las muestras se secaron en el Speed-vac y resuspendieron en 2 % AN, 0,1 % ácido fórmico, antes del análisis Nano LC-MS/MS.

### **5.9.2. Identificación de proteínas por proteómica dirigida (PRM)**

#### **5.9.2.1. Diseño del método PRM**

Se usó Skyline (64 bits) versión 4.1 para construir y optimizar el método de monitorización de reacción en paralelo (PRM) para la detección de péptidos únicos de la enzima DHODH, denominada PYRD en UniProt [221]. La secuencia con formato FASTA de la proteína PYRD se usó para la digestión in silico triptico (KR |P), restringiendo la predicción de péptidos a aquellos que varían de 8 a 25 aminoácidos de longitud y suponiendo un máximo de 1 escisión omitida para la tripsina. Los péptidos que incluían cisteína y metionina se evitaron cuando fue posible. Si la cisteína estaba en la secuencia peptídica, esto se consideró como carbamidometil Cys, y en el caso de la metionina podría oxidarse o no.

Los candidatos diana para cada péptido incluyen tanto iones precursores con carga doble o triple, así como precursores modificados. Skyline se utilizó para predecir y optimizar las energías de colisión para cada péptido. El método resultante se exportó al software de adquisición del espectrómetro de masas Xcalibur 4.0 (Thermo Scientific).

Se desarrollaron métodos PRM adicionales en péptidos. Por lo tanto, se utilizó intensidad de pico baja, resolución de pico de baja calidad o incapacidad para identificar tres iones de transición en péptidos, para eliminar los péptidos candidatos de los ensayos finales. Los métodos finales de PRM incluyeron una proteína, 49 péptidos y 112 precursores.

### **5.9.2.2. Cromatografía líquida y análisis de espectrómetros de masas**

El extracto de proteína desalada se analizó mediante RP-LC-ESI-MS / MS en un sistema EASY-nLC 1000 acoplado al espectrómetro de masas Q-Exact HF a través de la fuente de pulverización Nano-Easy (todos de Thermo Scientific, mississagua, ON, Canadá).

El péptido se cargó primero en una columna Acclaim PepMap 100 Trapping (Thermo Scientific, 20 mm x 75 µm ID, resina C18 de 3 µm con tamaño de poro de 100 Å) usando tampón A (fase móvil A: 2 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) y luego se separaron y se eluyeron en una columna analítica de resina C18 NTCC (Nikkyo Technos Co., Ltd. de 150 mm x 75 µm ID, 3 µm de resina C18 con 100 Å de tamaño poro) con una boquilla de pulverización integrada. Se empleó un gradiente de 5 % a 30 % de tampón B (100 % de acetonitrilo, 0,1 % de ácido fórmico) en tampón A en 70 min, seguido de 30 a 45 % en 15 min a un caudal constante de 250 ml / min.

La adquisición de datos se realizó con un espectrómetro de masas cuadrupolo-Orbitrap Q-Exactivo HF Q Exact HF (Thermo Scientific). Los datos se adquirieron utilizando un voltaje de ionización de 1,8 Kv y una temperatura de transferencia iónica de 250 °C.

Todos los datos fueron adquiridos usando métodos Full MS y PRM en modo positivo con el software Xcalibur 4.1. Método completo de Ms monitorizado en un rango de m/z de 220-1600 Da con una resolución de masa de 120,000 y un objetivo de control automático de ganancia (AGC) de 3E6 a un tiempo de inyección máximo (ITmax) de 200 ms. El PRM aisló los valores m/z del péptido diana de una lista de inclusión (precursor 112 de 49 péptidos) con una ventana de 2 m/z. Los tiempos de inyección se ajustaron a 100 ms para el análisis de péptidos. Para la exploración MS2, se realizó una fragmentación por disociación colisional de mayor energía (HCD) con una energía de colisión normalizada (NCE) del 27 %; los fragmentos resueltos se escanearon a una resolución de masa de 60000.

### 5.9.3. Análisis de datos

Los datos adquiridos en Q-EXACTIVE HF se analizaron en el software Skyline v 4.1 donde se inspeccionaron manualmente para confirmar los péptidos y las transiciones que proporcionaron la detección precisa de péptidos / proteínas.

Los datos de MS / MS se analizaron a través del software Proteome Discoverer v.2.2 (Thermo Scientific) con el motor de búsqueda MASCOT 2.6 (MatrixScience, Londres, RU) o SEQUEST HT para identificar los péptidos frente a la base de datos DataBase con la secuencia fasta de proteína diana (DHODH), base de datos de contaminantes (secuencia 247) y SwissProt DataBase con restricción taxonómica para humanos (553089 secuencias; 2017/02/21). Las búsquedas se realizaron asumiendo la digestión con tripsina con un máximo de 2 rupturas omitidas; una tolerancia de masa iónica de fragmento de 0,1 Da y una tolerancia de ion de origen de 10 ppm. Se especificó carbamidometilcisteína como modificación fija y oxidación de metionina como modificaciones variables.

Las identificaciones de péptidos basadas en datos de MSMS se aceptaron si podían establecerse a más del 95 % de IC ( $p < 0,05$ ) y luego se usaron en Skyline para generar una biblioteca espectral. Los criterios de aceptación para la identificación de proteínas fueron una tasa de descubrimientos falsos (FDR) de menos del 1 % y al menos un péptido identificado con alta confianza (IC > 95 %).

Para confirmar la detección de la proteína DHODH, los datos se procesaron frente a la biblioteca MRM en Skyline para garantizar la coherencia entre las transiciones detectadas y las secuencias de péptidos buscadas (Dotp).

## 5.10. Método para el análisis de proteínas por citometría de flujo

### 5.10.1. Equipos y materiales utilizados en citometría

Para la citometría se utilizaron los siguientes reactivos: paraformaldehído 4%, PBS, de Sigma y IC Permeabilization Buffer 5x de Invitrogen. Se utilizó la centrifuga marca Eppendorf, MiniSpin® plus. Las muestras se analizaron en los citómetros de flujo FACScan BD y Beckman Coulter CITOMICS FC 500. Los anticuerpos primarios y secundarios se mencionan a continuación:

**Tabla 5.12.** Anticuerpos citometría utilizados para la inmunodetección de proteínas por citometría. Mc: monoclonal; Pc: policlonal.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Anti-Tirosina Hidroxilasa (TH)	Pc, conejo	1:200	Sigma
Anti- $\beta$ III-Tubulina (TUBB3)	Pc, conejo	1 $\mu$ g/ml	Abcam
Alexa Fluor 488	Pc, ratón	1:1000	Molecular probe

### 5.10.2. Detección de proteínas por citometría de flujo

Tras el tratamiento de diferenciación, las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Las células se fijaron con formaldehído al 4 % durante 15 min a 4°C. De nuevo, se volvieron a lavar con PBS y se centrifugaron a 4500 x g durante 5 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de IC Permeabilization Buffer 5x (de Invitrogen) en donde se solubilizó el anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios se incubaron overnight a 4 °C. Terminada la incubación, las muestras se lavaron con PBS y se centrifugaron a 4500 x g durante 5 min. El anticuerpo secundario se resuspendió de igual forma que el anticuerpo primario y se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, protegido de la luz. Tras la hora, se lavaron con PBS y se centrifugaron a 4500 x g durante 5 min. Al finalizar se resuspendieron en un volumen de PBS y se analizaron por citometría de flujo. Se utilizó el canal FL1. Los resultados obtenidos por citometría se analizaron utilizando el programa informático Weasel.

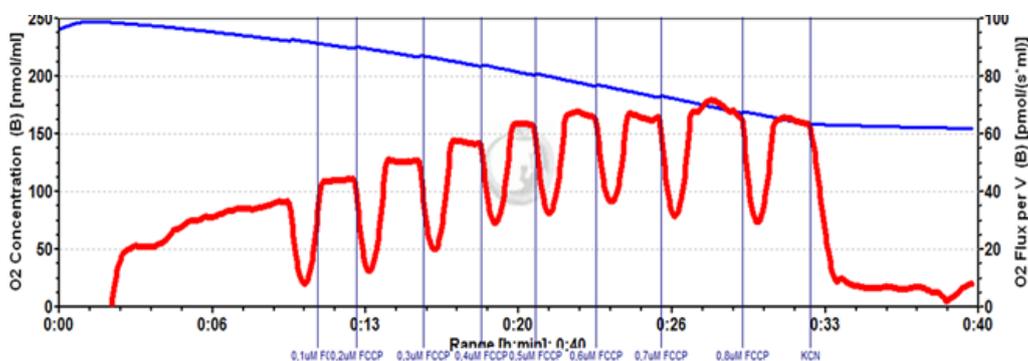
## 5.11. Consumo de oxígeno

### 5.11.1. En células intactas

El consumo de oxígeno se midió con un oxígrafo de alta resolución (Oroboros®), asociado al software DatLab utilizado para la adquisición y análisis de datos.

Para esta técnica se partió de células con una confluencia del 80 %, que se tripsinizaron y centrifugaron a 378 x g durante 5 min. A continuación, se contaron y el pellet celular obtenido se diluyó de tal forma que en 2 ml (volumen introducido en la cámara de medida) hubiera  $1 \times 10^6$  células por ml. Después de introducir la muestra, se cerró la cámara, y una vez que se estabilizó el flujo se obtuvo la denominada respiración endógena o de rutina. Seguidamente, se fue añadiendo concentraciones crecientes de los diferentes tóxicos empleados para poder analizar su efecto en el consumo de oxígeno. Una vez titulada la droga, se añadió KCN para asegurarse que el consumo de oxígeno provenía de la ETC (Figura 5.4).

Para una correcta determinación del consumo de oxígeno las pruebas deben realizarse en al menos tres experimentos independientes y alternarse las cámaras de medida para evitar errores que derivaren de la variación de las mismas.



**Figura 5.4.** Gráfica de consumo de oxígeno durante la titulación de FCCP utilizando un oxígrafo de alta resolución Oroboros® Oxygraph-2k. Imagen del consumo de oxígeno de células SH-SY5Y. Línea azul: concentración de oxígeno. Línea roja: flujo de oxígeno en la cámara.

### **5.11.2. En tejido cerebral**

#### **5.11.2.1. Preparación de las muestras**

El cerebro extraído se conservó en medio BIOPS (50 mM K<sup>+</sup>-MES, 20 mM taurina, 0,5 mM ditiotreititol, 6,56 mM MgCl<sub>2</sub>, 5,77 mM ATP, 15 mM fosfocreatina, 20 mM imidazol, 10 mM Ca-EGTA buffer (2,77 mM CaK<sub>2</sub>EGTA + 7,23 mM K<sub>2</sub>EGTA) a pH 7.1), hasta su utilización. Se realizó el pesaje del tejido en peso húmedo. Las muestras se homogenizaron en el potter 16 veces a 1000 revoluciones [136], en una proporción de 100 mg de tejido por ml de Medio de respiración mitocondrial (MIR05): 110 mM sacarosa, 60 mM K<sup>+</sup>-lactobionato, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM taurina, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES y 1 g/l BSA a pH 7.1.

Debido a la naturaleza del tejido, éste solo mantiene sus características durante una hora, por lo que los experimentos se realizaron inmediatamente después de la extracción de la muestra.

#### **5.11.2.2. Respiración**

Una vez homogenizadas las muestras se realizó una medida del consumo para asegurarse que el procedimiento de extracción era el adecuado. Para ello, se cargó 10 mg de tejido por ml de medio en cada cámara y se observó si la respiración aumentaba al añadir una concentración de 100 µM de succinato (las células estaban lisadas correctamente) y si se mantenía con una concentración de 15 µM de citocromo C (las membranas mitocondriales estaban intactas) [222].

Para el consumo de oxígeno en presencia de dihidroorotato, al medio MIR05 se le añadió 2 mg de ácido dihidroorotico (6,3 mM) y se ajustó el pH a 7. Tras pesar y homogenizar la muestra, se resuspendió parte en medio MIR05 normal y parte en el MIR05 + dihidroorotato. Para observar la inhibición del consumo de O<sub>2</sub> se añadió 1 mM de leflunomida.

## **5.12. Histoquímica**

### **5.12.1. Preparación de las muestras**

Para la realización de histoquímicas se partió de tejido cerebral congelado. Se creó el bloque de OCT orientando la muestra en el sentido que nos interese en cada caso (corte coronal en este caso).

Los cortes se realizaron en el criostato, previamente enfriado, y se conservaron a -80 °C. El tamaño del corte dependió de la tinción que se vaya a realizar. Las muestras se atemperaron durante una hora antes de la realización de cualquier tinción.

### **5.12.2. Tinción Hematoxilina-Eosina**

Previamente, antes de llevar a cabo la tinción histoquímica de la enzima a estudiar, se comprobó que el proceso de congelación fue el correcto, observándose la estructura de tejido mediante la tinción de hematoxilina-eosina.

En este caso los cortes de tejido se realizan en 5, 10 y 20  $\mu\text{m}$ .

#### **5.12.2.1. Materiales y reactivos**

Para la realización de la tinción se utilizó hematoxilina de Carazzi (hematoxilina 0,1 %, iodato potásico 0,02 %, alumbre potásico 5 %, glicerina 5x), eosina amarillenta al 1 %, alcoholes a 60°, 96° y 100°, xilol y medio de montaje no acuoso (DPX Mountant for histology de Sigma).

#### **5.12.2.2. Tinción**

Una vez atemperadas las muestras, se realizó en primer lugar, una hidratación gradual a los cortes, pasándolos por los distintos grados de alcohol (2 lavados de 5 min de 100°, 2 de 96° y uno de 60°). Tras la hidratación del tejido, éste se lavó durante 5 min con el agua corriendo y se tiñó con hematoxilina 10 min. De nuevo, se volvió a lavar con agua corriendo hasta que ésta perdiera el color. La tinción con eosina fue de 10 s. Una vez teñido con ambos colorantes, los cortes fueron lavados brevemente con agua y se les aplicó el proceso de deshidratación, pasando por los alcoholes anteriores, pero en sentido contrario. Además, se añadió al final, un lavado en xilol para después montar la preparación.

### **5.12.3. Histoquímica DHODH**

Para la HQ de DHODH se empleó cerebro de ratón hembra de 71 días de edad, congelado con OCT y conservado a -80 °C. Los cortes que se realizaron fueron de 20 µm.

#### **5.12.3.1. Materiales y reactivos**

Se empleó tampón fosfato potásico 150 mM a pH 8, nitroblue tetrazolium 0,02 M, cianuro potásico 0,01 M, ácido L-dihidrorótico (L-DHO) 0,02 M y brequinar 0,001 M (ambos de Sigma). De nuevo se empleó alcoholes, esta vez a 70°, 96° y 100°, xilol y medio de montaje no acuoso.

#### **5.12.3.2. Tinción**

En primer lugar, se prepararon dos soluciones diferentes. La solución A, con tampón fosfato, nitroblue tetrazolium y KCN, y la solución B, con lo mismo que la anterior más el inhibidor de la enzima (brequinar). Estas se emplearon para preparar las soluciones tanto para el control negativo (solo solución A), la tinción de DHODH (solución A más L-DHO) como la tinción de DHODH más inhibidor (solución B más L-DHO).

Los cortes se incubaron con sus diferentes soluciones en una cámara húmeda a 37 °C durante 2 horas. Tras la incubación se lavaron 1 min con tampón fosfato, otro con agua destilada, y por último se hicieron pases de 2 min por alcohol de 70°, 96° y 100°, y xilol, para seguidamente montar las preparaciones con medio no acuoso.

## **5.13. Inmunohistoquímica**

### **5.13.1. Preparación de las muestras**

Para el caso de las inmunohistoquímicas (IHQ) se utilizaron cortes de tejido humano parafinados, enviados por el Instituto.

Antes de proceder a la IHQ las muestras fueron atemperadas a 37 °C durante toda la noche.

### 5.13.2. Material y reactivos

Se empleó un sistema automatizado en el instrumento Autostainer Link, todos los reactivos pertenecían a Dako, a excepción de los anticuerpos primarios utilizados. Además de alcoholes a 70°, 96° y 100°, xilol y medio de montaje no acuoso.

**Tabla 5.13.** Anticuerpos primarios IHQ. Mc: monoclonal; Pc: policlonal.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Proveedor
Anti-DHODH	Mc, ratón	1:50	Abcam
Anti-CAD	Pc, conejo	1:200	Abcam

### 5.13.3. Tinción

Previamente, las muestras se desparafinaron con xilol (10 min), se rehidrataron con lavados de 5 min en una serie de alcoholes (100, 100, 96 y 70) y se lavaron 5 min con agua destilada. Tras la rehidratación, se realizó la recuperación antigénica a 95 °C durante 20 min un pH de 6 (Dako antigen retrieval, low/high pH), antes de comenzar con el protocolo automatizado.

En este proceso, se bloqueó la peroxidasa endógena de las muestras (EnVision FLEX Peroxidase-Blocking) y se realizaron dos lavados de 5 min (Dako wash buffer). Una vez bloqueada, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario durante 1 h (Tabla 5.13). Tras la incubación, se repitieron los lavados y se añadió el sistema de visualización de amplificación de señal FLEX (Envision Flex HRP, Dako). De nuevo, se realizaron lavados (3 lavados de 5 min), y se empleó 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) para el desarrollo de la señal tras la precipitación en los sitios de unión del anticuerpo primario.

## 5.14. Inmunofluorescencia en cultivos celulares

Las células en cultivo se lavaron con PBS y fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se lavaron con PBS y permeabilizaron con el detergente Tritón X-100 al 0,1 % 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de BSA al 0,1 %, 15 min a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario, diluido en la solución de bloqueo a la concentración deseada, se incubó una hora a temperatura ambiente o toda la noche. El anticuerpo secundario se diluyó 1:1.000 en la solución de bloqueo y se incubó durante 30 min temperatura ambiente. Por último las células se dejaron con PBS al que se le añadió DAPI, para teñir los núcleos, a una concentración 1:1000 y se visualizaron a través de la estación de imagen EVOS® FLoid® Cell Imaging Station de ThermoFisher Scientific. Esta permite la captación de imágenes celulares en tres colores de fluorescencia (azul, verde y rojo) de forma rápida y sencilla. El sistema permite tomar las imágenes de la propia placa de cultivo, incluso de células vivas.

En todos los casos se llevó a cabo paralelamente un control de anticuerpo secundario (mismo procedimiento, pero sin la incubación con anticuerpo primario) para descartar la existencia de uniones inespecíficas con el mismo.

### **5.15. Bases de datos**

Durante la realización de la tesis se emplearon distintas bases de datos con las que se contrastaron los resultados obtenidos. A nivel general se consultó la base de datos *Expression Atlas*, y para datos sólo humanos *The Human Protein Atlas*. También se utilizó el motor de búsqueda Pubmed.

### **5.16. Análisis estadístico**

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa STATVIEW versión 6.0 y GraphPad Prism versión 5. Varios parámetros estadísticos han sido considerados durante la realización de este trabajo. En primer lugar, se realizó un análisis de la normalidad de todas las variables estudiadas. De este modo las variables no normales fueron sometidas a las pruebas no paramétricas de Mann Withney o Kruskal-Wallis en función de si se trataba de dos o más grupos de variables. Las variables normales fueron comparadas con test t-student desapareado de dos colas o ANOVA, si se trataban de dos o más grupos de variables respectivamente. Cuando se analizó más de 2 grupos de variables también se realizaron las pruebas Post Hoc correspondientes a cada caso: Dunn para las variables no paramétricas y Scheffer (con grupos homogéneos). Los valores representados fueron los de las medias  $\pm$  su desviación estándar en los diagramas de puntos y las gráficas de barras; y los valores máximo y mínimo, además de los tres cuartiles para los diagramas de cajas. Se consideró significativo una p menor de 0,05 y el determinado por cada una de las pruebas Post Hoc en particular.

## ***BIBLIOGRAFÍA***



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. A. Hardy, G. A. Higgins, J. A. Hardy, and G. A. Higgins, "Alzheimer ' s disease : The amyloid cascade hypothesis," *Science*, vol. 256, no. 5054, pp. 184–185, 1992.
- [2] D. P. Rice, H. M. Fillitt, W. Max, D. S. Knopman, J. R. Lloyd, and S. Duttagupta, "Prevalence, costs, and treatment of Alzheimer's disease and related dementia: a managed care perspective," *American Journal of Managed Care*, vol. 7, no. 8, pp. 809–818, 2001.
- [3] S. L. Rosenthal and M. I. Kamboh, "Late-onset Alzheimer's disease genes and the potentially implicated pathways," *Current Genetic Medicine Reports*, vol. 2, pp. 85–101, 2014.
- [4] M. Prince, A. Wimo, M. Guerchet, G.-C. Ali, Y.-T. Wu, and M. Prina, *World Alzheimer report 2015. The global impact of dementia*. 2015.
- [5] A. Burns, R. Jacoby, and R. Levy, "Psychiatric phenomena in Alzheimer ' s disease . I : disorders of thought content," *British Journal of Psychiatry*, vol. 157, pp. 72–77, 1990.
- [6] W. Thies and L. Bleiler, "2011 Alzheimer's disease facts and figures," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 7, pp. 208–244, 2011.
- [7] D. M. Walsh and D. J. Selkoe, "A $\beta$  oligomers - A decade of discovery," *Journal of Neurochemistry*, vol. 101, pp. 1172–1184, 2007.
- [8] C. Haass, E. H. Koo, A. Mellon, A. Y. Hung, and D. J. Selkoe, "Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments," *Nature*, vol. 357, no. 6378, pp. 500–503, Jun. 1992.
- [9] P. Seubert et al., "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's  $\beta$ -peptide from biological fluids," *Nature*, vol. 359, no. 6393, pp. 325–327, Sep. 1992.
- [10] M. Citron et al., "Mutation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases  $\beta$ -protein production," *Nature*, vol. 360, no. 6405, pp. 672–674, Dec. 1992.
- [11] S. Kumar-Singh et al., "Mean Age-of-Onset of familial Alzheimer disease caused by preseilin mutations correlates with both increased AB42 and decreased AB40," *Human Mutation*, vol. 88, no. 6, pp. 41–48, 2014.
- [12] A. Rovelet-Lecrux et al., "APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy," *Nature Genetics*, vol. 38, no. 1, pp. 24–26, 2006.
- [13] C. Haass and D. J. Selkoe, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide," *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 2, pp. 101–112, 2007.
- [14] R. P. Tucker, "The roles of microtubule associated proteins in brain morphogenesis: A review," *Brain Research Reviews*, vol. 15, pp. 101–120, 1990.

- [15] D. N. Drechsel, A. A. Hyman, M. H. Cobb, and M. W. Kirschner, "Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 3, no. 10, pp. 1141–1154, 1992.
- [16] M. Goedert, M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich, and R. A. Crowther, "Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain," *The EMBO journal*, vol. 8, no. 2, pp. 393–399, 1989.
- [17] M. Butler and M. L. Shelanski, "Microheterogeneity of microtubule-associated tau proteins is due to differences in phosphorylation," *Journal of neurochemistry*, vol. 47, no. 5, pp. 1517–1522, 1986.
- [18] M. P. Mazanetz and P. M. Fischer, "Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases," *Nature Reviews: Drug Discovery*, vol. 6, no. 6, pp. 464–479, 2007.
- [19] K. Iqbal et al., "Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease," *Lancet*, vol. 2, no. 8504, pp. 421–426, Aug. 1986.
- [20] S. Roy, B. Zhang, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, "Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases," *Acta Neuropathologica*, vol. 109, no. 1, pp. 5–13, 2005.
- [21] H. Braak and E. Braak, "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes," *Acta Neuropathologica*, vol. 82, no. 4, pp. 239–259, 1991.
- [22] H. Braak and E. Braak, "Staging of alzheimer's disease-related neurofibrillary changes," *Neurobiology of Aging*, vol. 16, no. 3, pp. 271–278, 1995.
- [23] R. H. Swerdlow and S. M. Khan, "A 'mitochondrial cascade hypothesis' for sporadic Alzheimer's disease," *Medical Hypotheses*, vol. 63, no. 1, pp. 8–20, 2004.
- [24] W. D. Parker, C. M. Filley, and J. K. Parks, "Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 40, pp. 1302–1303, 1990.
- [25] D. Gabuzda, J. Busciglio, L. B. Chen, P. Matsudaira, and B. A. Yankner, "Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 18, pp. 13623–13628, 1994.
- [26] L. Gasparini et al., "Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells," *Neuroscience Letters*, vol. 231, no. 2, pp. 113–117, 1997.
- [27] M. T. Webster, B. R. Pearce, D. M. Bowen, and P. T. Francis, "The effects of perturbed energy metabolism on the processing of amyloid precursor protein in PC12 cells," *Journal of neural transmission*, vol. 105, pp. 839–853, 1998.
- [28] H. L. M. Hedin, S. Eriksson, and C. J. Fowler, "Rapid inhibition by sodium azide of the phosphoinositide-mediated calcium response to serotonin stimulation in human platelets: Preservation in Alzheimer's disease," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 274, no. 2, pp. 472–476, 2000.

- [29] J. Busciglio et al., "Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome," *Neuron*, vol. 33, no. 5, pp. 677–688, 2002.
- [30] N. J. Webster, K. N. Green, C. Peers, and P. F. T. Vaughan, "Altered processing of amyloid precursor protein in the human neuroblastoma SH-SY5Y by chronic hypoxia," *Journal of Neurochemistry*, vol. 83, pp. 1262–1271, 2002.
- [31] N. J. Webster, K. N. Green, V. J. Settle, C. Peers, and P. F. T. Vaughan, "Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: No role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways," *Molecular Brain Research*, vol. 130, pp. 161–169, 2004.
- [32] A. G. Henriques, S. C. Domingues, M. Fardilha, E. F. da Cruz e Silva, and O. A. da Cruz e Silva, "Sodium azide and 2-deoxy-D-glucose-induced cellular stress affects phosphorylation-dependent A $\beta$  processing," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 7, no. 3, pp. 201–262, 2005.
- [33] R. A. Velliquette, T. O'Connor, and R. Vassar, "Energy inhibition B-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: Possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis," *Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 47, pp. 10874–10883, 2005.
- [34] K. Xiong, H. Cai, X. G. Luo, R. G. Struble, R. W. Clough, and X. X. Yan, "Mitochondrial respiratory inhibition and oxidative stress elevate  $\beta$ -secretase (BACE1) proteins and activity in vivo in the rat retina," *Experimental Brain Research*, vol. 181, pp. 435–446, 2007.
- [35] C. A. Hansson Petersen et al., "The amyloid  $\beta$ -peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, no. 35, pp. 13145–13150, 2008.
- [36] L. F. Hernandez-Zimbron et al., "Amyloid- $\beta$  peptide binds to cytochrome c oxidase subunit 1," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, pp. 29–31, 2012.
- [37] V. Rhein et al., "Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 29, no. 6–7, pp. 1063–1071, 2009.
- [38] V. Rhein et al., "Amyloid- and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, no. 47, pp. 20057–20062, 2009.
- [39] R. Garesse and C. G. Vallejo, "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes," *Gene*, vol. 263, no. 1–2, pp. 1–16, 2001.
- [40] J. M. Cuezva, L. K. Ostronoff, J. Ricart, M. López de Heredia, C. M. Di Liegro, and J. M. Izquierdo, "Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis," *Journal of bioenergetics and biomembranes*, vol. 29, no. 4, pp. 365–377, Aug. 1997.
- [41] G. Attardi, "Biogenesis of mitochondria," in *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 4, pp. 289–333, 1988.

- [42] E. Iglesias Huerta, *Disfunción del sistema de fosforilación oxidativa en la Enfermedad de Parkinson: Desarrollo de un modelo celular*. 2014.
- [43] S. Anderson et al., "Sequence and organization of the human mitochondrial genome," *Nature*, vol. 290, no. 5806, pp. 457–465, 1981.
- [44] P. Sutovsky, E. Neuber, and G. Schatten, "Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 61, no. 3, pp. 406–413, 2002.
- [45] D. A. Clayton, "Vertebrate mitochondrial DNA - A circle of surprises," *Experimental Cell Research*, vol. 255, no. 1, pp. 4–9, 2000.
- [46] J. Smeitink, L. Van Den Heuvel, and S. Dimauro, "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation," *Nature Review: Genetics*, vol. 2, no. May, pp. 342–352, 2001.
- [47] F. Distelmaier et al., "Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease," *Brain*, vol. 132, no. 4, pp. 833–842, 2008.
- [48] T. Elston, H. Wang, and G. Oster, "Energy transduction in ATP synthase," *Nature*, vol. 391, no. 6666, pp. 510–513, 1998.
- [49] I. Fridovich, "Fundamental aspects of reactive oxygen species , or what ' s the matter with oxygen ?," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 893, pp. 13–18, 1999.
- [50] M. Huang and L. M. Graves, "De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 60, no. 2, pp. 321–336, 2003.
- [51] M. E. Jones, "Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 49, pp. 253–279, 1980.
- [52] J. M. López-Martín et al., "Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis," *Human Molecular Genetics*, vol. 16, no. 9, pp. 1091–1097, 2007.
- [53] M. Löffler, "A cytokinetic approach to determine the range of O<sub>2</sub>-dependence of pyrimidine(deoxy)nucleotide biosynthesis relevant for cell proliferation," *Cell Proliferation*, vol. 25, pp. 169–179, 1992.
- [54] M. P. King and G. Attardi, "Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation," *Science*, vol. 246, no. 4929, pp. 500–503, 1989.
- [55] N. Gattermann et al., "Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration," *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, vol. 23, no. 8–9, pp. 1275–1279, 2004.
- [56] A. A. Khutorenko, V. V. Roudko, B. V. Chernyak, A. B. Vartapetian, P. M. Chumakov, and A. G. Evstafieva, "Pyrimidine biosynthesis links mitochondrial respiration to the p53 pathway," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 29, pp. 12828–12833, 2010.

- [57] C. Beuneu, R. Auger, M. Löffler, A. Guissani, G. Lemaire, and M. Lepoivre, "Indirect inhibition of mitochondrial dihydroorotate," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 28, no. 8, pp. 1206–1213, 2000.
- [58] R. A. G. Garcia, L. Liu, Z. Hu, A. Gonzalez, R. W. Von Borstel, and J. A. Saydoff, "Severe cytochrome c oxidase inhibition in vivo does not induce a pyrimidine deficiency; neuroprotective action of oral uridine prodrug PN401 requires supraphysiological levels of uridine," *Brain Research*, vol. 1066, no. 1–2, pp. 164–171, 2005.
- [59] J. A. Saydoff et al., "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*, vol. 36, no. 4, pp. 637–657, 2013.
- [60] D. R. Evans and H. I. Guy, "Mammalian pyrimidine biosynthesis: Fresh insights into an ancient pathway," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 32, pp. 33035–33038, 2004.
- [61] M. L. Anthony, M. Zhao, and K. M. Brindle, "Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis following induction of apoptosis in HL-60 cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 28, pp. 19686–19692, 1999.
- [62] B. G. Ng et al., "Biallelic mutations in CAD, impair de novo pyrimidine biosynthesis and decrease glycosylation precursors," *Human Molecular Genetics*, vol. 24, no. 11, pp. 3050–3057, 2014.
- [63] M. Löffler, J. Jöckel, G. Schuster, and C. Becker, "Dihydroorotate-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 174, no. 1–2, pp. 125–129, 1997.
- [64] J. Fang et al., "Protein instability and functional defects caused by mutations of dihydroorotate dehydrogenase in Miller syndrome patients," *Bioscience Reports*, vol. 32, no. 6, pp. 631–639, 2012.
- [65] A. A. Khutorenko, A. A. Dalina, B. V Chernyak, P. M. Chumakov, and A. G. Evstafieva, "The role of dihydroorotate dehydrogenase in apoptosis induction in response to inhibition of the mitochondrial respiratory chain complex III," *Acta Naturae*, vol. 6, no. complex V, pp. 69–75, 2014.
- [66] J. Fang et al., "Dihydro-otate dehydrogenase is physically associated with the respiratory complex and its loss leads to mitochondrial dysfunction," *Bioscience Reports*, vol. 33, no. 2, pp. 217–227, 2013.
- [67] S. Vincenzetti, V. Polzonetti, D. Micozzi, and S. Pucciarelli, "Enzymology of pyrimidine metabolism and neurodegeneration," *Current medicinal chemistry*, vol. 23, pp. 1408–1431, 2016.
- [68] G. P. Connolly and J. A. Duley, "Uridine and its nucleotides: Biological actions, therapeutic potentials," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 20, no. 5, pp. 218–225, 1999.
- [69] a R. Van Rompay, A. Norda, K. Lindén, M. Johansson, and A. Karlsson, "Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases," *Molecular pharmacology*, vol. 59, no. 5, pp. 1181–1186, 2001.

- [70] W. Wharton and W. J. Pledger, "Regulation of uridine kinase activity in BALB/C-3T3 cells by serum components," *In Vitro*, vol. 17, no. 8, pp. 706–712, 2014.
- [71] A. Rossi and J. Olivares, "Basis of pyrimidine nucleotide metabolism in the myocardium," *Cardiovascular drugs and therapy*, vol. 12 Suppl 2, pp. 171–7, Sep. 1998.
- [72] A. B. P. Van Kuilenburg, R. Meinsma, P. Vreken, H. R. Waterham, and A. H. Van Gennip, "Identification of a cDNA encoding an isoform of human CTP synthetase," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1492, pp. 548–552, 2000.
- [73] C. Kent and G. M. Carman, "Interactions among pathways for phosphatidylcholine metabolism, CTP synthesis and secretion through the Golgi apparatus," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 24, no. 4, pp. 146–150, 1999.
- [74] H. Kizaki, J. C. Williams, H. P. Morris, and G. Weber, "Increased cytidine 5'-triphosphate synthetase activity in rat and human tumors," *Cancer research*, vol. 40, no. 11, pp. 3921–3927, 1980.
- [75] T. W. Traut, "Physiological concentrations of purines and pyrimidines," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 140, pp. 1–22, 1994.
- [76] M. Huang, Y. Wang, M. Collins, B. S. Mitchell, and L. M. Graves, "A77 1726 induces differentiation of human myeloid leukemia K562 cells by depletion of intracellular CTP pools," *Molecular Pharmacology*, vol. 62, no. 3, pp. 463–472, 2002.
- [77] T. Bulter and L. Elling, "Enzymatic synthesis of nucleotide sugars," *Glycoconjugate journal*, vol. 16, no. 2, pp. 147–159, Feb. 1999.
- [78] S. Manzella, S. Ananth, T. R. Oegema, L. Rodén, L. C. Rosenberg, and E. Meezan, "Inhibition of glycogenin-catalyzed glucosyl and xylosyl transfer by cytidine 5'-diphosphate and related compounds," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 320, no. 2, pp. 361–368, 1995.
- [79] G. Boehmelt et al., "Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells," *EMBO Journal*, vol. 19, no. 19, pp. 5092–5104, 2000.
- [80] U. Ganzinger and F. M. Unger, "The preparation and use of a carrier-bound acceptor for the determination of sialyl transferase activity in serum," *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, vol. 23, no. 10, pp. 691–696, 1985.
- [81] N. J. Parsons et al., "Lactic acid is the factor in blood cell extracts which enhances the ability of CMP-NANA to sialylate gonococcal lipopolysaccharide and induce serum resistance," *Microbial Pathogenesis*, vol. 20, no. 2, pp. 87–100, 1996.
- [82] W. R. Pels Rijcken, B. Overdijk, D. H. van den Eijnden, and W. Ferwerda, "Pyrimidine nucleotide metabolism in rat hepatocytes: evidence for compartmentation of nucleotide pools," *The Biochemical journal*, vol. 293, pp. 207–213, 1993.
- [83] W. R. Pels Rijcken, G. J. Hooghwinkel, and W. Ferwerda, "Pyrimidine metabolism and sugar nucleotide synthesis in rat liver," *The Biochemical Journal*, vol. 266, no. 3, pp. 777–783, 1990.

- [84] L. D. Fairbanks, M. Bofill, K. Ruckemann, and A. Simmonds, "Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-lymphocytes from healthy humans," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, no. 50, pp. 29682–29689, 1995.
- [85] D. E. Vance, E. M. Trip, and H. B. Paddon, "Poliovirus increases phosphatidylcholine biosynthesis in HeLa cells by stimulation of the rate-limiting reaction catalyzed by CTP:phosphocholine cytidyltransferase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, no. 3, pp. 1064–1069, 1980.
- [86] P. C. Choy, H. B. Paddon, and D. E. Vance, "An increase in cytoplasmic CTP accelerates the reaction catalyzed by CTP:phosphocholine cytidyltransferase in poliovirus-infected HeLa cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, no. 3, pp. 1070–1073, 1980.
- [87] Z. Cui, M. Houweling, M. H. Chen, M. Record, H. Chap, and D. E. Vance, "A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 25, pp. 14668–14671, 1996.
- [88] K. H. Pfenninger, "Plasma membrane expansion: A neuron's Herculean task," *Nature Reviews: Neuroscience*, vol. 10, no. 4, pp. 251–261, 2009.
- [89] D. J. Selkoe, "Alzheimer's disease is a synaptic failure," *Science*, vol. 298, no. 5594, pp. 789–791, 2002.
- [90] J. K. Yao, T. M. Wengenack, G. L. Curran, and J. F. Poduslo, "Reduced membrane lipids in the cortex of Alzheimer's disease transgenic mice," *Neurochemical Research*, vol. 34, pp. 102–108, 2009.
- [91] R. M. Nitsch, J. K. Blusztajn, A. G. Pittas, B. E. Slack, J. H. Growdon, and R. J. Wurtman, "Evidence for a membrane defect in Alzheimer disease brain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 5, pp. 1671–1675, 1992.
- [92] C. Gottfries, I. Karlsson, and L. Svennerholm, "Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type," *International Psychogeriatrics*, vol. 8, no. 3, pp. 365–372, 1996.
- [93] J. W. Pettegrew, K. Panchalingam, R. L. Hamilton, and R. J. McClure, "Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease," *Neurochemical Research*, vol. 26, no. 7, pp. 771–782, 2001.
- [94] G. M. Hatch and G. McClarty, "Regulation of cardiolipin biosynthesis in H9c2 cardiac myoblasts by cytidine 5'-triphosphate," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 42, pp. 25810–25816, 1996.
- [95] B. M. Ross, A. Moszczynska, J. K. Blusztajn, A. Sherwin, A. Lozano, and S. J. Kish, "Phospholipid biosynthetic enzymes in human brain," *Lipids*, vol. 32, no. 4, pp. 351–358, 1997.
- [96] I. Ziabreva et al., "Injury and differentiation following inhibition of mitochondrial respiratory chain complex IV in rat oligodendrocytes," *Glia*, vol. 58, pp. 1827–1837, 2010.

- [97] S. a Farber, B. E. Slack, and J. K. Blusztajn, "Acceleration of phosphatidylcholine synthesis and breakdown by inhibitors of mitochondrial function in neuronal cells: a model of the membrane defect of Alzheimer's disease," *The FASEB journal*, vol. 14, no. 14, pp. 2198–2206, 2000.
- [98] M. D. Brand, "Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing," *Experimental Gerontology*, vol. 35, no. 6–7, pp. 811–820, 2000.
- [99] A. P. Wasilewska-Sampaio, "Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound," *The FASEB Journal*, vol. 19, pp. 1627–1636, 2005.
- [100] L. Freitas-Correa et al., "2,4-Dinitrophenol induces neural differentiation of murine embryonic stem cells," *Stem Cell Research*, vol. 11, no. 3, pp. 1407–1416, 2013.
- [101] I. López G.-Coviella, J. Agut, J. A. Ortiz, and R. J. Wurtman, "Effects of orally administered cytidine 5'-diphosphate choline on brain phospholipid content," *The Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 3, no. 6, pp. 313–315, 1992.
- [102] S. Knapp and R. J. Wurtman, "Enhancement of free fatty acid incorporation into phospholipids by choline plus cytidine," *Brain Research*, vol. 822, no. 1–2, pp. 52–59, 1999.
- [103] V. Silei, V. Politi, and G. M. Lauro, "Uridine induces differentiation in human neuroblastoma cells via protein kinase C epsilon," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 61, pp. 206–211, 2000.
- [104] C. S. Wang and R. K. K. Lee, "Choline plus cytidine stimulate phospholipid production, and the expression and secretion of amyloid precursor protein in rat PC12 cells," *Neuroscience Letters*, vol. 283, pp. 25–28, 2000.
- [105] A. M. Pooler, D. H. Guez, R. Benedictus, and R. J. Wurtman, "Uridine enhances neurite outgrowth in nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma cells," *Neuroscience*, vol. 134, no. 1, pp. 207–214, 2005.
- [106] V. Savci and R. J. Wurtman, "Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices," *Journal of Neurochemistry*, vol. 64, no. 1, pp. 378–384, 2002.
- [107] M. Alberghina, M. Viola, I. Serra, A. Mistretta, and A. M. Giuffrida, "Effect of CDP-choline on the biosynthesis of phospholipids in brain regions during hypoxic treatment," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 6, pp. 421–433, 1981.
- [108] G. Trovarelli, G. E. De Medio, R. V. Dorman, G. L. Piccinin, L. A. Horrocks, and G. Porcellati, "Effect of cytidine diphosphate choline (CDP-choline) on ischemia-induced alterations of brain lipid in the gerbil," *Neurochemical Research*, vol. 6, no. 8, pp. 821–833, 1981.
- [109] G. Trovarelli, C. A. Palmerini, A. Floridi, G. I. Piccinin, and G. E. De Medio, "Effect of cytidine on the modification of phospholipid metabolism induced by ischemia," *Neurochemical Research*, vol. 12, no. 3, pp. 227–230, 1987.
- [110] J. Agut, I. Lopez G.-Coviella, J. A. Ortiz, and R. J. Wurtman, "Oral cytidine 5'-diphosphate choline administration to rats increases brain phospholipid levels," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 695, no. 1, pp. 318–320, 1993.

- [111] I. López-Coviella, J. Agut, V. Savci, J. A. Ortiz, and R. J. Wurtman, "Evidence that 5-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels," *Journal of Neurochemistry*, vol. 65, no. 2, pp. 889–894, 1995.
- [112] A. M. Rao, J. F. Hatcher, and R. J. Dempsey, "Lipid alterations in transient forebrain ischemia: Possible new mechanisms of CDP-choline neuroprotection," *Journal of Neurochemistry*, vol. 75, no. 6, pp. 2528–2535, 2000.
- [113] R. M. Adibhatla, J. F. Hatcher, and R. J. Dempsey, "Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia," *Stroke: Journal of the American Heart Association*, vol. 32, no. 10, pp. 2376–2381, 2001.
- [114] L. Wang, A. M. Pooler, M. A. Albrecht, and R. J. Wurtman, "Dietary uridine-5'-monophosphate supplementation increases potassium-evoked dopamine release and promotes neurite outgrowth in aged rats," *Journal of molecular neuroscience*, vol. 27, pp. 13–22, 2005.
- [115] R. J. Wurtman, I. H. Ulus, M. Cansev, C. J. Watkins, L. Wang, and G. Marzloff, "Synaptic proteins and phospholipids are increased in gerbil brain by administering uridine plus docosahexaenoic acid orally," *Brain Research*, vol. 1088, pp. 83–92, 2006.
- [116] M. Cansev and R. J. Wurtman, "Chronic administration of docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid, but not arachidonic acid, alone or in combination with uridine, increases brain phosphatide and synaptic protein levels in gerbils," *Neuroscience*, vol. 148, no. 2, pp. 421–431, 2007.
- [117] O. Hurtado et al., "A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke," *Neurobiology of Disease*, vol. 26, no. 1, pp. 105–111, 2007.
- [118] R. J. Wurtman, M. Cansev, T. Sakamoto, and I. H. Ulus, "Administration of docosahexaenoic acid, uridine and choline increases levels of synaptic membranes and dendritic spines in rodent brain," *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 99, pp. 71–96, 2009.
- [119] J. Gerlach, M. Löffler, and M. K. H. Schäfer, "Gene expression of enzymes required for the de novo synthesis and degradation of pyrimidines in rat peripheral tissues and brain," *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, vol. 30, no. 12, pp. 1147–1154, 2011.
- [120] C. M. Schaefer, M. K. H. Schäfer, and M. Löffler, "Region-specific distribution of dihydroorotate dehydrogenase in the rat central nervous system points to pyrimidine de novo synthesis in neurons," *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, vol. 29, no. 4–6, pp. 476–481, 2010.
- [121] P. Baumann et al., "Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor A771726 (leflunomide) induces apoptosis and diminishes proliferation of multiple myeloma cells," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, no. 2, pp. 366–375, 2009.

- [122] A. K. Mohamad Fairus, B. Choudhary, S. Hosahalli, N. Kavitha, and O. Shatrah, "Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors affect ATP depletion, endogenous ROS and mediate S-phase arrest in breast cancer cells," *Biochimie*, vol. 135, pp. 154–163, 2017.
- [123] P. A. Bourget and G. C. Tremblay, "Pyrimidine biosynthesis in rat brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 19, pp. 1617–1624, 1972.
- [124] G. E. Shambaugh III, S. C. Mrozak, B. E. Metzger, and N. Freinkel, "Glutamine-dependent carbamyl phosphate synthetase during fetal and neonatal life in the rat," *Developmental Biology*, vol. 37, pp. 171–185, 1974.
- [125] M. E. Weichsel and B. R. Clark, "Pyrimidine metabolism during restorative brain growth after neonatal undernutrition in the rat," *Pediatric Research*, vol. 11, pp. 293–297, 1977.
- [126] M. E. Weichsel, N. J. Hoogenraad, R. L. Levine, and N. Kretghmer, "Pyrimidine biosynthesis during development of rat cerebellum," *Pediatric Research*, vol. 6, pp. 682–686, 1972.
- [127] H. Koenig, "Uptake of adenine-8-C14 and orotic-6-C14 acid into nuclear DNA of non-dividing cells in the adult feline neuraxis," *The Journal of Biphysical and biochemical Cytology*, vol. 4, pp. 664–667, 1958.
- [128] W. T. Murakami, D. W. Visser, and H. E. Pearson, "Incorporation of L-carbamyl-C14-aspartate into acid-soluble pyrimidine nucleotides of mouse brain," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 100, pp. 463–467, 1959.
- [129] W. Wells, D. Gaines, and H. Koenig, "Studies of pyrimidine nucleotide metabolism in the central nervous system I: Metabolic effects and metabolism of 6-Azauridine," *Journal of Neurochemistry*, vol. 10, pp. 709–723, 1963.
- [130] D. H. Adams, "Some observations on the incorporation of precursors into ribonucleic acid rat brain," *Journal of Neurochemistry*, vol. 12, pp. 783–790, 1965.
- [131] B. H. Duvilanski, A. M. Soto, A. E. R. de Guglielmone, and C. J. Gómez, "Age-dependent changes of uridine nucleotide and RNA metabolism in the brain of normal and hypothyroid rats," *Acta physiologica latino americana*, vol. 25, no. 3, pp. 165–171, 1975.
- [132] R. G. Wiley, R. J. Gralla, E. S. Casper, and N. Kemeny, "Neurotoxicity of the pyrimidine synthesis inhibitor N-phosphonoacetyl-L-aspartate," *Annals of Neurology*, vol. 12, pp. 175–183, 1982.
- [133] J. Pausch, D. Keppler, and K. Decker, "Activity and distribution of the enzymes of uridylate synthesis from orotate in animal tissues," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 258, pp. 395–403, 1972.
- [134] B. W. Potvin, H. J. Stern, S. Randolph May, G. F. Lam, and R. S. Krooth, "Inhibition by barbituric acid and its derivatives of the enzymes in rat brain which participate in the synthesis of pyrimidine ribotides," *Biochemical Pharmacology*, vol. 27, no. 5, pp. 655–665, 1978.

- [135] A. F. Hogans, G. Guroff, and S. Udenfriend, "Studies on the origin of pyrimidines for biosynthesis of neural RNA in the rat," *Journal of Neurochemistry*, vol. 18, pp. 1699–1710, 1971.
- [136] J. Burtscher, L. Zangrandi, C. Schwarzer, and E. Gnaiger, "Differences in mitochondrial function in homogenated samples from healthy and epileptic specific brain tissues revealed by high-resolution respirometry," *Mitochondrion*, vol. 25, pp. 104–112, 2015.
- [137] J. Kennedy, "Distribution, subcellular localization, and product inhibition of dihydroorotate oxidation in the rat," *Biochemistry and biophysics*, vol. 157, pp. 369–373, 1973.
- [138] W. Cammer and M. Downing, "Localization of the multifunctional protein CAD in astrocytes of rodent brain," *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 39, no. 5, pp. 695–700, 1991.
- [139] E. A. Carrey, C. Dietz, D. M. Glubb, M. Löffler, J. M. Lucocq, and P. F. Watson, "Detection and location of the enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa," *Reproduction*, vol. 123, no. 6, pp. 757–768, 2002.
- [140] P. E. Slagboom, W. J. de Leeuw, and J. Vijg, "Messenger RNA levels and methylation patterns of GAPDH and beta-actin genes in rat liver, spleen and brain in relation to aging," *Mechanisms of ageing and development*, vol. 53, no. 3, pp. 243–257, Apr. 1990.
- [141] R. V Gutala and P. H. Reddy, "The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains," *Journal of neuroscience methods*, vol. 132, no. 1, pp. 101–107, Jan. 2004.
- [142] C. N. Hall, M. C. Klein-Flugge, C. Howarth, and D. Attwell, "Oxidative Phosphorylation, Not Glycolysis, Powers Presynaptic and Postsynaptic Mechanisms Underlying Brain Information Processing," *Journal of Neuroscience*, vol. 32, no. 26, pp. 8940–8951, 2012.
- [143] R. Taipa et al., "Inflammatory pathology markers (activated microglia and reactive astrocytes) in early and late onset Alzheimer disease: a post mortem study," *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 44, no. 3, pp. 298–313, 2018.
- [144] C. Czech et al., "Metabolite profiling of Alzheimer's disease cerebrospinal fluid," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 2, pp. 1–10, 2012.
- [145] M. G. Olde Rikkert et al., "Differences in nutritional status between very mild Alzheimer's disease patients and healthy controls," *Journal of Alzheimer's disease*, vol. 41, no. 1, pp. 261–271, 2014.
- [146] N. van Wijk et al., "Nutrients required for phospholipid synthesis are lower in blood and cerebrospinal fluid in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease dementia," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 8, pp. 139–146, 2017.
- [147] G. Wang et al., "Plasma Metabolite Profiles of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment," *Journal of Proteome Research*, vol. 13, no. 5, pp. 2649–2658, 2014.
- [148] F. Drago et al., "Memory deficits of aged male rats can be improved by pyrimidine nucleosides and n-acetyl-glutamine," *Clinical neuropharmacology*, vol. 13, no. 4, pp. 290–296, Aug. 1990.

- [149] L. a Teather and R. J. Wurtman, "Chronic administration of UMP ameliorates the impairment of hippocampal-dependent memory in impoverished rats," *The Journal of nutrition*, vol. 136, no. 11, pp. 2834–2837, 2006.
- [150] S. Holguin, J. Martinez, C. Chow, and R. Wurtman, "Dietary uridine enhances the improvement in learning and memory produced by administering DHA to gerbils," *The FASEB Journal*, vol. 22, no. 11, pp. 3938–3946, 2008.
- [151] S. Holguin, Y. Huang, J. Liu, and R. Wurtman, "Chronic administration of DHA and UMP improves the impaired memory of environmentally impoverished Rats," *Brain*, vol. 191, no. 1, pp. 11–16, 2009.
- [152] B. Goren et al., "Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy," *Brain Research*, vol. 1659, pp. 81–87, 2017.
- [153] B. Goren et al., "Uridine treatment protects against neonatal brain damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia," *Brain Research*, vol. 1676, pp. 57–68, 2017.
- [154] M. N. Gadaleta, V. Petruzzella, F. Fracasso, P. Fernandez-Silva, and P. Cantatore, "Acetyl-L-carnitine increases cytochrome oxidase subunit I mRNA content in hypothyroid rat liver," *FEBS letters*, vol. 277, no. 1–2, pp. 191–193, Dec. 1990.
- [155] M. Manczak, Y. Jung, B. S. Park, D. Partovi, and P. H. Reddy, "Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging," *Journal of Neurochemistry*, vol. 92, no. 3, pp. 494–504, Feb. 2005.
- [156] D. Proudnikov, V. Yuferov, K. S. LaForge, A. Ho, and M. Jeanne Kreek, "Quantification of multiple mRNA levels in rat brain regions using real time optical PCR," *Brain research. Molecular brain research*, vol. 112, no. 1–2, pp. 182–185, Apr. 2003.
- [157] L. Rasmussen et al., "Differential expression of ribosomal genes in brain and blood of Alzheimer's disease patients," *Current Alzheimer research*, vol. 12, no. 10, pp. 984–989, 2015.
- [158] S. J. Kish et al., "Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease," *Journal of neurochemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 776–779, Aug. 1992.
- [159] N. A. Simonian and B. T. Hyman, "Functional alterations in Alzheimer's disease: diminution of cytochrome oxidase in the hippocampal formation," *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 52, no. 6, pp. 580–585, Nov. 1993.
- [160] W. E. Reichman, A. C. Coyne, and A. Shah, "Diagnosis of multi-infarct dementia: predictive value of clinical criteria," *Perceptual and Motor Skills*, vol. 76, no. 3, pp. 793–794, Jun. 1993.
- [161] M. Wong-Riley et al., "Cytochrome oxidase in Alzheimer's disease: Biochemical, histochemical, and immunohistochemical analyses of the visual and other systems," *Vision Research*, vol. 37, no. 24, pp. 3593–3608, 1997.
- [162] S. J. Kish et al., "Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: A nonspecific change?," *Journal of Neurochemistry*, vol. 72, no. 2, pp. 700–707, 1999.

- [163] Z. Nagy, M. M. Esiri, M. LeGris, and P. M. Matthews, "Mitochondrial enzyme expression in the hippocampus in relation to Alzheimer-type pathology," *Acta neuropathologica*, vol. 97, no. 4, pp. 346–354, Apr. 1999.
- [164] I. Maurer, S. Zierz, and H. J. Möller, "A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients," *Neurobiology of Aging*, vol. 21, no. 3, pp. 455–462, 2000.
- [165] R. W. H. Verwer, K. A. Jansen, A. A. Sluiter, C. W. Pool, W. Kamphorst, and D. F. Swaab, "Decreased hippocampal metabolic activity in Alzheimer patients is not reflected in the immunoreactivity of cytochrome oxidase subunits," *Experimental Neurology*, vol. 163, no. 2, pp. 440–451, 2000.
- [166] D. A. Cottrell, E. L. Blakely, M. A. Johnson, P. G. Ince, and D. M. Turnbull, "Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD," *Neurology*, vol. 57, no. 2, pp. 260–264, Jul. 2001.
- [167] J. Valla, J. D. Berndt, and F. Gonzalez-Lima, "Energy hypometabolism in posterior cingulate cortex of Alzheimer's patients: Superficial laminar cytochrome oxidase associated with disease duration," *The Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 13, pp. 4923–4930, 2001.
- [168] F. Bosetti et al., "Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 23, no. 3, pp. 371–376, 2002.
- [169] L. Devi, B. D. Prabhu, D. F. Galati, N. G. Avadhani, and H. K. Anandatheerthavarada, "Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 35, pp. 9057–9068, 2006.
- [170] E. Pérez-Gracia, B. Torrejón-Escribano, and I. Ferrer, "Dystrophic neurites of senile plaques in Alzheimer's disease are deficient in cytochrome c oxidase," *Acta Neuropathologica*, vol. 116, no. 3, pp. 261–268, 2008.
- [171] J. Long, P. He, Y. Shen, and R. Li, "New evidence of mitochondria dysfunction in the female alzheimer's disease brain: Deficiency of estrogen receptor- $\beta$ ," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 30, no. 3, pp. 545–558, 2012.
- [172] L. Holper, D. Ben-Shachar, and J. J. Mann, "Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease," *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, May 2018.
- [173] J. Ojaimi, C. L. Masters, C. McLean, K. Opeskin, P. McKelvie, and E. Byrne, "Irregular distribution of cytochrome c oxidase protein subunits in aging and Alzheimer's disease," *Annals of neurology*, vol. 46, no. 4, pp. 656–660, Oct. 1999.
- [174] E. M. Mutisya, A. C. Bowling, and M. F. Beal, "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease," *Journal of neurochemistry*, vol. 63, no. 6, pp. 2179–2184, Dec. 1994.

- [175] W. D. Parker et al., "Reduced platelet cytochrome c oxidase activity in Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 44, no. 6, pp. 1086–1090, Jun. 1994.
- [176] W. D. Parker, J. Parks, C. M. Filley, and B. K. Kleinschmidt-DeMasters, "Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain," *Neurology*, vol. 44, no. 6, pp. 1090–1096, Jun. 1994.
- [177] P. Chagnon, C. Bétard, Y. Robitaille, A. Cholette, and D. Gauvreau, "Distribution of brain cytochrome oxidase activity in various neurodegenerative diseases," *Neuroreport*, vol. 6, no. 5, pp. 711–715, Mar. 1995.
- [178] I. Maurer, S. Zierz, H. J. Möller, and F. Jerusalem, "Cytochrome c oxidase in Alzheimer's disease," *Neurology*, vol. 45, no. 7, p. 1423, Jul. 1995.
- [179] N. a Simonian and B. T. Hyman, "Functional alterations in neural circuits in Alzheimer's disease," *Neurobiology of aging*, vol. 16, no. 3, pp. 305–309, 1995.
- [180] F. Gonzalez-Lima, J. Valla, and S. Matos-Collazo, "Quantitative cytochemistry of cytochrome oxidase and cellular morphometry of the human inferior colliculus in control and Alzheimer's patients," *Brain Research*, vol. 752, no. 1–2, pp. 117–126, 1997.
- [181] N. C. Berchtold, M. N. Sabbagh, T. G. Beach, R. C. Kim, D. H. Cribbs, and C. W. Cotman, "Brain gene expression patterns differentiate mild cognitive impairment from normal aged and Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 35, no. 9, pp. 1961–1972, Sep. 2014.
- [182] M. Armand-Ugon, B. Ansoleaga, S. Berjaoui, and I. Ferrer, "Reduced , mitochondrial activity is early and steady in the entorhinal cortex but it is mainly unmodified in the frontal cortex in Alzheimer's disease," *Current Alzheimer research*, vol. 14, no. 12, pp. 1327–1334, Oct. 2017.
- [183] K. Chandrasekaran, T. Giordano, D. R. Brady, J. Stoll, L. J. Martin, and S. I. Rapoport, "Impairment in mitochondrial cytochrome oxidase gene expression in Alzheimer disease," *Brain research. Molecular brain research*, vol. 24, no. 1–4, pp. 336–40, Jul. 1994.
- [184] N. A. Simonian and B. T. Hyman, "Functional alterations in Alzheimer's disease: selective loss of mitochondrial-encoded cytochrome oxidase mRNA in the hippocampal formation," *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 53, no. 5, pp. 508–12, Sep. 1994.
- [185] K. Hatanpää, D. R. Brady, J. Stoll, S. I. Rapoport, and K. Chandrasekaran, "Neuronal activity and early neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease," *Annals of Neurology*, vol. 40, no. 3, pp. 411–420, Sep. 1996.
- [186] K. Chandrasekaran, K. Hatanpää, S. I. Rapoport, and D. R. Brady, "Decreased expression of nuclear and mitochondrial DNA-encoded genes of oxidative phosphorylation in association neocortex in Alzheimer disease," *Molecular Brain Research*, vol. 44, no. 1, pp. 99–104, 1997.

- [187] K. Chandrasekaran, K. Hatanpää, D. R. Brady, J. Stoll, and S. I. Rapoport, "Downregulation of oxidative phosphorylation in Alzheimer disease: loss of cytochrome oxidase subunit mRNA in the hippocampus and entorhinal cortex," *Brain research*, vol. 796, no. 1–2, pp. 13–19, 1998.
- [188] K. Hatanpää, K. Chandrasekaran, D. R. Brady, and S. I. Rapoport, "No association between Alzheimer plaques and decreased levels of cytochrome oxidase subunit mRNA, a marker of neuronal energy metabolism," *Molecular Brain Research*, vol. 59, no. 1, pp. 13–21, 1998.
- [189] M. Y. Aksenov et al., "The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome c oxidase, and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease.," *Neurochemical research*, vol. 24, no. 6, pp. 767–774, Jun. 1999.
- [190] A. C. Rice, A. C. Ladd, and J. P. Bennett, "Postmortem Alzheimer's disease hippocampi show oxidative phosphorylation gene expression opposite that of isolated pyramidal neurons," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 45, no. 4, pp. 1051–1059, Apr. 2015.
- [191] P. E. Coskun et al., "Systemic mitochondrial dysfunction and the etiology of Alzheimer's disease and down syndrome dementia," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 20, no. SUPPL.2, pp. 1–32, 2010.
- [192] K. J. Krishnan, T. E. Ratnaik, H. L. M. De Gruyter, E. Jaros, and D. M. Turnbull, "Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease," *Neurobiology of Aging*, vol. 33, no. 9, pp. 2210–2214, 2012.
- [193] N. R. Phillips, J. W. Simpkins, and R. K. Roby, "Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer's brains: A review Nicole," *Alzheimers & Dementia*, vol. 10, no. 3, pp. 393–400, 2014.
- [194] J. N. Spelbrink, B. A. Van Oost, and C. Van den Bogert, "The relationship between mitochondrial genotype and mitochondrial phenotype in lymphoblasts with a heteroplasmic mtDNA deletion," *Human molecular genetics*, vol. 3, no. 11, pp. 1989–1997, Nov. 1994.
- [195] P. Bubber, V. Haroutunian, G. Fisch, J. P. Blass, and G. E. Gibson, "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications," *Annals of Neurology*, vol. 57, no. 5, pp. 695–703, 2005.
- [196] S. P. Presgraves, T. Ahmed, S. Borwege, and J. N. Joyce, "Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists," *Neurotoxicity research*, vol. 5, no. 8, pp. 579–598, 2004.
- [197] C. Zhang and M. Chu, "Leflunomide: A promising drug with good antitumor potential," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 496, pp. 726–730, 2018.
- [198] N. Hail, P. Chen, and L. R. Bushman, "Teriflunomide (leflunomide) promotes cytostatic, antioxidant, and apoptotic effects in transformed prostate epithelial cells: Evidence supporting a role for teriflunomide in prostate cancer chemoprevention," *Neoplasia*, vol. 12, no. 6, pp. 464–475, 2010.

- [199] J. Fang et al., "Dihydroorotate dehydrogenase depletion hampers mitochondrial function and osteogenic differentiation in osteoblasts," *European Journal of Oral Sciences*, vol. 124, no. 3, pp. 241–245, 2016.
- [200] J. H. Spodnik et al., "Mechanism of leflunomide-induced proliferation of mitochondria in mammalian cells," *Mitochondrion*, vol. 2, no. 3, pp. 163–179, 2002.
- [201] N. J. Hail, P. Chen, J. J. Kepa, L. R. Bushman, and C. Shearn, "Dihydroorotate dehydrogenase is required for N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced reactive oxygen species production and apoptosis," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 247–253, 2009.
- [202] K. Goda, T. Takahashi, A. Kobayashi, T. Shoda, H. Kuno, and S. Sugai, "Usefulness of in vitro combination assays of mitochondrial dysfunction and apoptosis for the estimation of potential risk of idiosyncratic drug induced liver injury," *The Journal of toxicological sciences*, vol. 41, no. 5, pp. 605–615, 2016.
- [203] E. Iglesias et al., "Prenatal exposure to oxidative phosphorylation xenobiotics and late-onset Parkinson disease," *Ageing Research Reviews*, vol. 45, pp. 24–32, Aug. 2018.
- [204] C. W. Phan, P. David, K. H. Wong, M. Naidu, and V. Sabaratnam, "Uridine from pleurotus giganteus and its neurite outgrowth stimulatory effects with underlying mechanism," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 11, pp. 1–16, 2015.
- [205] L. Gasparini et al., "Energy metabolism inhibition impairs amyloid precursor protein secretion from Alzheimer's fibroblasts," *Neuroscience letters*, vol. 263, no. 2–3, pp. 197–200, Mar. 1999.
- [206] H. L. Hedin, S. Eriksson, and C. J. Fowler, "Rapid inhibition by sodium azide of the phosphoinositide-mediated calcium response to serotonin stimulation in human platelets: preservation in Alzheimer's disease," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 274, no. 2, pp. 472–476, Aug. 2000.
- [207] A. Hoyer, H. J. Bardenheuer, E. Martin, and K. Plaschke, "Amyloid precursor protein (APP) and its derivatives change after cellular energy depletion. An in vitro-study," *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, vol. 112, no. 2, pp. 239–253, Feb. 2005.
- [208] S. C. T. S. Domingues, A. G. Henriques, W. Wu, E. F. Da Cruz e Silva, and O. A. B. Da Cruz e Silva, "Altered subcellular distribution of the Alzheimer's amyloid precursor protein under stress conditions," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1096, no. 1, pp. 184–195, Jan. 2007.
- [209] M. Beckman and K. Iverfeldt, "Increased gene expression of beta-amyloid precursor protein and its homologues APLP1 and APLP2 in human neuroblastoma cells in response to retinoic acid," *Neuroscience Letters*, vol. 221, no. 2–3, pp. 73–76, 1997.
- [210] E. A. Milward et al., "The amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is a mediator of the effects of nerve growth factor on neurite outgrowth," *Neuron*, vol. 9, no. 1, pp. 129–137, Jul. 1992.

- [211] D. H. Small et al., "A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth," *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 14, no. 4, pp. 2117–2127, Apr. 1994.
- [212] M. Cansev, C. J. Watkins, E. M. van der Beek, and R. J. Wurtman, "Oral uridine-5'-monophosphate (UMP) increases brain CDP-choline levels in gerbils.," *Brain research*, vol. 1058, no. 1–2, pp. 101–108, Oct. 2005.
- [213] S. A. Yuzwa and D. J. Vocadlo, "O-GlcNAc and neurodegeneration: biochemical mechanisms and potential roles in Alzheimer's disease and beyond," *Chemical Society reviews*, vol. 43, no. 19, pp. 6839–6858, Oct. 2014.
- [214] Y. Zhu, X. Shan, S. A. Yuzwa, and D. J. Vocadlo, "The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 50, pp. 34472–34481, 2014.
- [215] P. Scheltens et al., "Efficacy of Souvenaid in Mild Alzheimer's disease: Results from a randomized, controlled trial," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 31, no. 1, pp. 225–236, Jul. 2012.
- [216] M. Wiesmann, D. Jansen, V. Zerbi, L. M. Broersen, A. Garthe, and A. J. Kiliaan, "Improved Spatial Learning Strategy and Memory in Aged Alzheimer A $\beta$ PPswe/PS1dE9 Mice on a Multi-Nutrient Diet," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 37, no. 1, pp. 233–245, Aug. 2013.
- [217] L. M. Broersen et al., "A specific multi-nutrient diet reduces Alzheimer-like pathology in young adult A $\beta$ PPswe/PS1dE9 mice," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 33, no. 1, pp. 177–190, Dec. 2012.
- [218] D. Jansen et al., "Effects of Specific Multi-Nutrient Enriched Diets on Cerebral Metabolism, Cognition and Neuropathology in A $\beta$ PPswe-PS1dE9 Mice," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 9, p. e75393, Sep. 2013.
- [219] "SH-SY5Y ATCC <sup>®</sup> CRL-2266<sup>™</sup> Homo sapiens bone marrow neuroblast." [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx?geo\\_country=es](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx?geo_country=es).
- [220] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685, 1970.
- [221] B. MacLean et al., "Skyline: An open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 7, pp. 966–968, 2010.
- [222] D. Pesta and E. Gnaiger, "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle," in *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 810, pp. 25–58, 2012.



***ANEXOS***



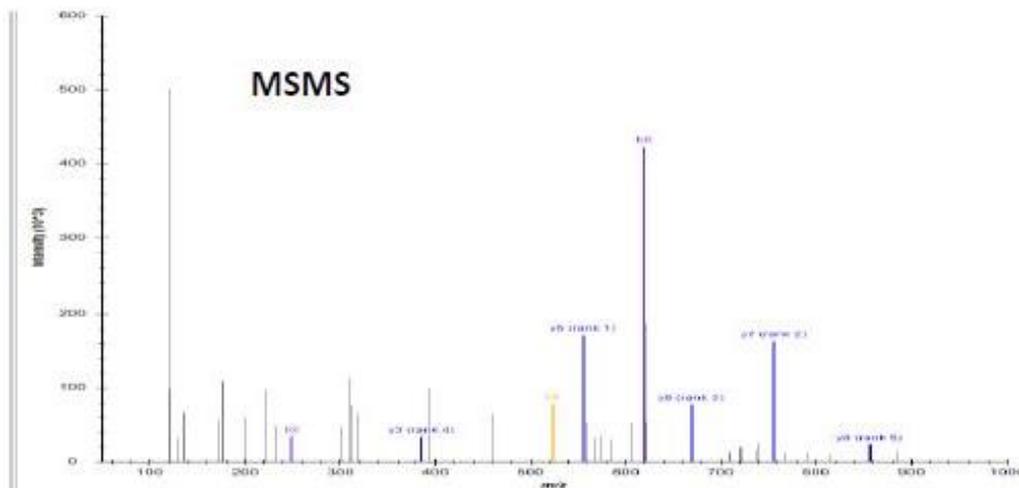
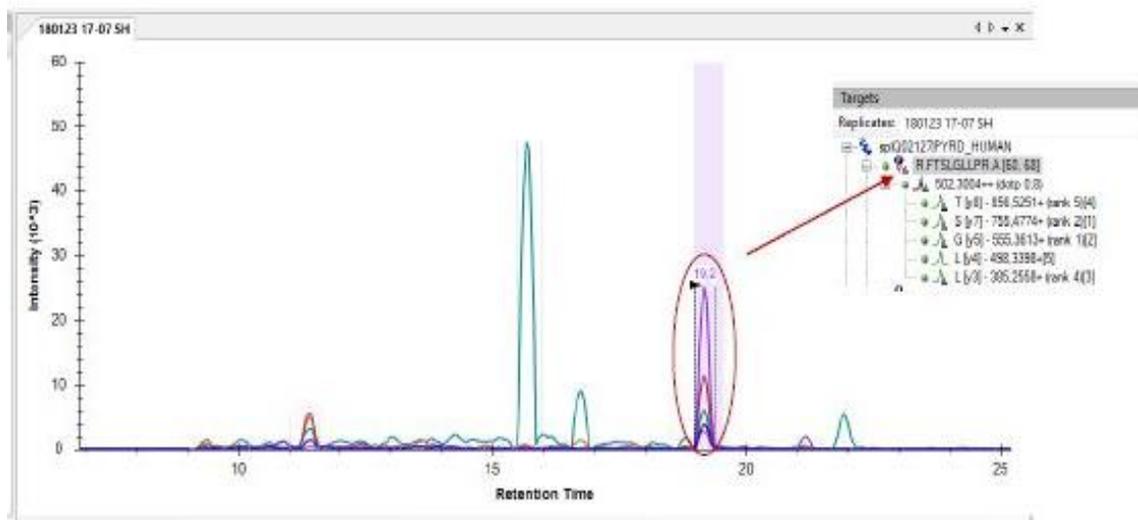
# ANEXOS

## ANEXO I

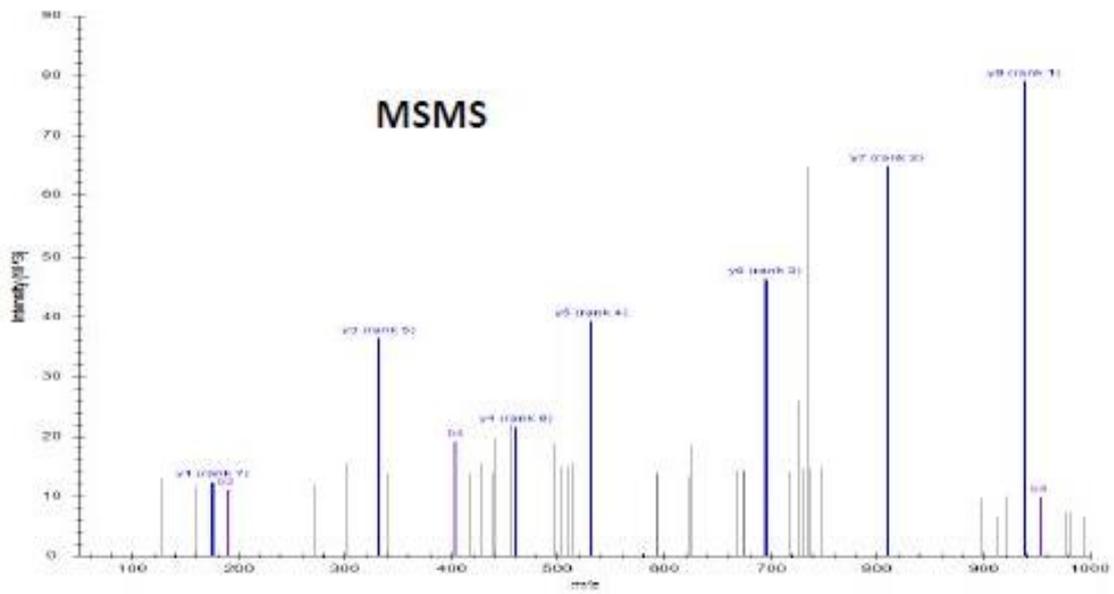
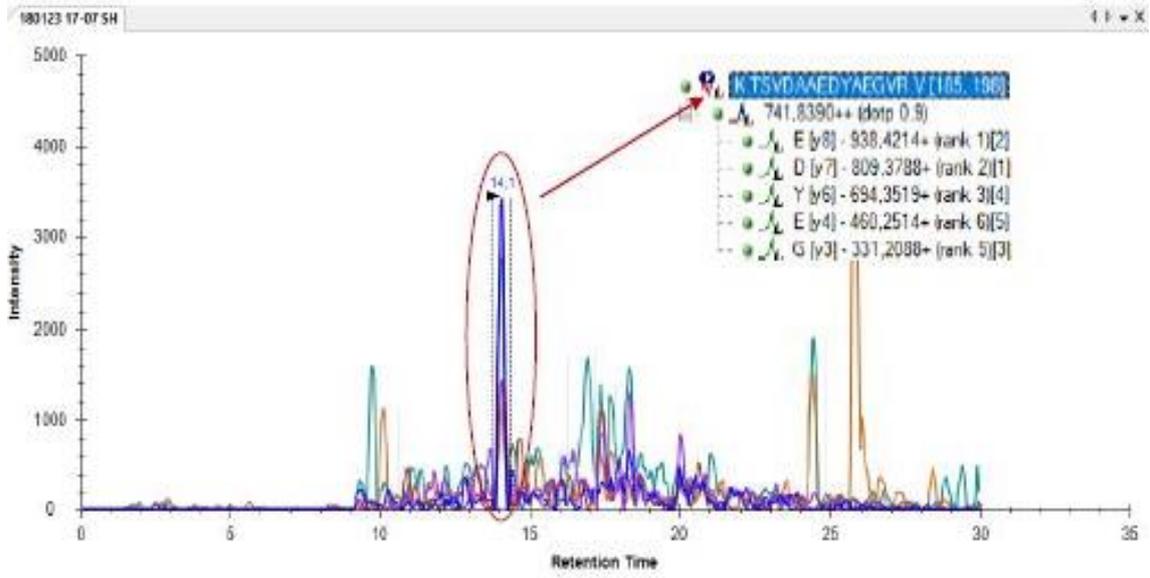
### -Análisis por proteómica dirigida de la banda obtenida del Western blot para la línea celular SH-SY5Y

Análisis mediante proteómica dirigida de la banda recortada del gel del Western blot de DHODH en la muestra de la línea celular SH-SY5Y. Péptidos identificados de la proteína con su correspondiente espectro de fragmentación.

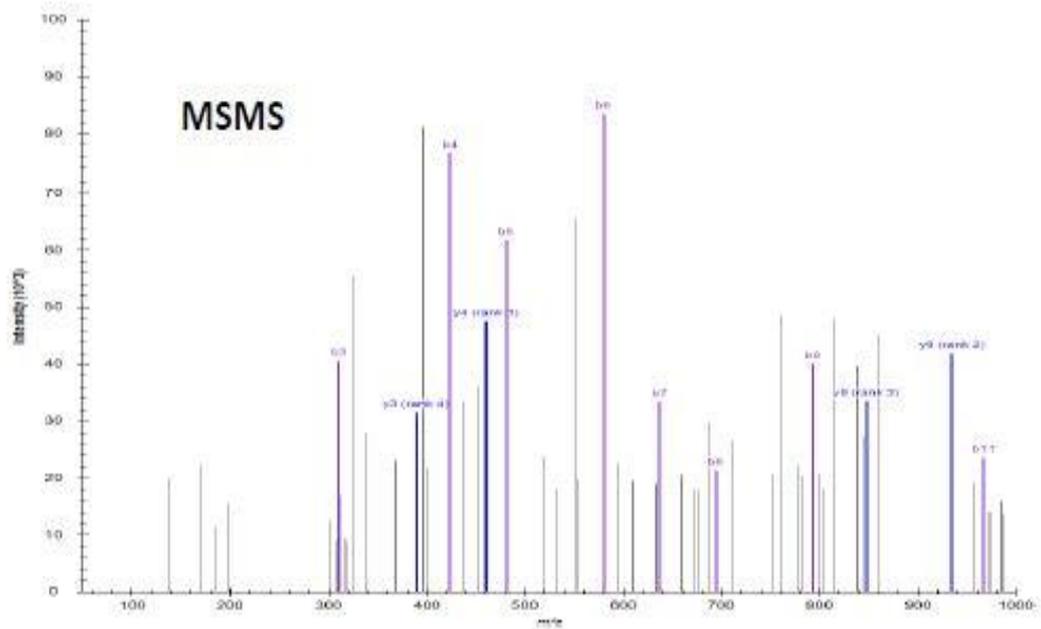
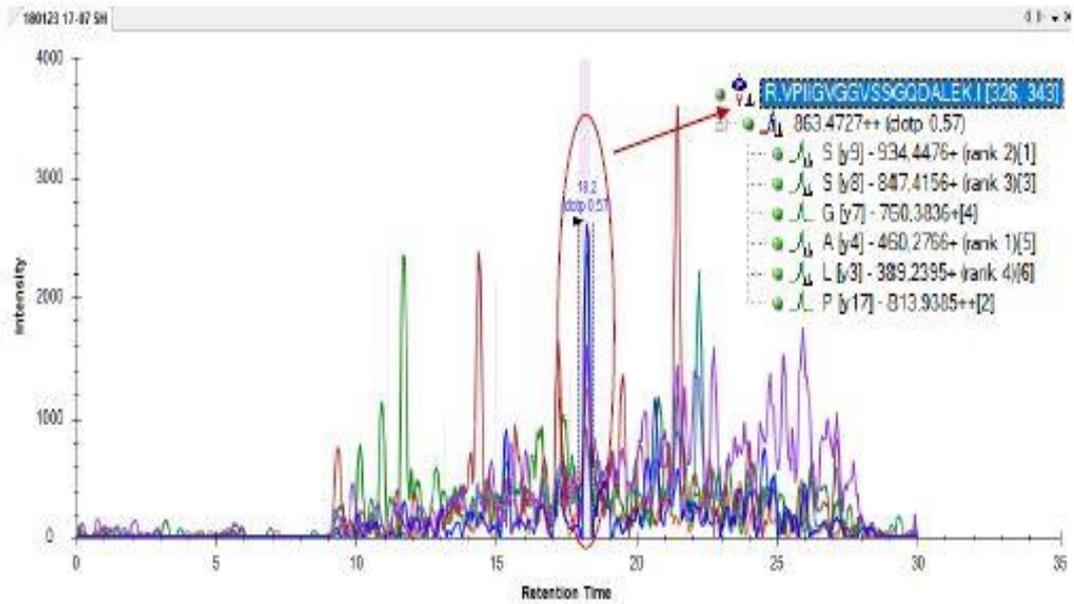
FTSLGLLPR (Secuencia de aminoácidos del 70-78)



TSVDAAE<sup>+</sup>DYAEGV<sup>+</sup>R (Secuencia de aminoácidos del 196-209)



VPIIGVGGVSSGQDALEK (Secuencia de aminoácidos del 336-353)





## ANEXO II

### -Análisis por proteómica dirigida de la banda obtenida de la muestra de cerebro humano tras la separación electroforética bidimensional

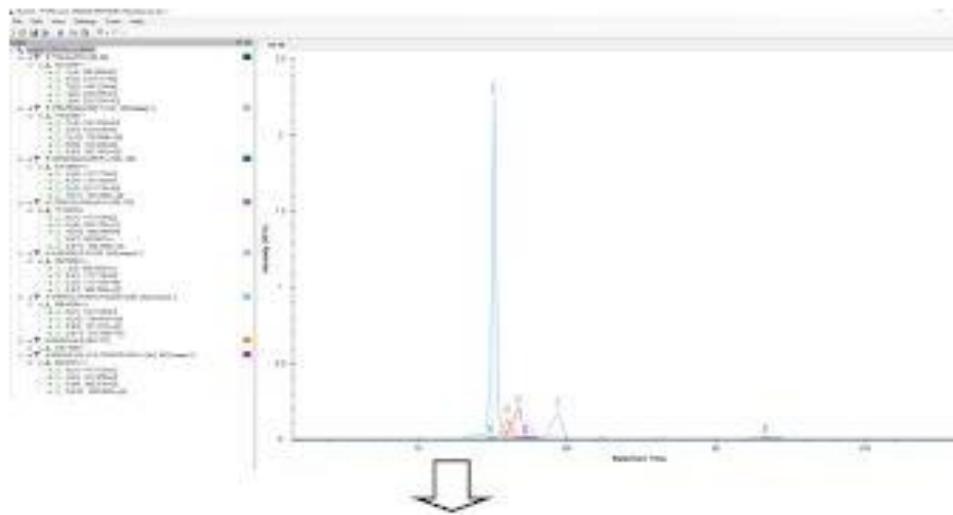
Tras un primer análisis de la muestra se eliminan aquellos péptidos de la proteína DHODH, con sus transiciones, que no son detectados. Se selección, de este modo, los péptidos con alguna evidencia de su presencia en nuestra muestra. De cada uno de estos péptidos se detectan al menos 4 transiciones. Sin embargo, en la mayoría de los casos, las transiciones no son consecutivas (se suelen incluir tres consecutivas) ni las esperadas con mayor intensidad.

Precusores y transiciones para el análisis de proteómica dirigida de DHODH en cerebro:

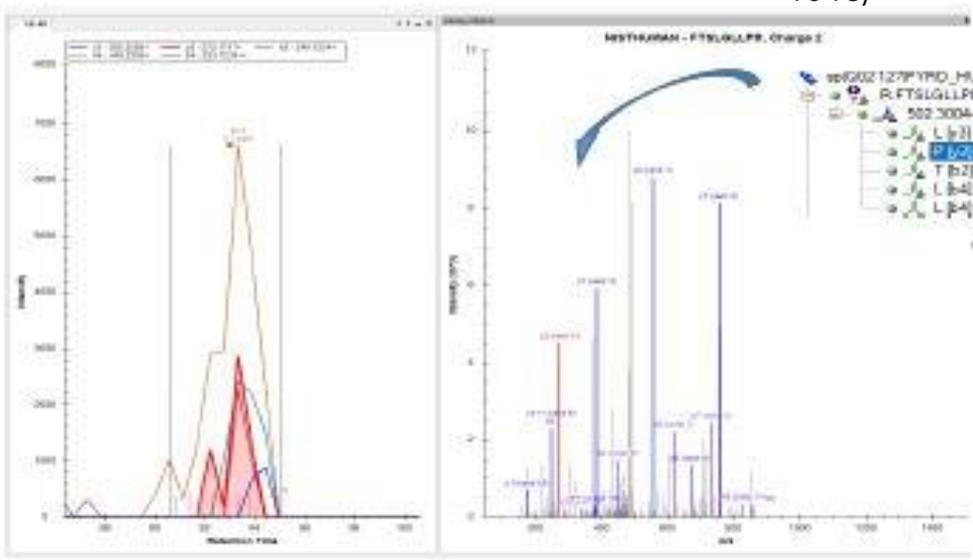


Aunque cromatográficamente hay alguna evidencia, ya que algunas transiciones co-eluyen coincidiendo con la masa de sus péptidos precursores, pudiendo pertenecer, de este modo, a la proteína DHODH, su secuencia no está confirmada por fragmentación. Y en ningún caso la concordancia entre los espectros MSMS de la librería con la que la comparamos (NIST HUMAN) y las transiciones superan el 65 %.

Perfil cromatográfico para el péptido FTSLGLLPR de la proteína DHODH (PYRD\_HUMAN) en corteza entorrinal:

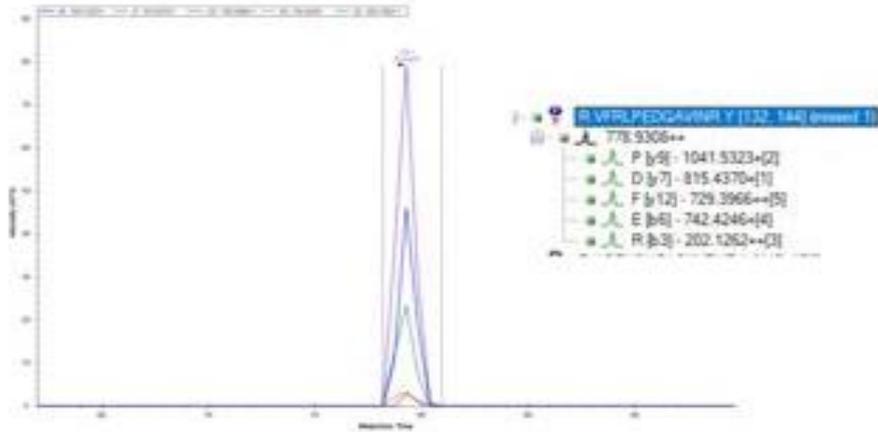


**FTSLGLLPR** (Secuencia de aminoácidos del 70-78)

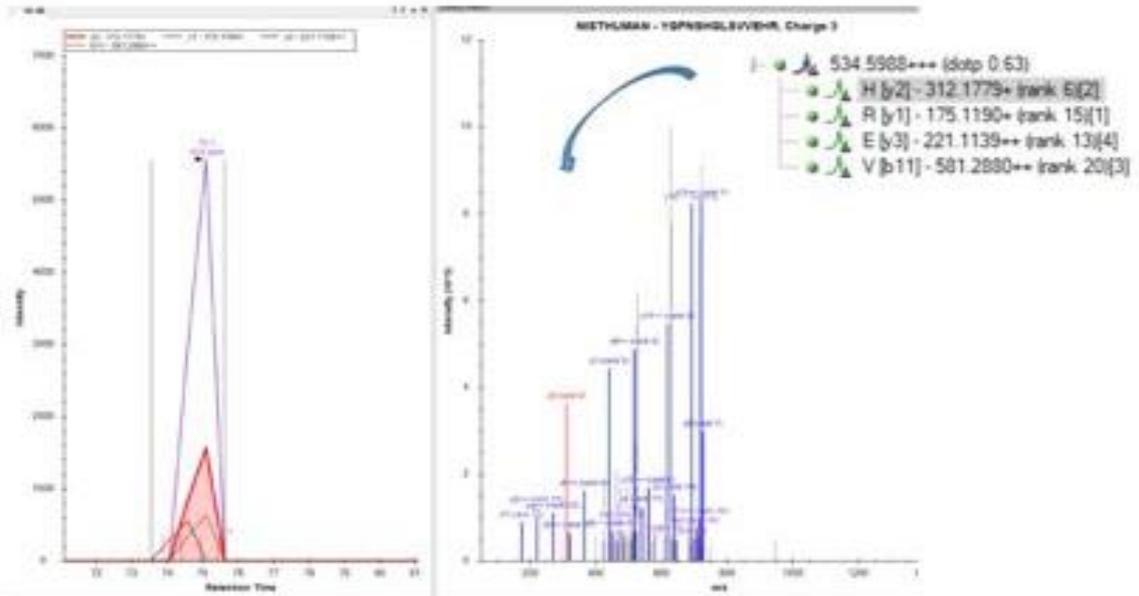


Perfil cromatográfico para los péptidos VFRLPEDQAVINR y YGFNSHGLSVVEHR de la proteína DHODH (PYRD\_HUMAN) en corteza entorrinal.

**VFRLPEDQAVINR** (Secuencia de aminoácidos del 142-154)



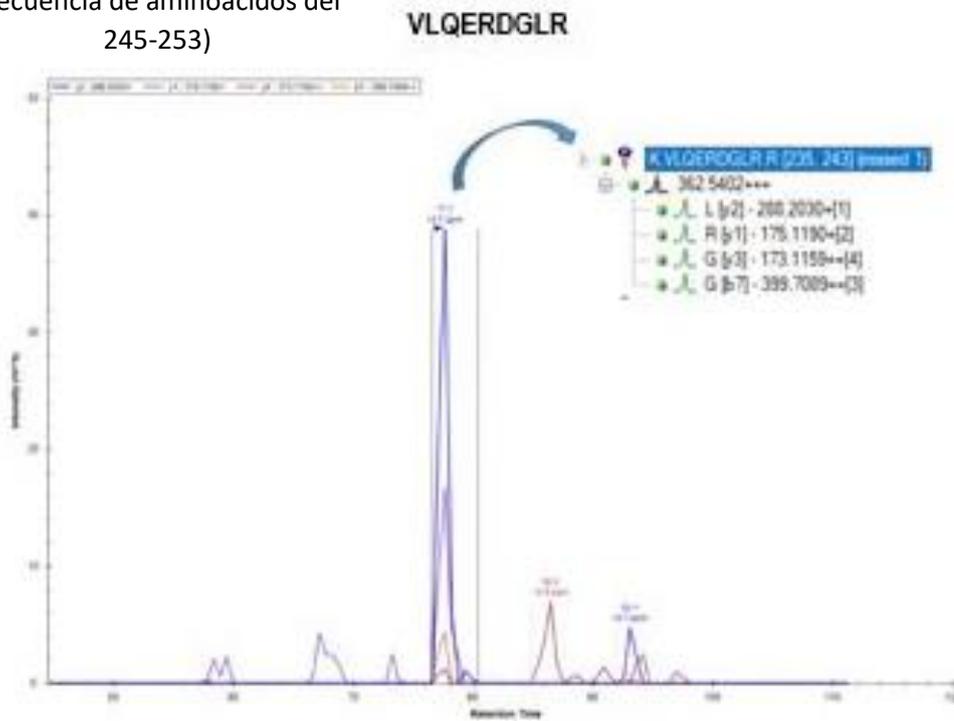
**YGFNSHGLSVVEHR** (Secuencia de aminoácidos del 155-168)



Perfil cromatográfico para los péptidos SLQGKAELR y VLQERDGLR de la proteína DHODH (PYRD\_HUMAN) en corteza entorrinal.

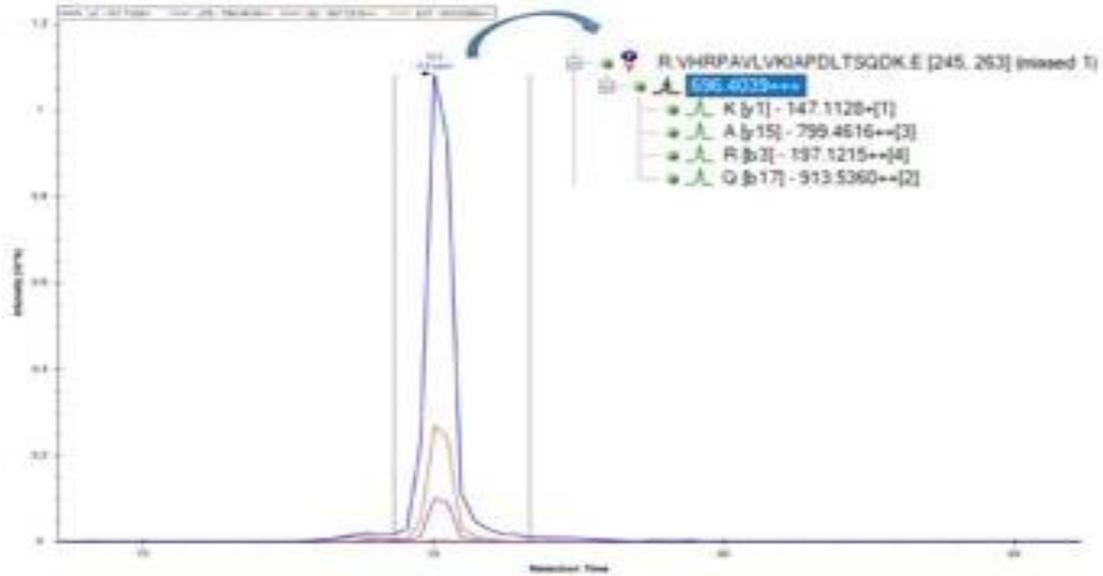


(Secuencia de aminoácidos del 245-253)

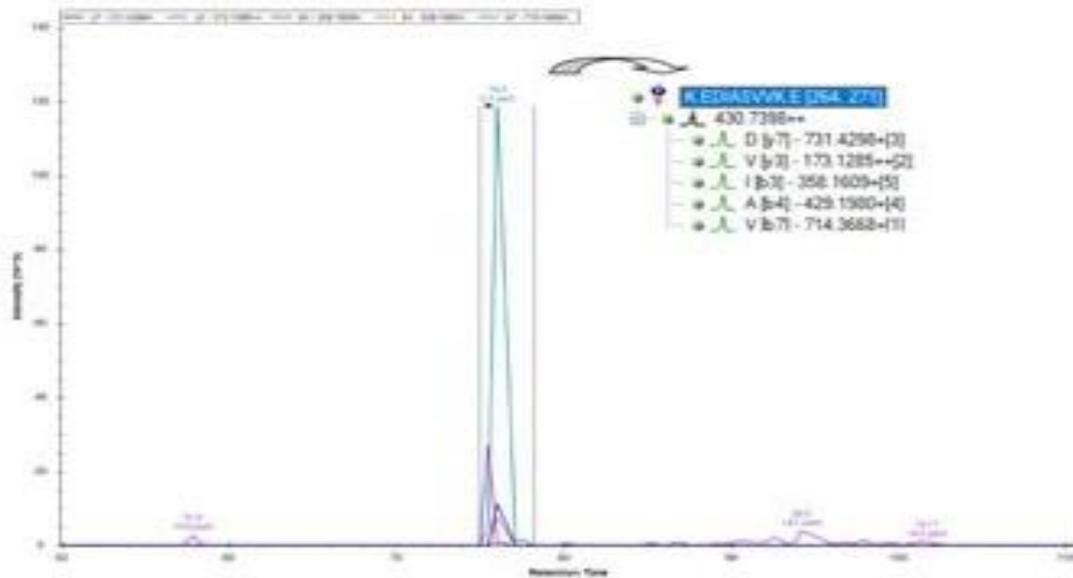


Perfil cromatográfico para los péptidos VHRPAVLVKIAPDLTSQDK y EDIASVVK de la proteína DHODH (PYRD\_HUMAN) en corteza entorrinal.

**VHRPAVLVKIAPDLTSQDK** (Secuencia de aminoácidos del 255-273)



**EDIASVVK** (Secuencia de aminoácidos del 274-281)





## ANEXO III

Muestras de RNA de cerebro facilitadas por el Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL), Hospital Universitario de Bellvitge.

Hipocampo: Giro Dentado					
Grupo	Muestra	Edad	Sexo	PM	Diagnosis
Control	B004	52	M	03 h 00 min	Control
	B005	50	F	14 h 30 min	Control
	B006	50	M	17 h 15 min	Control
	B007	48	F	04 h 00 min	Control
	B008	54	F	06 h 45 min	Control
	B010	52	F	05 h 45 min	Control
	B011	57	M	05 h 20 min	Control
	B012	41	M	11 h 35 min	Control
	B017	51	F	04 h 00 min	Control
AD, Braak & Braak I/II	B028	58	M	08 h 00 min	AD-I/A
	B032	66	M	05 h 45 min	AD-II/0
	B039	55	F	09 h 30 min	AD-II/0
	B046	55	M	09 h 45 min	AD-II/0
	B059	78	M	12 h 00 min	AD-II/0
	B061	72	F	04 h 00 min	AD-II/0
	B086	68	F	04 h 30 min	AD-II/A
	B095	69	M	03 h 45 min	AD-II/A
	B077	80	M	04 h 20 min	AD-III/?
AD, Braak & Braak III/IV	B072	77	M	04 h 10 min	AD-III/0
	B100	82	F	03 h 05 min	AD-III/A
	B074	65	F	04 h 10 min	AD-III/B
	B079	90	F	04 h 00 min	AD-III/B
	B097	81	F	16 h 45 min	AD-III/B
	B099	79	F	03 h 40 min	AD-III/B
	B113	99	F	05 h 00 min	AD-IV/B
AD, Braak & Braak V/VI	B117	74	M	22 h 15 min	AD-V/C
	B118	86	F	09 h 00 min	AD-V/C
	B124	75	M	08 h 15 min	AD-VI/C
	B128	82	M	05 h 00 min	AD-VI/C

Hipocampo: CA1					
Grupo	Muestra	Edad	Sexo	PM	Diagnosis
Control	B003	40	M	05 h 10 min	Control
	B004	52	M	03 h 00 min	Control
	B006	50	M	17 h 15 min	Control
	B007	48	F	04 h 00 min	Control
	B008	54	F	06 h 45 min	Control
	B009	52	M	04 h 40 min	Control
	B010	52	F	05 h 45 min	Control
	B012	41	M	11 h 35 min	Control
	B013	60	F	11 h 30 min	Control
	B015	35	M	17 h 00 min	Control
	B016	59	M	08 h 30 min	Control
	B017	51	F	04 h 00 min	Control
	B019	54	M	08 h 45 min	Control
AD, Braak & Braak I/II	B032	66	M	05 h 45 min	AD-II/0
	B039	55	F	09 h 30 min	AD-II/0
	B046	55	M	09 h 45 min	AD-II/0
	B059	78	M	12 h 00 min	AD-II/0
	B027	71	M	05 h 15 min	AD-II/A
	B044	66	M	14 h 00 min	AD-II/A
	B045				
	B049	69	M	03 h 45 min	AD-II/A
AD, Braak & Braak III/IV	B076	80	M	04 h 20 min	AD-III/?
	B072	77	M	04 h 10 min	AD-III/0
	B083	79	F	03 h 35 min	AD-III/0
	B089	82	F	03 h 05 min	AD-III/A
	B074	65	F	04 h 10 min	AD-III/B
	B079	90	F	04 h 00 min	AD-III/B
	B094	76	F	03 h 50 min	AD-III/B
	B097	79	F	03 h 40 min	AD-III/B
	B099	99	F	05 h 00 min	AD-IV/B
	B105	89	M	03 h 20 min	AD-IV/B
AD, Braak & Braak V/VI	B112	89	F	08 h 50 min	AD-V/C
	B113	86	F	09 h 00 min	AD-V/C
	B115	92	M	07 h 45 min	AD-V/C
	B116	84	F	07 h 45 min	AD-VI/C
	B117	82	M	05 h 00 min	AD-VI/C
	B119				
	B124	75	M	08 h 15 min	AD-VI/C

Locus Cerúleo					
Grupo	Muestra	Edad	Sexo	PM	Diagnosis
Control	B002	44	M	06 h 40 min	Control
	B004	52	M	03 h 00 min	Control
	B006	50	M	17 h 15 min	Control
	B009	52	M	04 h 40 min	Control
	B010	52	F	05 h 45 min	Control
	B012	41	M	11 h 35 min	Control
	B013	60	F	11 h 30 min	Control
	B016	59	M	08 h 30 min	Control
	B017	51	F	04 h 00 min	Control
	B018	54	F	08 h 00 min	Control
AD, Braak & Braak I/II	B020	48	F	14 h 30 min	Control
	B023	57	F	5 h 00 min	AD-I/0
	B025	56	M	7 h 10 min	AD-I/0
	B035	64	M	04 h 35 min	AD-I/?
	B036	65	M	16 h 25 min	AD-I/0
	B037	58	M	10 h 45 min	AD-I/0
	B038	61	M	12 h 00 min	AD-I/0
	B041	63	M	3 h 50 min	AD-I/A
	B043	73	M	07 h 05 min	AD-I/0
	B047	56	F	08 h 00 min	AD-I/A
	B050	64	M	8 h 35 min	AD-I/0
	B051	67	M	14 h 40 min	AD-I/0
	B053	73	F	15 h 45 min	AD-I/0
	B055	70	M	02 h 00 min	AD-I/A
	B056	58	M	8 h 05 min	AD-I/0
	B057	61	M	04 h 30 min	AD-I/?
	B024	66	M	4 h 55 min	AD-II/A
	B042	75	M	7 h 30 min	AD-II/0
	B045	68	F	04 h 30 min	AD-II/A
	B048	57	M	04 h 30 min	AD-II/0
B052	86	M	5 h 35 min	AD-II/A	
B060	53	M	4 h 20 min	AD-II/0	
B062	60	M	02 h 35 min	AD-II/A	
AD, Braak & Braak III/IV	B069	78	F	06 h 00 min	AD-III/A
	B073	83	F	9 h 10 min	AD-III/0
	B076	64	M	6 h 00 min	AD-III/A
	B079	90	F	04 h 00 min	AD-III/B
	B082	82	M	12 h 30 min	AD-III/B
	B081	79	F	5h 45 min	AD-III/B
	B084	77	M	13 h 45 min	AD-III/C
	B085	73	M	04 h 15 min	AD-III/0
	B087	68	F	4 h 45 min	AD-III/A
	B101	75	M	03 h 25 min	AD-III/B
	B102	76	M	06 h 00 min	AD-III/B
	B064	81	F	12 h 00 min	AD-IV/C
	B066	74	M	04 h 45 min	AD-IV/B
	B098	79	M	18 h 00 min	AD-IV/A
	B105	89	M	03 h 20 min	AD-IV/B
B107	77	M	19 h 00 min	AD-IV/A	

Corteza Entorrinal					
Grupo	Muestra	Edad	Sexo	PM	Diagnosis
Control	B001	66	F	4 h 15 min	Control
	B002	44	M	06 h 40 min	Control
	B006	50	M	17 h 15 min	Control
	B007	48	F	04 h 00 min	Control
	B009	52	M	04 h 40 min	Control
	B010	52	F	05 h 45 min	Control
	B011	57	M	05 h 20 min	Control
	B014	47	M	10 h 25 min	Control
	B017	51	F	04 h 00 min	Control
B019	54	M	08 h 45 min	Control	
AD, Braak & Braak I/II	B021	77	F	3 h 15 min	AD II/0
	B022	79	M	4 h 15 min	AD II/0
	B026	83	M	4 h 30 min	AD II/0
	B029	86	F	4 h 15 min	AD II/A
	B030	79	F	3 h 35 min	AD I/0
	B031	85	M	3 h 45 min	AD II/A
	B033	77	M	2 h 55 min	AD II/0
	B034	79	F	6 h 25 min	AD I/A
	B040	66	M	9 h 45 min	AD I/A
	B046	55	M	09 h 45 min	AD II/0
	B048	57	M	04 h 30 min	AD II/0
	B054	80	M	3 h 30 min	AD II/B
	B063	83	M	18 h 00 min	AD III/A
AD, Braak & Braak III/IV	B065	77	F	11 h 30 min	AD III/A
	B068	81	M	4 h 00 min	AD III/0
	B071	82	M	3 h 45 min	AD III/A
	B075	69	M	13 h 10 min	AD III/0
	B077	80	M	4 h 20 min	AD III/0
	B078	67	F	6 h 10 min	AD III/C
	B079	90	F	4 h 00 min	AD III/B
	B083	79	F	3 h 35 min	AD III/0
	B093	77	M	5 h 40 min	AD III/A
	B096	82	F	04 h 50 min	AD III/A
	B100	82	F	03 h 05 min	AD III/A
B101	75	M	3 h 25 min	AD-III/B	
B104	79	M	4 h 15 min	AD IV/B	
AD, Braak & Braak V/VI	B108	85	F	18 h 15 min	AD V/C
	B109	93	M	3 h 00 min	AD V/C
	B110	82	M	03 h 45 min	AD V/C
	B111	67	F	08 h 00 min	AD VI/C
	B115	92	M	7 h 45 min	AD-V/C
	B117	82	M	5 h 00 min	AD-VI/C
	B120	87	F	5 h 15 min	AD V/C
	B121	93	F	6 h 00 min	AD V-VI/?
	B122	80	M	6 h 30 min	AD V-VI/?
	B123	84	M	5 h 00 min	AD V-VI/?
	B124	85	F	5 h 45 min	AD-VI/C
	B125	61	M	8 h 15 min	AD V-VI/?
	B126	63	M	8 h 00 min	AD V-VI/?
	B127	75	M	6 h 40 min	AD V-VI/?
	B129	85	F	5 h 00 min	AD V-VI/?



