



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desarrollo de modelos celulares para estudios terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer

Patricia Molina Martínez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesis Doctoral

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA

Desarrollo de modelos celulares
para estudios terapéuticos en la
enfermedad de Alzheimer

Patricia Molina Martínez

2015

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Desarrollo de modelos celulares para estudios terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer

Memoria presentada por Patricia Molina Martínez para optar al título de doctor por la
Universitat de Barcelona

DIRECTORES:

Albert Lladó Plarrumani
Codirector

Coral Sanfeliu Pujol
Codirector y Tutor

AUTOR:

Patricia Molina Martínez

BARCELONA, 2015

El proyecto de tesis de **Patricia Molina Martínez**:

Desarrollo de modelos celulares para estudios terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer,

ha sido realizado en el **Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB), CSIC,**

dirigido por:

Dr. Albert Lladó

Investigador de la Unidad de Alzheimer y otros Trastornos Cognitivos,
Hospital Clínico de Barcelona
IDIBAPS

Dra. Coral Sanfeliu

Investigadora del IIBB-CSIC
IDIBAPS

FINANCIACIÓN

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos SAF2009-13093-C02-02, CSD2010-00045 y SAF2012-39852-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

PUBLICACIONES

Los resultados de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

In vitro caloric restriction induces protective genes and functional rejuvenation in senescent SAMP8 astrocytes.

García-Matas S*, Paul RK*, **Molina-Martínez P***, Palacios H, Gutierrez VM, Corpas R, Pallàs M, Cristòfol R, de Cabo R, Sanfeliu C.

Aging Cell. 2015;14(3):334-44.

Rcor2 underexpression in senescent mice: a target for inflammaging?

Alvarez-López MJ, **Molina-Martínez P**, Castro-Freire M, Cosín-Tomás M, Cristòfol R, Párrizas M, Escorihuela RM, Pallàs M, Sanfeliu C, Kaliman P.

J Neuroinflammation. 2014;11:126.

En preparación:

In vitro functional characterization of Presenilin-1 mutations K239N and E120G.

Sarroca S*, **Molina-Martínez P***, Aresté C, Etzrodt M, García de Frutos P, Gasa R, Antonell A, Molinuevo JL, Sánchez-Valle R, Saura CA, Lladó A, Sanfeliu C.

Neuroinflammaging impairs the mechanisms of response against an acute inflammatory injury: a lipopolysaccharide study in the mouse model of neurodegeneration SAMP8.

Molina-Martínez P*, Corpas R*, Kaliman P, Cosín-Tomás M, Cristòfol R, Solà C, Pallàs M, Molinuevo JL, Lladó A, Sanfeliu C.

[*igual contribución]

INTRODUCCIÓN

1.- Enfermedad de Alzheimer

El aumento de la esperanza de vida en el siglo XX ha originado que muchos individuos lleguen a edades donde es más frecuente la aparición de los síntomas de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (EA).

1.1.- Antecedentes históricos

En 1907, Alois Alzheimer describió el caso de una mujer de 51 años quien presentaba delirio, pérdida de memoria rápida y progresiva, acompañada de alucinaciones, trastornos de conducta, desorientación, y afecciones del lenguaje, fallecida en 1906 después de 5 años de evolución (Alzheimer, 1907).

Gran variedad de condiciones neurológicas y progresivas eran conocidas para la época, pero la edad temprana de aparición de la sintomatología así como el hallazgo a nivel cerebral de los ovillos neurofibrilares y las placas seniles, hicieron de esta condición única.

Emil Kraepelin, psiquiatra compañero de Alzheimer, fue quien identificó los síntomas de la enfermedad mientras que Alzheimer describió las características neuropatológicas por primera vez.

A pesar de ser un esfuerzo conjunto, Kraepelin decidió nombrar la enfermedad con el apellido de su compañero, dada la gran importancia que implicaba encontrar la base neuropatológica de los desórdenes psiquiátricos.

1.2.-Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer

La EA es la causa de demencia neurodegenerativa más frecuente en países desarrollados y su prevalencia incrementa con la edad (Berrios, 1990). De forma arbitraria la EA se clasifica de inicio precoz si los síntomas aparecen antes de los 65

años o de inicio tardío si lo hacen a edades superiores. Aproximadamente un 10% de los casos diagnosticados de EA se inician antes de los 65 años (Alves et al., 2012), y aproximadamente el 90% de los pacientes con EA inicia los síntomas después de los 65 años (Bertram & Tanzi, 2004).

Al parecer, la edad o el envejecimiento es el principal factor de riesgo para padecer la EA.

1.2.1- Prevalencia e incidencia

Un estudio reportó que para el año 2005, 24.2 millones de personas a nivel mundial tenían demencia y al menos 4.6 millones de nuevos casos son reportados al año (Tabla 1). (Ferri et al., 2010). Aproximadamente el 70% de estos casos fueron atribuidos a la EA. Entre poblaciones regionales de individuos con edades ≥ 60 años, los norteamericanos y europeos del oeste presentan los mayores índices de prevalencia de demencia (6,4% y 12,1%, respectivamente), seguidos por los latinoamericanos (4.9%) y asiáticos de China y Pacífico oeste (4.0%). Mientras que la tasa regional de incidencia anual fueron estimadas en 10.5 por cada 1000 individuos para los norteamericanos, 24,6 para los Europeos, 9.2 para latinoamericanos, y 8.0 para China y el pacífico occidental (Reitz et al., 2011).

La prevalencia de la enfermedad aumenta con la edad, así se considera que se dobla cada 5 años y puede superar el 30-40 % en individuos con más de 80 años (Alves et al., 2012).

1.3 Definición y diagnóstico

La etiología de la EA no es bien conocida, siendo probablemente una enfermedad de causa multifactorial, donde existiría un desequilibrio crónico entre la producción y la eliminación del péptido β -amiloide y su acumulación iniciaría una compleja cascada que finalizaría con la muerte neuronal.

Región	Prevalencia de demencia \geq 60 años (%)	Incidencia anual (x1000 ind.)	N \geq 60 años para el 2001 (millones)	Estimación de N desde 2001-2040 (%)
Oeste de Europa	5,4	8,8	4,9	102
Este de Europa	7,7	15,8	2,8	253
Norte América	6,4	10,5	3,4	172
Latinoamérica	4,6	9,2	1,8	393
África del norte y centro	3,6	7,6	1,0	385
Resto de África	1,6	3,5	0,5	235
Pacífico occidental en desarrollo	4,3	7,0	1,5	189
China y Pacífico occidental	4,0	8,0	6,0	336
Indonesia, Tailandia y Sri Lanka	2,7	5,9	0,6	325
India y Asia del Sur	1,9	4,3	11,8	314

Tabla 1: Prevalencia e incidencia de Demencia según la distribución geográfica. N: Número de personas con demencia

A nivel clínico la EA se caracteriza por un deterioro cognitivo de inicio insidioso y progresivo, que inicialmente causa un deterioro cognitivo leve y finalmente conduce a una demencia, fase en que se ven afectadas las actividades de la vida diaria (AVD), si bien hoy en día sabemos que sus alteraciones fisiopatológicas se inician muchos antes del inicio de la clínica. Su presentación clínica típica se caracteriza por una pérdida de la memoria episódica reciente y progresiva, apareciendo posteriormente otras alteraciones en otros dominios cognitivos (lenguaje, praxias, gnosias o función ejecutiva) que conllevan dificultades de orientación, expresión, comprensión, lectura, escritura, problemas para vestirse o manejar dinero, así como la utilización de objetos cotidianos. Todo ello repercute progresivamente en las actividades de la vida diaria, afectándose primero actividades más complejas, posteriormente actividades instrumentales (manejo de objetos, dinero, tareas domésticas) y básicas (higiene, alimentación o control de esfínteres) y finalmente el paciente acaba evolucionando a un estado vegetativo y suele fallecer por una enfermedad intercurrente. (Fortea et al., 2011).

Otras formas de presentación más infrecuentes o no-amnésicas de la EA son la afasia logopéica (Gorno-Tempini et al., 2011) (alteración del lenguaje), la presentación visuoespacial o posterior (alteraciones visuoespaciales, agnosia de objetos, dificultad para el reconocimiento de caras, simultagnosia y alexia (Benson et al., 1988) y presentación anterior con predominio de las alteraciones conductuales o de la función ejecutiva (Taylor et al., 2008). Los criterios diagnósticos clínicos de la EA utilizados hasta recientemente fueron los establecidos en 1984 (McKhann et al., 1984) Recientemente se ha propuesto una revisión de estos criterios así como una nueva propuesta con el objetivo de permitir un diagnóstico más precoz y más preciso, incluyendo además de la clínica diferentes biomarcadores de la enfermedad (Albert et al., 2011; Dubois et al., 2007, 2010; McKhann et al., 2011; Sperling et al., 2011).

1.4.- Epidemiología genética

1.4.1.- Alzheimer monogénica

Hasta la actualidad se han implicado tres genes cuyas mutaciones son las causantes de la EA monogénica, caracterizada principalmente por un inicio precoz y un patrón hereditario autosómico dominante con una penetrancia prácticamente completa a los 65 años. Estos 3 genes son el gen de la APP, el gen de la presenilina 1 (*PSEN1*) y el gen de la presenilina 2 (*PSEN2*). (Campion et al., 1999).

Estos genes codifican para proteínas involucradas en el clivaje del APP y en la generación del péptido A β . Mutaciones asociadas a la EA en estos 3 genes pueden ser considerados como marcadores biológicos para el diagnóstico de la EA.

1.4.1.1.- Mutaciones en la proteína precursora amiloide APP

El péptido A β , principal componente de las placas seniles, deriva de la proteína precursora del amiloide (APP) codificada por el gen APP. El gen *APP*

está localizado en el cromosoma 21 (21q11-22) (Lemere et al., 1996). La función normal de la *APP* es desconocida pero se sabe que está involucrada en muchas funciones fisiológicas de las neuronas. Actualmente es conocido que mutaciones en *APP* generan un clivaje incorrecto de la misma conllevando a la formación y aumento en la agregación del péptido A β (Cruts & Van Broeckhoven, 1998).

Las mutaciones de *APP* son la segunda causa de EA monogénica después de las mutaciones en *PSEN1*, pero representan una causa muy infrecuente de la enfermedad (<1% del global). Hasta la actualidad se han descrito más de 32 mutaciones en *APP* en 85 familias y la mayoría de estas están localizadas en los sitios de clivaje de las secretasas, en el dominio transmembrana. (Kasuga et al., 2009)

Así como mutaciones puntuales pueden generar cambios neuropatológicos una copia extra de *APP* es suficiente para causarlos también. Así, duplicaciones de pequeños segmentos de cromosoma 21 que no causan Síndrome de Down pero que contienen una copia adicional de *APP* son suficientes para causar EA (Rovelet-Lecrux et al., 2006; Sleegers et al., 2006).

1.4.1.2.-Mutaciones en los genes de la Presenilina 1 y Presenilina 2

Hasta el momento 185 mutaciones asociadas a 405 familias han sido identificadas en el gen de la *PSEN1* conllevando que las mutaciones en este gen sean la causa más frecuente de la EA de inicio precoz con patrón de herencia autosómico dominante, estimándose responsables del 70% de los casos. Además 13 mutaciones asociadas a 22 familias han sido detectadas en el gen de la *PSEN2*. La mayoría de estas mutaciones conllevan sustitución de un nucleótido puntual, aunque también se han reportado pero en menor frecuencia, deleciones e inserciones (Li et al., 2008).

La *PSEN1* y *PSEN2* son proteínas multiméricas y componentes esenciales

del complejo γ -secretasa que degrada un número importante de proteínas entre ellas la APP.

El fenotipo clínico de los pacientes con mutaciones en *PSEN1* es similar al observado en la EA esporádica con una edad de inicio mucho más precoz (media de 44 años) y una penetrancia prácticamente completa a los 65 años (Sánchez-Valle et al., 2007).

Estudios en cerebro humano, líquido cefalorraquídeo y plasma, así como en animales transgénicos y sistemas celulares que modelan mutaciones FAD, han demostrado que en mutaciones causantes de EA el ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ es considerablemente más alto (Kumar-Singh et al., 2006), parámetro que podría ser utilizado como herramienta de diagnóstico. Muchas investigaciones han sugerido que las mutaciones en *PSEN1*, pueden causar además del aumento de $A\beta_{42}$, pérdida de la función de la *PSEN1*; y otros estudios sugieren que la supresión en la expresión de la *PSEN1* aumentan el riesgo de EA (Theuns, 2003) y neurodegeneración (Saura et al., 2004).

Tres mutaciones puntuales en el gen de la *PSEN1* han sido recientemente reportadas por los investigadores de la Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Hospital Clínico de Barcelona. Interesantemente, una de ellas (K239N) presenta una penetrancia incompleta a la edad de 65 años (Lladó et al., 2010), mientras que las otras dos (p.L286P y p.E120G) presentan una edad de inicio temprana de la patología (Sánchez-Valle et al., 2007). Estas mutaciones serán objeto del presente estudio como se describirá más adelante.

En el caso de la mutación K239N se debe resaltar que un miembro de la familia presenta características clínicas indistinguibles de la EA de inicio tardío, si bien existe una clara historia familiar de EA con patrón autosómico dominante de inicio presenil. Esto sugiere la necesidad de ejecutar pruebas de detección de mutaciones en pacientes que clínicamente se asocian con EA de inicio tardío si

presentan historia familiar de EA con patrón autosómico dominante de inicio presenil (Lladó et al., 2010).

Aunque algunas características fenotípicas asociadas a las mutaciones en *PSEN1* son comunes, con frecuencia algunas peculiaridades clínicas y biológicas son observadas en cada mutación. Desde el punto de vista clínico, la detección de una mutación patogénica de *PSEN1* en un paciente, confirma el diagnóstico *in vivo* de EA y ofrece la posibilidad de asesoramiento genético a sujetos asintomáticos en riesgo (Sánchez-Valle et al., 2007).

Como se describirá en el apartado de objetivos estas mutaciones se emplearán para diseñar un nuevo modelo experimental celular para el estudio de la EA.

Para resumir, estos tres genes están fisiológicamente relacionados con vías patológicas comunes, asociadas a la hipótesis amiloidea, donde la EA es originada como consecuencia de un desbalance entre la producción y depuración del péptido A β . Sugiriendo que la presencia de mutaciones en estos genes pueden ser considerados como marcadores biológicos de EA.

La información relacionada a todas las mutaciones asociados a los tres genes previamente mencionados (tanto para APP como para PSEN1 y PSEN2) se encuentra disponible en la base de datos referida (www.molgen.ua.ac.be/ADMutations).

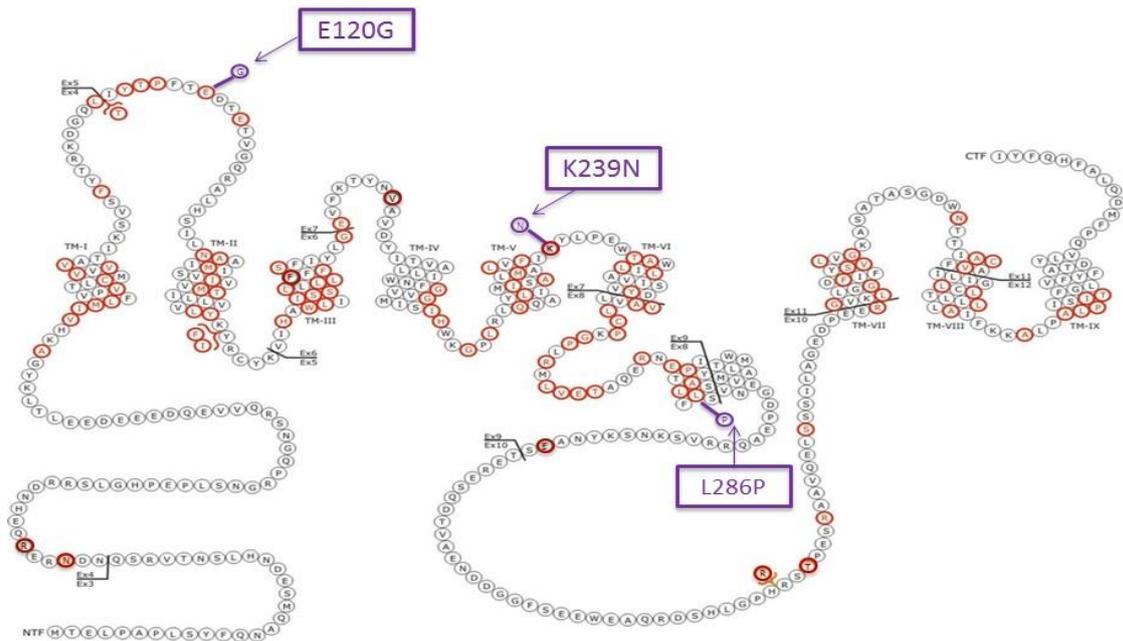


Figura 1: Estructura de la PSEN1 en la que se marcan en rojo las mutaciones reportadas hasta el momento, incluyendo las tres evaluadas en este estudio, cuya sustitución de aminoácido se marca en lila en cada caso. Imagen modificada de <http://www.molgen.ua.ac.be/>

1.4.2.- Enfermedad de Alzheimer poligénica

La EA de inicio tardío es probablemente poligénica dado que en ella probablemente estén implicados diferentes genes de susceptibilidad, o modificadores de la enfermedad, con importantes interacciones entre ellos y con los factores ambientales. Múltiples estudios han demostrado que el principal factor de riesgo genético para la EA de inicio tardío es el alelo $\epsilon 4$ del gen *APOE*. Por otro lado estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han sugerido que otros genes también estarían implicados en el riesgo de desarrollar EA, si bien su efecto genético sería modesto (Bertram & Tanzi, 2004).

1.5.- Neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer

Dos son las lesiones neuropatológicas principales que caracterizan a la EA, las placas seniles y los ovillos neurofibrilares. Adicionalmente se caracteriza por la pérdida de la actividad neuronal y función sináptica, disfunción mitocondrial y elevados niveles de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación cerebral.

1.5.1.- Placas seniles

Las placas seniles fueron descritas por Alzheimer por primera vez como “*miliary foci*” (Figura 2). Estas, son lesiones extracelulares esféricas de 10–200 μm de diámetro formadas por depósitos de péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$) que fueron originalmente identificadas empleando la técnica de “Bielschowsky de plata” (Berrios, 1999). La asociación entre la presencia de las placas y la demencia no fue un hallazgo novedoso ya que había sido descrita previamente, más la presencia de los ovillos neurofibrilares conjuntamente con la edad de la paciente justificaron la nueva entidad nosológica (Roth et al., 1967).

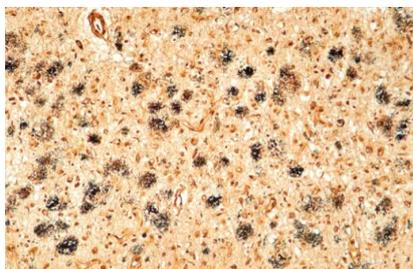


Figura 2: Imagen histológica de los “*miliary foci*” descritos por Alzheimer, originalmente identificados empleando la técnica de “Bielschowsky de plata” (Berrios, 1999).

Las placas seniles son clasificadas con fines prácticos en difusas y neuríticas. Las primeras representan las lesiones más tempranas de la EA e incluso se ha propuesto, más no probado, que estas formaciones difusas podrían progresar a formas más compactas (neuríticas), características de los estadios más avanzados de la enfermedad (Mann et al., 1992).

Las placas seniles clásicas o neuríticas, son una forma mucho más compacta, las cuales se caracterizan por ser lesiones extracelulares esféricas con un diámetro entre 10–50 μm , con un promedio de 30 μm aproximadamente, a diferencia de las placas difusas que tienden a tener un diámetro menor a 20 μm (Pro et al., 1980).

El cuerpo central de las placas neuríticas está constituido principalmente por filamentos $\text{A}\beta$ de 6–10 nm distribuidos radialmente desde el centro. El péptido $\text{A}\beta$ y su precursor, la proteína precursora amiloide (APP), así como acúmulos de p-tau constituyen la región periférica de las placas seniles (Selkoe et al., 1988).

Son múltiples las hipótesis que tratan de explicar y describir la patogénesis de las placas seniles. Una de ellas explica que la formación de las placas seniles ocurre previamente a la deposición del péptido A β (Hardy & Selkoe, 2002). Sin embargo, el hecho de hallar fibrillas de péptido A β en todas las placas seniles, junto con la observación del mismo péptido en ciertas áreas de la materia blanca, hacen de este postulado poco probable si se sigue una evolución cronológica en dicha formación. Por esta razón se considera que la deposición del péptido A β podría ser el primer evento que ocurre para la formación de las placas seniles (Glenner, 1979).

Este péptido A β , formado por 39-42 aminoácidos, es la forma fragmentada derivada de la APP, una glicoproteína transmembrana con una región extracelular de gran tamaño, un dominio transmembrana único y una región citoplasmática pequeña (Wenk, 2003).

1.5.1.1.- Producción del péptido β -amiloide

Existen dos vías para llevar a cabo el clivaje secuencial de la proteína APP; una predominante que es la vía no-amiloidogénica, y una minoritaria que es la vía amiloidogénica, que forma como producto final el péptido A β .

La vía no amiloidogénica se caracteriza por una proteólisis de la proteína APP mediante la enzima α -secretasa. El lugar de acción de la enzima está localizado en la mitad de la secuencia de la A β , por lo tanto no existe posibilidad de formación del péptido. Los productos obtenidos son fragmentos solubles denominados sAPP α y un fragmento C-terminal asociado a la membrana (C83) que es hidrolizado por la γ -secretasa dando como resultado el fragmento p3 (Selkoe, 1996).

La vía amiloidogénica se caracteriza por la proteólisis de la APP por el extremo N-terminal y C-terminal de la secuencia del A β , por la β -secretasa (BACE) y la γ -secretasa, respectivamente; el fragmento C-terminal asociado a la membrana

en este procesamiento es más largo (C99) conteniendo el péptido A β . Varias mutaciones de la APP se concentran en las regiones de corte de las secretasas, favoreciendo la generación de péptido A β y su agregación posterior (Figura 3).

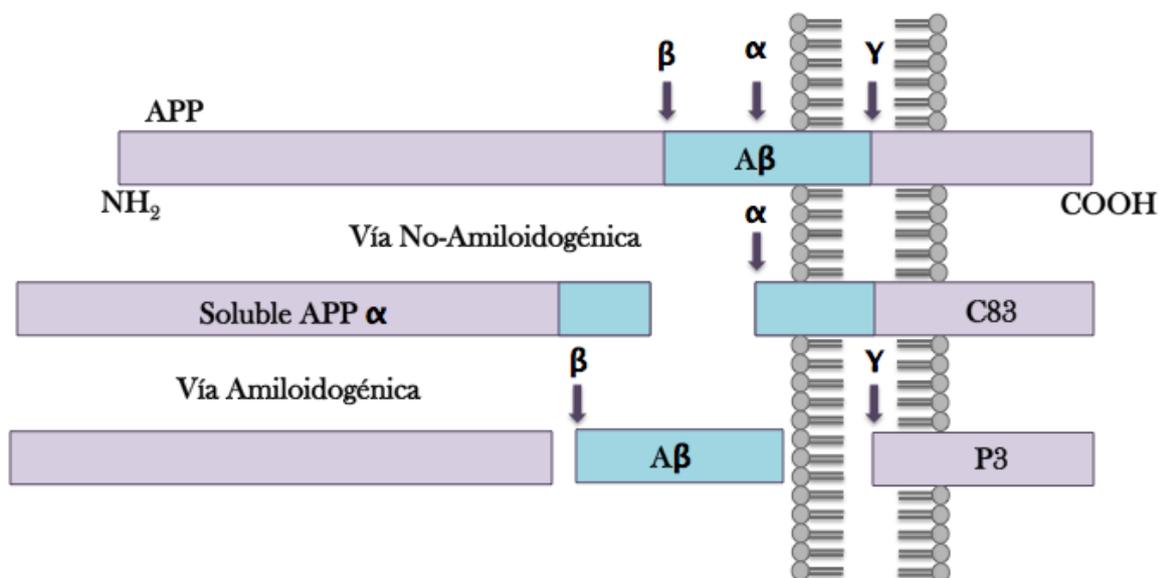


Figura 3: Clivaje secuencial de la APP, en el que se evidencian las dos posibles vías. La No-Amiloidogénica en la que se forman sAPP α y C83 asociado a la membrana, y la vía Amiloidogénica que favorece la formación del péptido A β .

La proteólisis por γ -secretasa es heterogénea, la principal especie de A β producida es un residuo peptídico de 40 aminoácidos (A β 40), mientras que en mucha menor proporción se forma una variante de 42 aminoácidos (A β 42) que es mucho más sensible a acumularse y formar placas cerebrales. Se ha demostrado que muchas mutaciones asociadas a EA aumentan la formación de A β 42 (Behl, 1997).

Además del péptido A β , en las placas seniles encontramos otras moléculas derivadas de la APP que participa en la patogenicidad del Alzheimer. Entre éstas, destacan los fragmentos C-terminales de la APP, producidos por la β -secretasa. Dependiendo de su longitud, estos fragmentos pueden contener la secuencia A β entera, considerándolos, por lo tanto, amiloidogénicos (Behl, 1997).

1.5.2.- Ovillos Neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares (*“neurofibrillary tangles”*, NFT) se encuentran localizados principalmente en las neuronas piramidales del neocortex cerebral (Braak & Braak, 1991). Morfológicamente están formados principalmente por filamentos helicoidales pareados de proteína Tau.

Es importante conocer la morfología de los NFT, ya que todos estos componentes, y en especial la proteína Tau confieren la estabilidad estructural de las neuronas y sirven de soporte en el transporte axonal. Esta proteína contiene un gran número de serinas y treoninas muchas de las cuales están fosforiladas en condiciones fisiológicas normales. Bajo condiciones patológicas comienzan a hiperfosforilarse, aumentando el número de sitios fisiológicos activos.

La hiperfosforilación de tau hace que disminuya la eficiencia en la formación de los microtúbulos; aumentando la cantidad de Tau soluble y la disgregación de los microtúbulos, generando adicionalmente, que la proteína Tau sea más resistente a la degradación proteolítica y se agregue para formar los NFT. Esto como consecuencia disminuye la neurotransmisión y el axón pierde su morfología, lo que conduce a que la neurona se degenere (Pro et al., 1980).

En condiciones normales, la proteína Tau se regula bien para garantizar un transporte normal a lo largo de los microtúbulos en los axones y las dendritas. Debido a los procesos anormales ocurre una disminución en el transporte de las vesículas sinápticas, las mitocondrias y las proteínas, lo cual altera las funciones dependientes de energía, que desencadenarán procesos de degeneración neuronal y eventualmente pueden llevar a la muerte neuronal. Estos procesos pueden contribuir a la activación de la microglía y astrogía (Podtelezchnikov et al., 2011).

1.6.- Tratamiento clínico

Aunque la base bioquímica exacta de la EA no se entiende bien, y no existe ninguna cura, se sabe que las deficiencias del sistema colinérgico del cerebro y de otros neurotransmisores están presentes. Los medicamentos que incrementan la actividad colinérgica mediante la inhibición de la acetilcolinesterasa producen un beneficio cognitivo y conductual modesto pero útil en algunos individuos afectados. El primero de estos fármacos fue la tacrina, sin embargo debido a su hepatotoxicidad se ha restringido su uso. Los inhibidores de la acetilcolinesterasa usados en la actualidad son: donepezilo, rivastigmina, y galantamina (Seltzer, 2014).

La memantina, un antagonista del receptor NMDA, ha demostrado también un beneficio clínico en el tratamiento de la EA.

2.- Alzheimer y Envejecimiento celular

Durante el envejecimiento normal el cerebro sufre muchos cambios resultantes en un declive cognitivo gradual que está asociado con alteraciones de la funcionalidad neuronal pero sin pérdida neuronal significativa, proliferación glial en la corteza, y disminución de peso bruto del cerebro de 2-3 % por década (Drachman, 2006).

A nivel molecular, los mecanismos implicados en el envejecimiento cerebral aún no se entienden, pero probablemente incluyen daños en el ADN mitocondrial (Lu et al., 2004) y el estrés oxidativo crónico (Lin & Beal, 2006).

La edad es el principal factor de riesgo de EA, sin embargo, difiere claramente del envejecimiento normal ya que en la EA ocurre una pérdida dramática de las sinapsis, de las neuronas y de la actividad cerebral en regiones anatómicas específicas, resultando en atrofia cerebral masiva y gliosis (Herrup, 2010).

2.1.- Disfunción mitocondrial

Se hipotetiza que la disfunción mitocondrial es la principal fuente de radicales libres y de especies reactivas al oxígeno (ROS), que desencadenan el estrés oxidativo. Las mitocondrias son una fuente potencial importante de radicales libres y precursores oxidativos, entre otros O_2 y H_2O_2 , respectivamente, ya que su producción está vinculada al metabolismo energético. Diversos estudios han encontrado aumentos en el ADN mitocondrial en el soma celular de las neuronas susceptibles a la EA, lo cual en sí mismo, podría ser causa de un mayor potencial oxidativo. (Gella & Durany, 2009).

Se ha postulado que el estrés oxidativo es un evento primario en el desarrollo de la EA y puede ser debido a la presencia de mitocondrias disfuncionales que potenciarían la generación de ROS (LaFerla et al., 2007). Las mitocondrias generan energía celular mediante la oxidación/reducción secuencial generada por los electrones liberados de la glicolisis y del ciclo de Krebs. Los electrones fluyen a través de complejos mitocondriales I a IV de la cadena de transporte de electrones. El aceptor final es el oxígeno que se reduce a agua y la energía generada impulsa la fosforilación de ADP en ATP por el complejo mitocondrial V (o ATP-sintetasa) (Figura 4).

A pesar que el transporte de los electrones a través de la cadena transportadora de electrones es un proceso muy eficiente, pueden producirse ciertos niveles de ROS. Sin embargo, mitocondrias disfuncionales generan altos niveles de ROS que pueden ser tóxicos para las células con una larga vida útil y un nivel bajo de defensas antioxidantes, como lo son las neuronas (Henriksen & Endresen, 1994).

Además, las mitocondrias son al mismo tiempo un objetivo de ROS provocando la oxidación de componentes mitocondriales como el ADNmt, lípidos, y proteínas que conllevan a un aun mayor deterioro mitocondrial (García-Escudero

et al., 2013).

La disfunción mitocondrial es una de las características más prominentes de la EA. Experimentos en animales transgénicos han demostrado que desregulaciones del complejo I están relacionados con la formación de proteína Tau (Melov et al., 2007) mientras que la desregulación del complejo IV ha estado relacionado a la formación de péptido A β (Lin & Beal, 2006) (Figura 4).

Adicionalmente, alteraciones de varias enzimas que participan en el ciclo del ácido tri-carboxílico tales como piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa han sido reportados en EA (Figura 4).

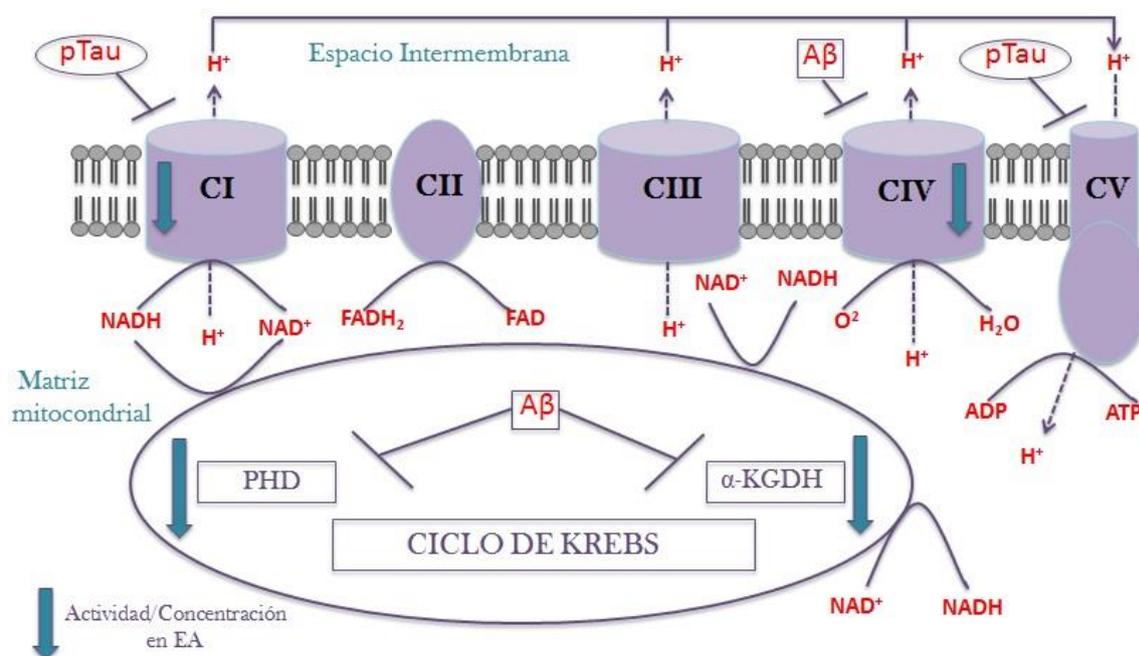


Figura 4: Diagrama en donde se evidencian que desregulaciones en los complejos CI, CIV y CV pueden ser consecuencia de la acumulación de pTau (Melov et al., 2007) y de péptido A β (Lin & Beal, 2006). Estas desregulaciones generan disminución de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (PHD) y α -cetoglutarato deshidrogenasa (KGDH) que también está fomentada por la acumulación de A β

Por otro lado, los productos de la acción tóxica de ROS, como 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE), o la presencia de quinonas como coenzima Qo pueden facilitar el auto-ensamblaje de la proteína Tau en polímeros fibrilares similares a los

filamentos helicoidales pareados presentes en el cerebro de pacientes con EA. Estos hallazgos sugieren otro posible vínculo entre el estrés oxidativo, la disfunción neuronal, y la EA (Pérez et al., 2009).

2.2.- Estrés Oxidativo

Hay evidencias que el tejido cerebral de pacientes con EA está expuesto a estrés oxidativo durante el curso de la enfermedad. Dado que el estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio en la producción de ROS y la defensa antioxidante, se considera que tiene un papel clave e importante en el proceso de neurodegeneración relacionada con la edad y el deterioro cognitivo. (Gsell et al., 1996; Sayre et al., 2008). Por ejemplo, se ha observado que en el cerebro de pacientes con EA, los ROS inducen la afluencia de calcio a través de los receptores de glutamato y desencadenan una respuesta citotóxica que conduce a la muerte celular (Sultana & Butterfield, 2011).

Evidencia de estrés oxidativo en la EA se manifiesta a través de altos niveles de proteínas oxidadas, productos finales de oxidación de glúcidos, y de la peroxidación de lípidos, la formación de especies tóxicas, tales como peróxidos, alcoholes, aldehídos, carbonilos libres, cetonas y modificaciones oxidativas en el ADN tanto nuclear como mitocondrial (Schipling et al., 2000).

Deterioros de la memoria relacionados con la edad se correlacionan con una disminución de los mecanismos de defensa antioxidante en el cerebro. Un aspecto importante del sistema de defensa antioxidante es la reducción de glutatión, que es responsable en gran medida del potencial redox endógeno en la célula. La función más importante del glutatión es donar electrones para reducir los ROS (Perrig et al., 1997). El glutatión oxidado se regenera mediante la glutatión peroxidasa (GPX). La disminución de glutatión reducido conduce a una situación en la que la tasa de producción de ROS excede la capacidad antioxidante, situación que favorece el estrés oxidativo (Mittler, 2002).

2.2.1.- Oxidación proteica

La oxidación mediada por ROS de proteínas con cadenas laterales ha sido muy estudiada y consiste en la introducción de grupos hidroxilo o de grupos carbonilos. Los grupos carbonilo son introducidos en las proteínas mediante la oxidación de aminoácido de la cadena lateral en derivados de hidroxilos, cetonas o aldehídos (Stadtman, 2006). Una variedad de vías oxidativas conducen a la carbonilación de proteínas, entre ellas oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treonina, la escisión de enlaces peptídicos por la vía de α -amidación o por la oxidación de los residuos de glutamilo (Dalle-Donne et al., 2003).

Los ROS también pueden reaccionar con otras moléculas, tales como lípidos (oxidación lipídica), ADN (oxidación de ADN) y azúcares (glicosilación o también llamado glicación), lo que resulta en la generación de derivados de aldehídos y carbonilos reactivos, que pueden a su vez reaccionar con las proteínas y forman los carbonilos unidos a proteínas. La medición de la carbonilación de proteínas se cree que es una buena estimación de la magnitud del daño oxidativo de proteínas asociadas a diversas condiciones de estrés oxidativo, envejecimiento, trastornos fisiológicos y EA (Dalle-Donne et al., 2003).

2.2.2.- Oxidación lipídica

Los lípidos son modificados por ROS y hay una fuerte correlación entre los peróxidos de lípidos, enzimas antioxidantes, placas amiloides y ovillos neurofibrilares en la EA. Varios productos de degradación en casos de estrés oxidativo, incluyendo HNE, acroleína, malondialdehído e isoprostanos se han observado en los cerebros de pacientes con EA (Niki et al., 2005).

HNE es capaz de modificar las proteínas, lo que a su vez desencadena múltiples efectos, incluyendo la inhibición de los transportadores neuronales de

glucosa y glutamato, la inhibición de la bomba Na⁺-K⁺, la activación de las quinasas y desregulación de la señalización del calcio intracelular, que en última instancia induce una cascada que genera la apoptosis celular (Butterfield et al., 2010).

Siguen apareciendo pruebas de que HNE es el principal producto citotóxico de la peroxidación lipídica para las neuronas e impide la función de las proteínas de membrana, incluyendo el transportador de glucosa neuronal GLUT 3, indicando que HNE es un marcador característico y una toxina que conduce a la neurodegeneración en EA (Uchida, 1999).

2.2.3.- Oxidación de los ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son vulnerables a los daños de estrés oxidativo y su oxidación se encuentra aumentada en el tejido cerebral en la EA. (Gabbita et al., 1998). La oxidación de ADN y ARN está marcado por el aumento de los niveles de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) y 8-hidroxiguanosina (8OHD) (Poulsen et al., 2012), los cuales han sido hallados en las placas de A β y los ovillos neurofibrilares (Nunomura et al., 1999).

Los niveles elevados de hebras rotas de ADN que se han encontrado en la EA, originalmente se pensaba que eran consecuencia de los procesos apoptóticos. Sin embargo, ahora se acepta ampliamente que el daño oxidativo es el responsable, lo cual es consistente además, con el aumento de carbonilos libres en los núcleos de las neuronas y la glía en la EA (Kong & Lin, 2010).

2.2.4.- Glicosilación en la enfermedad de Alzheimer

Productos finales de glicosilación avanzada (AGE), que se forman por una reacción no enzimática de azúcares con depósitos de proteínas de larga vida, también son potentes neurotoxinas y moléculas proinflamatorias (Smith et al., 2000).

La glicosilación de proteínas se inicia como un proceso no enzimático con la condensación espontánea de grupos de azúcares con cetonas o aldehídos con un grupo de aminoácido libre de proteínas, para formar una base de Schiff lábil, consistente con la reacción clásica descrita por Maillard en 1912, una cascada de reacciones resultan a partir de entonces en la formación de los AGE, que se componen de agregados de proteínas heterogéneas irreversiblemente reticuladas (Munch et al., 1997).

Hay evidencia creciente de que la insolubilidad de las placas de A β es causada por una amplia proteína covalente reticulada. Un mecanismo por el cual las proteínas de larga duración pueden ser reticuladas implica los AGE. La acumulación extracelular AGE ha sido demostrada en las placas seniles en diferentes áreas corticales (Srikanth et al., 2011).

Estudios de inmunohistoquímica demuestran que los AGE se co-localizan en alto grado con ApoE. (Harrington & Colaco, 1994). La acumulación de AGE extracelular en la EA es causada por una oxidación acelerada de proteínas glicosiladas (glucosilación). Las proteínas que se encuentran en los ovillos neurofibrilares, y los cuerpos de Lewy, también son reticuladas y glicosiladas lo cual puede explicar su insolubilidad en detergentes y la resistencia a las proteasas (Srikanth et al., 2011).

El componente principal de las NFT, la proteína Tau asociada a microtúbulos se ha demostrado que está sujeto a la formación de AGE intracelular. Los ROS están implicados en los procesos de glicosilación y claramente pueden fomentar la reticulación de depósitos de A β y formación de placas amiloides (Wong et al., 2001).

En la Figura 5 puede verse un diagrama resumen sobre algunas de las fuentes principales de ROS que se generan por disfunción mitocondrial al desregular la cadena transportadora de electrones, induciéndose un estado de estrés

oxidativo.

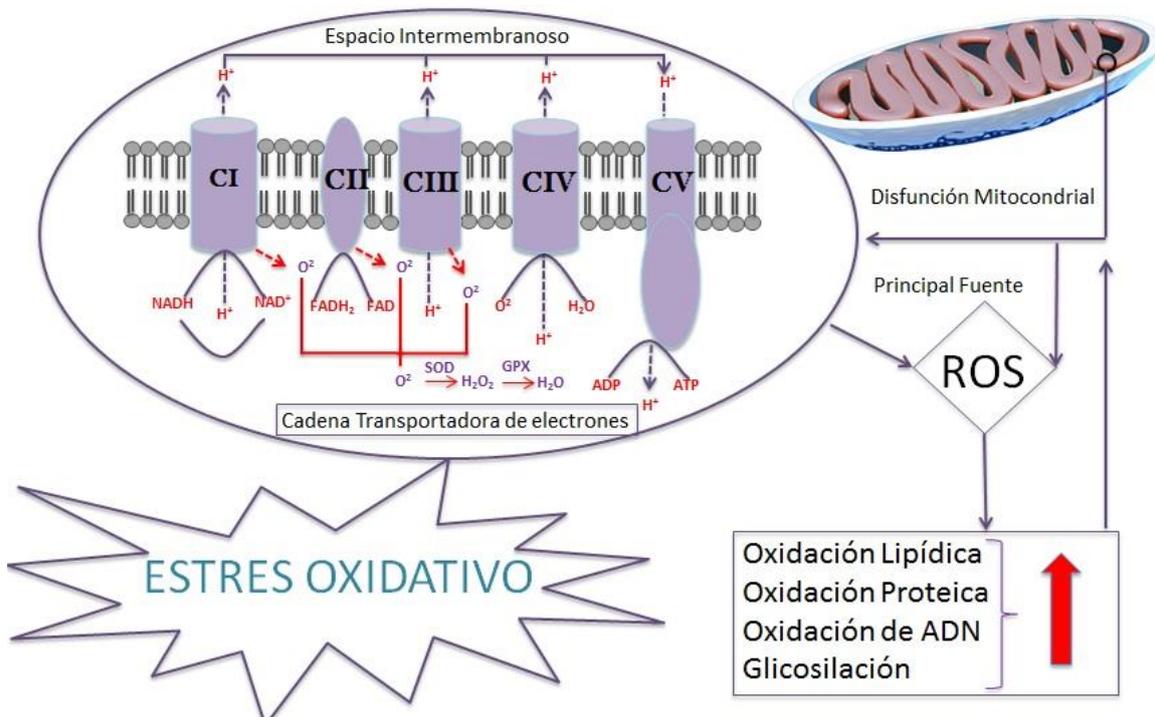


Figura 5: Las mitocondrias de manera natural producen radicales libres superóxido y peróxido, una mitocondria sana reduce dichos radicales mediante la acción de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX). Cuando hay disfunción mitocondrial esta reducción ocurre de forma ineficiente generando la producción de ROS (especies reactivas al oxígeno) las cuales inducen e incrementan la oxidación de lípidos proteínas, glúcidos y ácidos nucleicos, los cuales a su vez generan aun mayor disfunción mitocondrial. Todo este círculo vicioso es la principal causa del estrés oxidativo

2.3.- Inflamación

Actualmente se acepta que la inflamación crónica es una condición importante subyacente de muchas enfermedades relacionadas con la edad, tales como arteriosclerosis, artritis, cáncer, la diabetes, la osteoporosis, demencia, las enfermedades vasculares, la obesidad y el síndrome metabólico (Yu & Chung, 2006). Sin embargo, la participación de la inflamación en el proceso de envejecimiento no se había considerado seriamente hasta el 2006 cuando Chung et al., propusieron la hipótesis del envejecimiento por la inflamación molecular, lo que sugiere que un estado de inflamación crónica de bajo grado es un posible

proceso de convergencia que une el envejecimiento normal y la patogénesis de las enfermedades relacionadas con la edad (Yu & Chung, 2006).

La hipótesis de la inflamación molecular proporciona una visión molecular de las interacciones entre los cambios fisiológicos relacionados con la edad y la patogénesis de muchas enfermedades relacionadas con la edad durante el envejecimiento (Chung et al., 2001; Chung et al., 2009).

La premisa de la hipótesis inflamatoria relacionada con la edad se basa en dos constataciones establecidas: 1) una desregulación del sistema inmune con la edad, y 2) el estado redox alterado durante el envejecimiento. Ambos procesos conducen a aumentos en un estado inflamatorio sistémico debido a la activación de una amplia variedad de mediadores de la inflamación a través de un desequilibrio inducido por el estrés oxidativo. El desequilibrio redox relacionado con la edad es probablemente causado por el efecto neto de los sistemas de defensa antioxidantes debilitados, y aumento de la producción de ROS, tales como el superóxido (O_2^-), el radical peróxido (H_2O_2), e hidroxilo (OH), óxido nítrico reactivo (NO), el peroxinitrito (ONOO-) y aldehídos reactivos de lípidos (Chung et al., 2001).

El punto de la hipótesis de la inflamación molecular sobresaliente es que la inflamación crónica sin resolver durante el envejecimiento puede actuar como el enlace fisiopatológicos que impulsa cambios funcionales normales para convertirse en muchas de las enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (Chung et al., 2002).

El mantenimiento de un estado de equilibrio redox preciso es tan importante como el sistema de tampón ácido-base fisiológica del cuerpo para la operación óptima de actividades celulares homeostáticos. Cambios en el equilibrio redox se sabe que tienen un gran impacto en las vías de señalización celular y las actividades de la transcripción como la mayoría de sus reacciones y activación dependerá de los procesos de reducción/oxidación.

Numerosa bibliografía indica que los procesos inflamatorios están relacionados con el desarrollo de la EA. Varios marcadores pro-inflamatorios en suero se han encontrado que tienen relación con la demencia y el deterioro cognitivo.

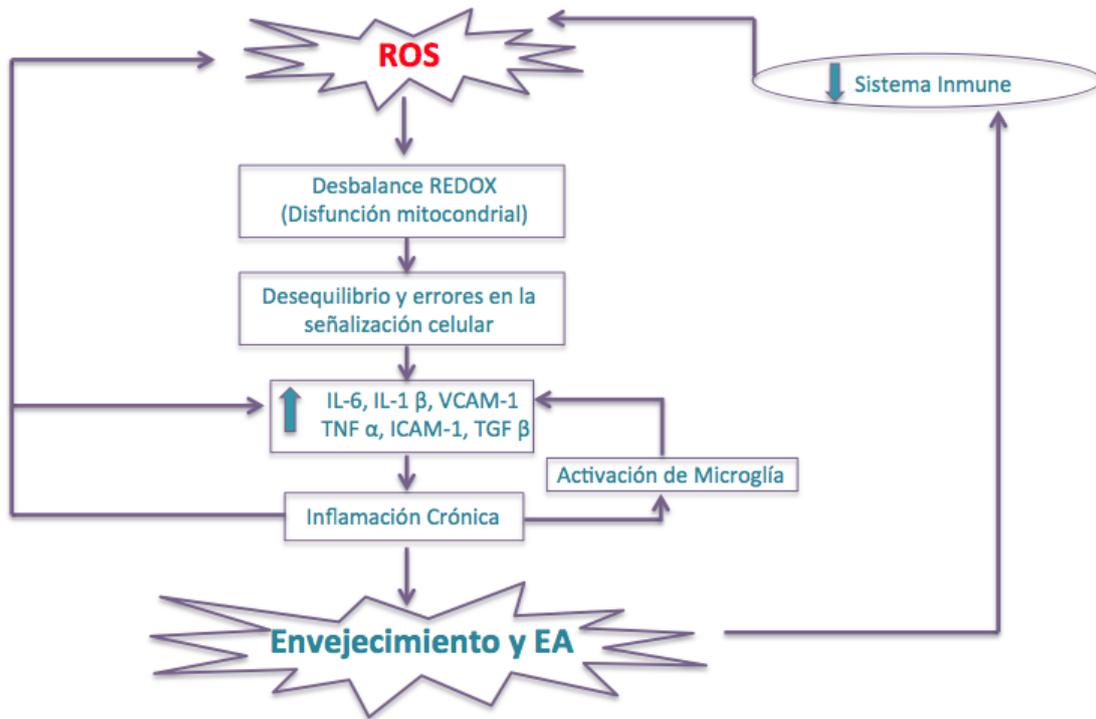


Figura 6: Relación entre los procesos inflamatorios y la producción de ROS asociadas a la aceleración del envejecimiento y EA

Algunas hipótesis incluso relacionan a las respuestas inflamatorias como moduladores de los procesos patogénicos asociados con la EA (Selkoe, 2006). Investigaciones *in vivo* e *in vitro* sobre las propiedades de la microglía han relacionado a la activación de la misma como un estado inflamatorio primario y a la invasión leucocitaria como un fenómeno secundario. Estas investigaciones también sugieren que la inflamación contribuye significativamente a la patogénesis de la EA (McGeer & McGeer, 1995).

Investigaciones en clínicas de Honolulu (Schmidt et al., 2002) y de Rotterdam (Engelhart et al., 2004), han demostrado un mayor riesgo para la EA se relaciona con niveles elevados de Proteína C Reactiva, así como con los niveles elevados de antitripsina α_1 (ACT), interleucina (IL)-6, molécula de adhesión

intercelular (ICAM)-1 y molécula de adhesión vascular (VCAM)-1 solubles.

Tanto en humanos como en modelos de ratones transgénicos de la EA, varios marcadores de inflamación aumentan con la aparición de la patología de la EA, incluidos los miembros de la vía del complemento; citoquinas y quimioquinas, como la IL-1 β , IL-6, factor de necrosis tumoral (TNF)- α y factor de crecimiento transformante (TGF)- β , astrocitos reactivos y microglía activada (Wyss-Coray, 2006).

3.- Tratamientos experimentales en modelos animales

Existe un buen número de nuevos tratamientos en estudio que han demostrado efectos neuroprotectores en modelos animales de EA pero sin efectos probados aún en la enfermedad humana (Wollen, 2010). La investigación en este campo es muy activa. Entre tratamientos y métodos de diagnóstico, se han registrado más de un millar de estudios clínicos en 2014 (www.clinicaltrials.gov).

En la presente tesis doctoral se ha usado un tratamiento experimental de restricción calórica. Este tratamiento no es directamente aplicable en clínica, pero permite el estudio de mecanismos neuroprotectores, la identificación de moléculas diana y el desarrollo eventual de terapias neuroprotectoras.

3.1.- Restricción Calórica

A lo largo de los años se ha evidenciado que uno de los principales factores de riesgo para la aparición de algunas de las enfermedades crónicas más prevalentes, son el consumo de dietas ricas en calorías vacías y pobres en nutrientes (por ejemplo, vitaminas, fitoquímicos), la inactividad física y el tabaquismo. En contraste con los efectos perjudiciales de una dieta hipercalórica, una reducción de la ingesta calórica sin desnutrición (definido como restricción calórica, CR), tiene una amplia gama de beneficios.

La CR moderada puede prevenir o revertir los efectos nocivos de la diabetes tipo 2, sobrepeso/obesidad, la hipertensión, la inflamación crónica y otras enfermedades metabólicas asociadas a la edad. Los estudios sobre roedores, monos y estudios preliminares en seres humanos han demostrado que la CR aún más fuerte tiene beneficios adicionales (Pasinetti et al., 2011).

La CR sigue siendo la intervención experimental más robusta no genética, y nutricional para evaluar la extensión de la vida en muchas especies, incluyendo levaduras, moscas de la fruta, nemátodos, peces, ratas, ratones, y perros (Weindruch, et al., 1986), aunque no ha aumentado la longevidad en monos (Mattison et al., 2012). Estos autores concluyeron que la CR extiende el periodo de vida de salud hasta la supervivencia máxima posible.

Los roedores proporcionan un modelo animal muy valioso y flexible para determinar la capacidad de CR para extender al máximo la vida útil y la expectativa de vida en un sistema de mamíferos. En roedores, una reducción del 30 al 60% en la ingesta de calorías, ha demostrado generar un aumento proporcional del 30 al 60% en la vida máxima en distintos estudios ya realizados (Masoro, 1993).

Además, los datos de los estudios con roedores de laboratorio encontraron que la CR, además de aumentar la expectativa de vida como se ha comentado, también previene o retrasa la aparición de enfermedades neurodegenerativas, ya que disminuye la deposición de A β en el cerebro y mejora la neurogénesis en modelos animales de EA, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, y accidente cerebrovascular (Mattson, 2005).

Por otro lado también se ha demostrado la acción antioxidante de la CR por su capacidad para mantener el equilibrio redox y suprimir la activación de diversos factores de transcripción proinflamatorios. Atenúa significativamente el factor nuclear-kappa B (NF-kB), factores de necrosis tumoral (TNF- α y TNF- β), interleuquinas (IL-1 β , IL-2, e IL-6), quimioquinas (IL-8) y moléculas de adhesión

(AMS) (Chung et al., 2011).

En este estudio se evalúa el suero de CR como posible sustancia neuroprotectora en el modelo de senescencia acelerada SAMP8 cuya eficiencia será descrita más adelante.

4.- Modelos experimentales *in vitro*

Las neuronas son las células cerebrales que se ven más afectadas en la EA siendo una de las principales características de esta patología la extensa pérdida neuronal, razón por la cual durante muchos años la definición clásica de neurodegeneración se limitó a la determinación de la pérdida neuronal selectiva y de astrogliosis como respuesta a la muerte neuronal. Este concepto se ha ampliado para incluir la pérdida sináptica y la neuroinflamación.

El deterioro de la memoria en pacientes con EA se relaciona con la pérdida sináptica en la corteza cerebral y el sistema límbico. La pérdida de sinapsis en EA es mayor que la extensión de la pérdida neuronal en la corteza cerebral (Overk & Masliah, 2014).

Esto sugiere que el daño sináptico precede a la pérdida de cuerpos celulares neuronales. Los mecanismos de la pérdida sináptica en EA podrían implicar defectos de transporte axonal, estrés oxidativo, el daño mitocondrial ya explicado, y la neuroinflamación entre otros. El aumento de los niveles de A β 42 también se sospecha que está involucrado en el daño sináptico en EA (Krstic & Knuesel, 2013).

La mayor parte de los conocimientos actuales en relación a la toxicidad de los oligómeros de A β deriva de los estudios que determinan los efectos de la aplicación externa de oligómeros sintéticos en cultivos de neuronas. Sin embargo también se han realizado estudios en cultivos de células gliales, principalmente

astrocitos.

La participación de los astrocitos en las funciones cerebrales en general y en concreto en la transmisión sináptica cada vez se considera más relevante, estando aceptados los conceptos de sinapsis tripartita (Araque et al.,1999; Perea et al 2009) y de redes neurona-glia (Perea et al., 2014). Además, astrocitos y microglía actúan en concierto en los procesos inflamatorios cerebrales.

En esta tesis se han abordado modelos celulares de astrocitos y de microglía.

4.1.- Astrocitos

Los astrocitos son el principal tipo de células gliales en el cerebro y participan en el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central, en la regulación de la funcionalidad neuronal y también responden con prontitud a las lesiones y regulan eventos neuroinflamatorios (Freeman, 2010).

El posible deterioro funcional con el envejecimiento o la liberación excesiva de citoquinas proinflamatorias en procesos neurodegenerativos, puede conducir a cambios neuropatológicos y a la muerte neuronal en enfermedades del SNC tales como la esclerosis múltiple, Parkinson, y EA. Por lo tanto, los astrocitos pueden considerarse una diana para la prevención de la neuroinflamación crónica y la neurodegeneración (Pertusa et al., 2007).

4.1.1.- Morfología básica

Desde finales del siglo XIX, los astrocitos se han dividido en dos subtipos principales, protoplásmicos o fibrosos, sobre la base de las diferencias en sus morfologías celulares y localizaciones anatómicas. Estas dos categorías principales conservan su validez y utilidad de hoy (Doyle, 1978).

Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran a través de toda la materia gris y exhiben una morfología de varias ramas con muchas ramificaciones que dan lugar a muchos procesos, presentan una distribución globoide uniforme (Fig.8). Los astrocitos fibrosos se encuentran por toda la sustancia blanca y exhiben una morfología de muchas fibras largas con muy pocas ramificaciones aunque se les relaciona con funciones similares a los protoplasmáticos. Estudios neuroanatómicos clásicos y modernos también indican que ambos subtipos de astrocitos hacen amplios contactos con los vasos sanguíneos (Fig. 7). (Peters, 2007).

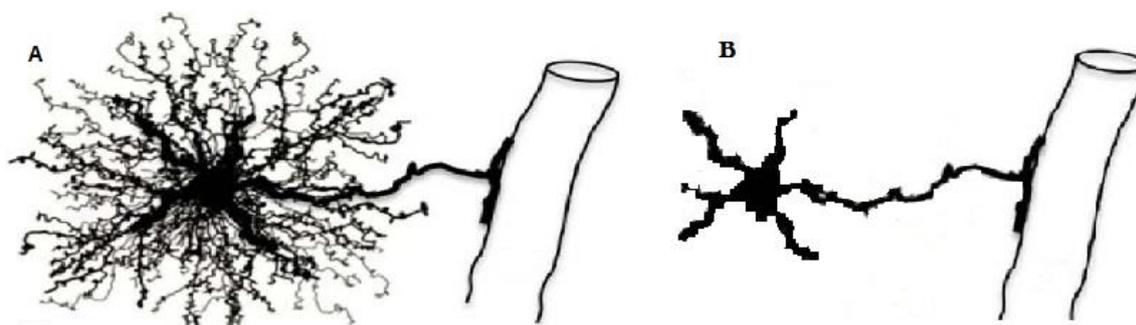


Figura 7: Ilustración de los dos tipos de categorías principales de astrocitos: A.- Protoplasmáticos y B.- Fibrosos. Imagen modificada de (Peters, 2007)

Análisis con microscopio electrónico a mediados del siglo XX revelaron que los procesos de los astrocitos protoplasmáticos involucran la sinapsis y que los procesos de los astrocitos fibrosos contactan con los nodos de Ranvier, y que ambos tipos de astrocitos forman uniones comunicantes entre los procesos distales de los astrocitos vecinos (Gray, 1971).

4.1.2.-Marcadores proteómicos

Las técnicas inmunohistoquímicas que permiten la detección de marcadores moleculares específicos a nivel de una sola célula son herramientas esenciales para identificar y caracterizar las células en el tejido sano y patológico. La expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) se ha convertido en un marcador prototípico para la identificación inmunohistoquímica de astrocitos (Wu et al., 2005), y ha sido empleada en este estudio como principal marcador de los astrocitos.

Sin embargo, es importante reconocer los usos y las limitaciones correspondientes de GFAP como un marcador de astrocitos. GFAP fue aislado por primera vez como una proteína altamente concentrada en viejas placas desmielinizadas de pacientes con esclerosis múltiple y luego se encontró asociado inmunohistoquímicamente con astrocitos reactivos en dichas placas y en otros contextos patológicos (Eng, 1985). En línea con este modo de identificación, la expresión de GFAP puede ser considerada como un marcador sensible y fiable que etiqueta a la mayoría, si no todos, los astrocitos reactivos que están respondiendo a las lesiones del sistema nervioso central. Sin embargo el GFAP no es un marcador absoluto de los astrocitos no reactivos y con frecuencia no se expresa en niveles detectables en el SNC saludable. Así, GFAP sería un excelente y muy fiable marcador de astrocitos reactivos.

Otros marcadores moleculares que se han utilizado para la identificación inmunohistoquímica de astrocitos normales y reactivos incluyen glutamina sintetasa y S100b (Donato, 2001; Gonçalves et al., 2008; Mrak & Griffin, 2001).

4.1.3.- Funciones

Hasta hace muy poco, se creía que los astrocitos tenían principalmente dos funciones, por una parte brindar apoyo estructural en el tejido neural y por otro generar la astrogliosis reactiva en el tejido lesionado.

La noción de que las disfunciones de los astrocitos o astrocitos reactivos pueden contribuir a la presentación de signos clínicos o de mecanismos que conducen a cambios patológicos en el tejido del SNC en general, no se consideró. Sin embargo, este punto de vista está cambiando gradualmente como resultado del mayor interés y estudio de la biología y la patología de los astrocitos.

Durante los últimos 25 años se ha hecho evidente que los astrocitos participan en una amplia variedad de funciones complejas y esenciales en el SNC

sano, incluidas las funciones primarias de la transmisión sináptica y el procesamiento de la información en el circuito neural (Perea et al., 2009). Las funciones y los mecanismos de astrogliosis reactiva y la formación de la cicatriz glial está siendo gradualmente dilucidado (Verkhratsky et al., 2010).

Los astrocitos son células gliales especializadas que superan el número de neuronas por más de cinco veces. Los astrocitos responden a todas las lesiones del SNC a través de un proceso conocido como astrogliosis reactiva, que se ha convertido en una característica patológica de las lesiones estructurales del SNC. Se ha avanzado considerablemente en la determinación de las funciones y mecanismos de la astrogliosis reactiva y en la identificación de las funciones de los astrocitos en los trastornos y patologías del sistema nervioso central (Sofroniew & Vinters, 2010).

Ahora está claro que la astrogliosis reactiva no es fenómeno simple de todo o nada, sino un continuo proceso finamente involucrado y retroalimentado de los cambios que se producen en el SNC regulados por los acontecimientos de señalización específicas. Estos cambios van desde alteraciones reversibles en la expresión genética y la hipertrofia de las células con la preservación de dominios celulares y estructurales de los tejidos, a la formación de cicatrices de larga duración con la reordenación de la estructura del tejido (Sofroniew & Vinters, 2010).

Muchos experimentos apuntan hacia el papel primario y contributivo en los trastornos del SNC a través de la pérdida de las funciones de los astrocitos normales o aumento de los efectos anormales potenciados por la astrogliosis reactiva. Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han documentado la capacidad de los astrocitos para producir una variedad de citoquinas, incluyendo IL-1, IL-6, IL-10, interferón (IFN) y quimioquinas (Blasko et al., 2010).

4.1.4. Astrocitos y Enfermedad de Alzheimer

Por otra parte la astrogliosis reactiva es una característica bien conocida de la

EA, pero su papel aún no se comprende bien. La astrogliosis reactiva tiende a ser focalizada de tal manera que los astrocitos reactivos están íntimamente asociados con las placas amiloides o depósitos difusos de amiloide. Adicionalmente los astrocitos reactivos pueden contener cantidades sustanciales de diferentes formas de A β , incluyendo A β 42. (Salminen et al., 2011).

La intensidad de la astrogliosis reactiva, tal como se determina por los niveles de GFAP, aumenta en paralelo con el incremento de la progresión de etapas tardías en la EA, mientras que concomitantemente los niveles de transportadores de glutamato de astrocitos disminuyen, lo que puede aumentar la vulnerabilidad de las neuronas locales a la excitotoxicidad. (Hol et al., 2003).

Astrocitos reactivos también presentan una mayor expresión de la presenilina en EA esporádica, pero no se conocen las consecuencias de esta expresión.

4.2.- Microglía

La microglía fue descrita por primera vez en 1919 por el español neuroanatomista Pio del Río Hortega, discípulo del renombrado Santiago Ramón y Cajal, casi medio siglo más tarde de las neuronas y los astrocitos y justo antes de los oligodendrocitos (Rezaie & Male, 2002).

Tradicionalmente, la microglía fue considerada simplemente como "macrófagos cerebrales" que controlaban la respuesta inflamatoria en lesiones agudas y las condiciones neurodegenerativas, y sólo recientemente se reveló su origen único (Ginhoux et al., 2013).

La primera sugerencia de una relación entre la microglía y la EA vino de Glenner, en 1979 que postuló que el péptido amiloide era producido por estas células. La idea fue abandonada en gran medida cuando se aclaró el origen

neuronal del A β , aunque estudios ocasionales han regresado a esta idea (Graeber & Streit, 2010).

La microglía constituye alrededor del 10% de las células en el sistema nervioso. Ellos representan la primera línea de defensa contra los patógenos invasores u otro tipo de lesión en el tejido cerebral. En situaciones patológicas, tales como enfermedades neurodegenerativas, accidente cerebrovascular, lesión traumática, y la invasión tumoral, estas células se activan, y migran al área dañada para ejecutar un proceso fagocítico. Esta acción es similar a la realizada por los macrófagos activos fagocíticos del sistema inmune periférico (Forabosco et al., 2013).

En algunas situaciones, el papel de la microglía se ha encontrado que es beneficioso, ya que la microglía activada puede reducir la acumulación de A β mediante el aumento de su fagocitosis, el aclaramiento, y la degradación de la misma (Damani et al., 2011).

La microglía también puede secretar un número de factores solubles, tales como el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), que son potencialmente beneficiosos para la supervivencia de las neuronas (Marques et al., 2013).

4.2.1. Morfología básica

Los cambios morfológicos que se producen en la microglía durante diferentes estados de activación fueron los primeros indicios de la participación de estas células en enfermedades del SNC. La microglía con sus muchas ramificaciones delgadas se ha convertido en reconocible como la topografía de estas células en el cerebro sano (Kettenmann et al., 2011). Las grandes células ameboides halladas en los alrededores de la lesión fueron fácilmente reconocibles durante más de un siglo como macrófagos fagocíticos, se trata de la microglía activada.

En general, la transformación morfológica de la microglía se caracteriza por una retracción inicial y ligeras ramificaciones. A partir de ahí, las células pueden adquirir una morfología específica según el tipo de lesión (Jørgensen et al., 1993).

En la Figura 8 puede verse la morfología típica y diferente de la microglía activada, en una imagen que será explicada con mayor profundidad más adelante, en la que se muestra un cultivo de microglía marcado con lectina de tomate en células de ratón SAMR1 (control) y SAMP8 (modelo de envejecimiento).

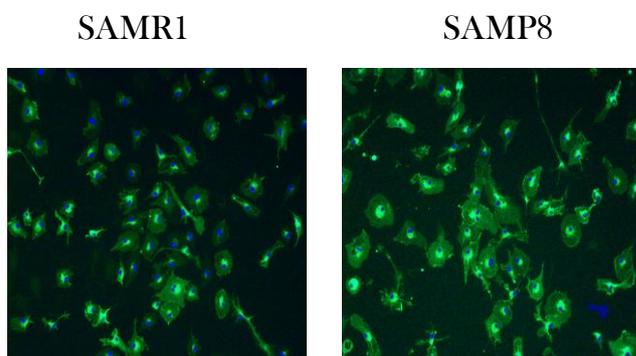


Figura 8: cultivo de microglía activada marcado con lectina de tomate en células de ratón SAMR1 (control) y SAMP8 (modelo de envejecimiento).

4.2.2. Funciones

La primera evidencia de que la microglía puede tener un función inmunológica (en lugar de fagocítica) fue la demostración en 1989 por Griffin y sus colegas que la microglía expresa una potente citoquina inmunomoduladora, la IL-1. Este reporte, junto con el hallazgo de que la IL-1 regula la síntesis de la APP (Goldgaber et al., 1989), inmediatamente sugirió que la microglía y sus citoquinas podrían desempeñar un papel en el impulso del desarrollo de la placa, en lugar de relacionarlo directamente con la producción del péptido.

En los siguientes años, se añadieron citoquinas adicionales a la lista de las proteínas que se elevan en el cerebro con Alzheimer. Estos incluyen la IL-6, la TGF- β 1), IFN- α , IL-2 e IL-33 (Ekdahl et al., 2009).

También es conocido que la microglía tiene un papel importante en la

defensa del huésped y la reparación de tejidos en el SNC. Finalmente, se ha descrito la participación de la microglía en la remodelación de circuitos neuronales mediante la eliminación de sinapsis dependiendo de la actividad (Fields et al., 2013)

4.2.3. Microglía y Enfermedad de Alzheimer

Las ideas sobre el papel de la microglía en la EA han seguido evolucionando. Investigaciones neuropatológicas han sugerido tanto el papel potencial de los mecanismos inflamatorios en la formación de placas de A β y la progresión en la EA, como los roles potenciales de la activación microglial en daño neurítico asociado como daño neuronal y muerte neuronal (Teismann & Schulz, 2004).

La microglía activada es componente casi universal de las placas de A β en el cerebro de pacientes con EA. En la EA, la microglía se acumula junto con ADN fragmentado, presumiblemente procedente de la fragmentación de neuronas dañadas. Tal acumulación, junto con la acción de citoquinas, es un potente estímulo de activación microglial.

La activación microglial se ha demostrado que se correlaciona con la progresión clínica a la etapa de demencia, estado neuropatológico, y con la etapa de progresión de las placas de A β individuales (Hoozemans et al., 2006).

5.- Modelos de ratón de envejecimiento cerebral y Alzheimer

Diversas cepas de ratón se han desarrollado para su uso como modelos experimentales en el estudio de la EA. Se trata principalmente de ratones modificados que llevan genes de EA familiar. Destacamos además el ratón conocido como “*senescence accelerated prone mouse, strain 8*” (SAMP8), que siendo un modelo sin mutaciones en genes de EA y con fenotipo senescente se acerca a la EA esporádica. A continuación se describen brevemente los modelos

transgénicos más representativos y el modelo SAMP8 el cual se ha usado en el presente trabajo de tesis.

5.1.- Transgénicos con mutaciones de APP y Presenilinas

Games et al. reportaron al primer modelo transgénico de EA, denominados ratones PDAPP, que sobreexpresan un gen de APP humana que contenía la mutación Indiana (V717F) bajo el control promotor del factor B de crecimiento derivado de plaquetas. Los ratones desarrollaron placas seniles compuestas principalmente de A β 42 (Games et al., 1995).

Del mismo modo, Hsiao et al. sobreexpresaron en los ratones un transgén de APP humana que contiene la mutación sueca (K670N/M671L). Estos ratones, llamados Tg2576, han sido el modelo transgénico de EA más estudiado (Hsiao et al., 1996).

Posteriormente, muchas otras líneas transgénicas fueron desarrolladas con enfoques similares a los utilizados para desarrollar ratones PDAPP y Tg2576, típicamente para conducir la sobreexpresión de los transgenes de APP que contienen mutaciones únicas o múltiples de FAD. Por ejemplo, los ratones TgCRND8, que expresan múltiples mutaciones humanas de APP (Dudal et al., 2004).

También se han desarrollado modelos de ratones doblemente transgénicos que expresan la APP humana con la mutación sueca, bajo promotor factor B de crecimiento derivado de plaquetas, combinado con una mutación PS1 (M146L), denominados ratones APP/PS1 (Gordon et al., 2002).

Otros modelos incluyen ratones APP que expresan la APP humana bajo el promotor específico de neuronas Thy1. También los ratones transgénicos que expresan la APP humana con la mutación sueca, en combinación con las conocidas

como Holandesa (E22Q) y Iowa (D694N) bajo promotor Thy1.2, denominados ratones Tg-SwDI. Los ratones APPDutch expresan la APP humana con sólo la mutación Dutch regulada por el promotor Thy1. Estos investigadores también desarrollaron una línea transgénica que expresa la mutación APP holandesa humana cruzado con una mutación en PS1 (G384A), denominados ratones APPDutch/PS1 (Sturchler-Pierrat et al., 1997).

5.2.- Transgénicos con tauopatías

Las tauopatías son un grupo de enfermedades degenerativas caracterizadas histopatológicamente por la presencia de inclusiones filamentosas en neuronas (patología neurofibrilar) y ocasionalmente en la glía, compuestas por proteína tau hiperfosforilada y NFT. El descubrimiento de la mutación del gen tau en la demencia frontotemporal con parkinsonismo unido al cromosoma 17 facilitó el desarrollo de las tauopatías en ratones transgénicos (Lewis et al., 2000).

Ha habido un significativo progreso en el desarrollo de modelos de este grupo de enfermedades. En particular los ratones que expresan tau con la mutación P301L han demostrado que es posible generar modelos animales robustos para patologías neurofibrilares (Lewis et al., 2000).

Los ratones transgénicos que presentan lesiones con ovillos neurofibrilares y placas de péptido amiloide se han producido mediante la combinación de las mutaciones de FAD con formas mutantes de Tau. Cruzando ratones Tg2576 con una línea transgénica denominada JNPL3, que expresa la mutación para Tau de P301L, generaron un modelo transgénico bigénico que se conoce como ratones TAPP (Oddo et al., 2003).

5.3.- Modelo triple transgénico 3xTg-AD

Oddo et al. generaron también un modelo de ratón triple transgénico de la

EA, denominado 3xTg-AD, estos ratones expresan la mutación para Tau (P301L), dos mutaciones de transgenes exógenos en APP (K670N/M671L) y una mutación PS1 (M146V) (Oddo et al., 2003).

5.4.- Modelo de cinco mutaciones 5xFAD

También se han generaron ratones 5xFAD que expresan la APP humana con las mutaciones Sueca (K670N/M671L), Florida (I716V) y Londres (Val717Ile), junto con mutaciones en PS1 (M146L/L286V) (Oakley et al., 2006).

5.5.- Modelos de senescencia acelerada SAMP8

Adicionalmente a los ya mencionados y con principal importancia para este proyecto se explicará con mayor profundidad el modelo de senescencia acelerada SAMP8.

El ratón de senescencia acelerada (SAM) representa un grupo de cepas de ratones, obtenidas por selección fenotípica por Toshio Takeda y sus colegas en la Universidad de Kyoto, como un modelo para el estudio del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad (Takeda et al., 1997).

Progenitores de cepas SAM fueron generados como resultado de un cruzamiento accidental de ratones AKR/J y otra cepa de ratón albino desconocido (Sprott & Austad, 2006).

A partir de 1975, se seleccionaron cinco camadas de ratones que muestran un fenotipo de senescencia acelerada y corta vida para convertirse en los progenitores de las cepas propensas a senescencia (SAMP), mientras que tres camadas de ratones resistentes al envejecimiento acelerado fueron seleccionadas como progenitores de las cepas resistentes a la senescencia (SAMR). A partir de entonces, el apareamiento selectivo de hermanos se ha continuado durante más de

20 generaciones.

Desde 2002, cuatro SAMP endogámicos (SAMP1, SAMP6, SAMP8 y SAMP10) y un SAMR (SAMR1) han estado disponibles para los investigadores de todo el mundo a través del Consejo Superior de Investigaciones SAM (<http://samrc.md.shinshu-u.ac.jp/firste.html>).

Las cepas SAMP presumiblemente comparten una combinación de mutaciones de genes responsables del fenotipo propenso a la senescencia, además, se cree que cada cepa puede llevar su propia mutación o mutaciones en genes causantes de fenotipos patológicos relacionados con la edad que son únicos para cada cepa. Por ejemplo, los SAMP10 se caracterizan por atrofia cerebral y neurodegeneración, los SAMP8 por déficit de memoria y aprendizaje, y los SAMP6 por osteoporosis, mientras que los ratones SAMR1 representan un control normal de envejecimiento (Takeda, 2009).

Aunque muchas han sido las investigaciones que estudian ratones SAM y entienden la importancia de la colaboración interdisciplinaria, ha sido muy difícil interrelacionar al envejecimiento como un proceso complejo que afecta simultáneamente a la mente y el cuerpo, y no ha sido fácil evaluar las cuestiones globales acerca de las relaciones entre la mente y el cuerpo en el envejecimiento y la EA. Sin embargo, los datos recientes obtenidos de ratones SAMP8, incluyendo los resultados que se explicarán más adelante, están dirigiendo los esfuerzos y las investigaciones hacia una integración de los problemas de fragilidad física y cerebral, así como del envejecimiento y el Alzheimer. En este sentido, se ha propuesto al ratón SAMP8 como un modelo de EA ligado al envejecimiento patológico, ya que presenta diversos signos de patología amiloide y tau (Pallas et al., 2008).

En la tabla 2 se presenta un resumen de los principales modelos animales de EA, incluyendo al ratón SAMP8 de senescencia acelerada.

Modelo de Ratón	Mutación genética	Referencia primaria
PDAPP	APP (V717F)	Games et al., 1995
Tg2576	APP (K670N/M671L)	Hsiao et al., 1996
Tg CRND8	APP ((K670N/M671L/ V717F)	Dudal et al., 2004)
APP/PS1	APP ^{swe} y PS1(M146L)	Gordon et al., 2002
APP23	APP (K670N/M671L)	Sturchler-Pierrat et al., 1997
TAPP	APP (K670N/M671L) Tau (P301L)	Lewis et al., 2000
3xTg-AD	APP (K670N/M671L) Tau (P301L) PS1(M146L)	Oddo et al., 2003
5xFAD	APP (K670N/M671L/I716V,V717I) PS1(M146L/L286V)	Oakley et al., 2006
SAMP8	AKR/J y ratón albino	Takeda et al., 1997

Tabla 2: Resumen de los principales modelos animales de las EA.

OBJETIVOS

Muchos han sido los avances médicos y científicos desde que Alois Alzheimer identificó la EA como una entidad nosológica nueva y diferente; pero siempre ha existido una constante, y es la asociación de la patología al proceso de envejecimiento como la principal causa desencadenante; otras causas también importantes asociadas a esta patología son la producción de radicales libres, la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria.

Por otro lado a medida que se han ido desarrollando las técnicas de biología molecular junto con innumerables estudios exhaustivos de la enfermedad, se ha determinado que existe un componente genético importante y que predispone notablemente al paciente portador de ciertas mutaciones para desarrollar la enfermedad.

La experimentación *in vitro* permite recoger ambos aspectos de la enfermedad, ya sea utilizando células derivadas de modelos animales como el ratón SAMP8 de senescencia acelerada y rasgos de EA, ya sea diseñando nuevas líneas celulares que expresen mutaciones de EA familiar siendo las más comunes las de *PSEN1*.

Alineados con estas ideas, el OBJETIVO GENERAL de esta investigación es:

Establecer y caracterizar modelos celulares *in vitro* adecuados para el estudio de mecanismos patológicos de la EA y para el ensayo de posibles agentes terapéuticos.

Los OBJETIVOS ESPECÍFICOS son los siguientes:

1.- Estudiar el estrés oxidativo, las alteraciones mitocondriales y el efecto del tratamiento con suero de restricción calórica en cultivos de astrocitos SAMP8.

1.1.- Definir las alteraciones mitocondriales y el estrés oxidativo en cultivos primarios de astrocitos SAMP8, en condiciones basales y en respuesta al peróxido de hidrógeno.

1.2.- Estudiar los efectos del suero de restricción calórica a nivel mitocondrial en cultivos de astrocitos SAMP8.

1.3.- Establecer los posibles efectos neuroprotectores del suero de restricción calórica ante estrés oxidativo, en condiciones basales y en respuesta al peróxido de hidrógeno en astrocitos SAMP8.

2.- Estudiar el estado inflamatorio basal y la respuesta a estímulos proinflamatorios en cultivos de astrocitos y microglía SAMP8 y en el tejido cerebral *in vivo* de SAMP8.

2.1.- Evaluar el estado inflamatorio en cultivos de microglía y astrocitos, en condiciones basales y en respuesta a TNF α y a LPS+IFN γ en SAMP8.

2.2.- Determinar el estado inflamatorio *in vivo* a nivel del suero sanguíneo y corteza cerebral en ratones SAMP8 de 6 meses y 12 meses de edad.

2.3.- Establecer la correlación de los resultados de cultivos celulares con el estado inflamatorio cerebral *in vivo del modelo transgénico SAMP8*.

3.- Desarrollar las bases de un modelo celular que exprese mutaciones en el gen de la Presenilina 1 (*PSEN1*) asociadas a la EA monogénica.

1.1.- Crear tres plásmidos con mutaciones puntuales en el gen *PSEN1*: la K239N con penetrancia incompleta a los 65 años y la L286P y E120G asociadas a EA de aparición temprana.

1.2.- Expresar las mutaciones L286P y E120G y K239N en un sistema celular “Knock out” para *PSENI*.

1.3.- Establecer las condiciones de infección con adenovirus que expresen APPwt y APPswe para una vez el modelo sea estable se puedan evaluar los efectos funcionales de las mutaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- CULTIVOS CELULARES.

1.1.- Cultivos primarios de astrocitos

Se realizaron cultivos primarios enriquecidos en astrocitos a partir de cortezas cerebrales de ratones neonatos (1-3 días de edad) de las cepas SAMR1 y SAMP8.

Materiales:

- Placas de Petri y material quirúrgico para la disección
- Solución salina tamponada con fosfato (phosphate buffered saline, PBS)
- Solución de tripsina-EDTA 0,25%
- Solución de DNAsa 10 mg/mL
- Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS) y 50 mg/mL de gentamicina.
- Filtros de células de 70 μ m
- Frascos de cultivo y/o placas de pozos para sembrar las células

Procedimiento:

1.- En una cabina de flujo adecuada para la disección, se desinfectan las tijeras y las pinzas en un vaso de precipitados con etanol. Se toma cada cría, se sumerge hasta el cuello en otro vaso con etanol 70%, y se corta la cabeza con las tijeras dejándola caer en una placa de Petri. Se usa una camada de 6-8 crías para cada cultivo. La placa de Petri se mantiene sobre hielo para preservar los cerebros hasta el procesamiento del tejido.

2.- En una cabina de flujo horizontal se realiza la disección de las cortezas cerebrales. Para ello se corta la piel dejando expuesto el cráneo, se hacen unos cortes laterales y centrales en el cráneo, se levanta el hueso extrayendo con suavidad

el cerebro, dejándolo caer dentro de una placa de Petri con PBS frío. Se repite el procedimiento con todas las crías.

3.- A continuación, debajo de la lupa binocular se descarta el cerebelo y los bulbos olfatorios, se separan los dos hemisferios y se les da la vuelta para extraer el cerebro medio, se limpian las cortezas cerebrales de meninges y se transfieren a una nueva placa de Petri con PBS.

4.- Se realiza una breve trituración mecánica de los tejidos con tijeras.

5.- En una cabina de flujo vertical se trasvasa el tejido desmenuzado a un tubo de 50 mL y se centrifuga 3 min a 1000rpm.

6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en solución de tripsina-EDTA (1,2 mL+ 10,8 mL de PBS por camada). Se incuba 25 min a 37°C en un baño con agitación.

7.- La tripsinización se detiene añadiendo 12 ml de medio con FBS y DNAsa (10,6 mL DMEM + 1,2 mL FBS + 0,2 mL DNAsa 10 mg/mL). Se finaliza la disgregación con pipeta Pasteur o Eppendorf combitips (3-10 pipeteos).

8.- Centrifugar 7 min a 1000 rpm, descartar el sobrenadante y agregar 20 mL de DMEM con 20% de FBS al pellet. Se homogeniza con pipeta y se transfiere la solución a un filtro Falcon para descartar posibles grumos.

9.- Se cuenta la densidad de células de una alícuota en una cámara de Neubauer y se agrega el volumen de medio correspondiente para una densidad de $3 \cdot 10^5$ cel/mL.

10.- Se siembran las células en frascos T de 25 cc o en placas multipozo de 96, 48 o 24 pozos, según los experimentos a realizar. En dichas placas se coloca

agua destilada (H₂O) con fungisona en los pozos de las hileras exteriores para preservar los cultivos de evaporaciones y contaminaciones.

11.- Los cultivos se mantienen durante 21 días in vitro (DIV) antes de usarlos en los experimentos. Durante este periodo se cambia el medio cada 3-4 días disminuyendo progresivamente la concentración de FBS de 20% a 15% y 10%. Estos cultivos contienen aproximadamente un 90% de astrocitos.

1.2.- Cultivos primarios de microglía

Se obtuvieron cultivos de microglía a partir de los cultivos de astrocitos.

Procedimiento:

1.- Se recolecta el medio de cultivo de astrocitos maduros (21 DIV) y se mantiene a 37°C como medio condicionado.

2.- Se hace un lavado de las células con medio libre de suero y se incuban con solución de tripsina-EDTA (1:4 con medio libre de suero) durante 40 min hasta ver que la capa superior del cultivo, constituida principalmente por astrocitos, se desprenda suavemente y la capa inferior, mayoritariamente por microglía permanezca firmemente unida al soporte.

3.- Para detener el proceso de tripsinización se agrega un volumen igual de medio completo (con FBS al 10%) y se descarta el medio con las células desprendidas.

4.- Se restituye el medio condicionado recolectado inicialmente.

5.- Las células se usan un día después para los experimentos correspondientes. Estos cultivos contienen un 98% de células microgliales.

1.3.- Cultivos de líneas celulares

1.3.1.- Fibroblastos embrionarios de ratón

Los Fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), provenientes de ratones knock-out para el gen de la PSEN1 y PSEN2 (MEF KO) y sus respectivas células control, de tipo salvaje (MEF WT). Líneas cedidas por Bart De Strooper, Universidad de Leuven, Bélgica.

Estas líneas celulares se mantienen almacenadas en nitrógeno líquido, por ende para ser utilizadas deben ser descongeladas siguiendo el siguiente procedimiento:

1.- Después de sacar el vial del tanque de nitrógeno líquido se deja 1 min a temperatura ambiente.

2.- Se sumerge parcialmente (sin llegar a la rosca) en un baño a 37°C durante un par de minutos hasta que esté descongelado y se seca y desinfecta el criotubo con papel absorbente mojado con alcohol al 70%.

3.- En la cabina de flujo se transfiere el contenido del criotubo a un tubo Falcon con 20 mL de medio de cultivo calentado a 37°C. Con una pipeta de 10 mL se homogeniza suavemente y se distribuye en 2 placas de cultivo de 10 cm. Dejar crecer hasta llegar a una confluencia del 70% para subcultivar.

Luego de la descongelación y una vez alcanzada la confluencia óptima las células deben ser subcultivadas para posteriormente realizar los experimentos. El procedimiento de subcultivación es el siguiente:

Materiales:

- Medio DMEM suplementado con 10% FBS, 2 mM glutamina y 50 mg/mL gentamicina.
- PBS con 0,02% de EDTA.
- Solución de Tripsina 0,25% (2,5 mg/mL).
- FBS al 10% (inhibidor de la tripsina).

Procedimiento:

1.- Se observan las placas al microscopio para comprobar que las células estén a la confluencia deseada (70% aproximadamente) y que estén bien adheridas.

2.- Retirar el medio de cultivo con la bomba extractora, hacer 1 o 2 lavados con PBS a 37°C y agregar 5 mL de solución de tripsinización: 100 µL de EDTA y 30 µL de tripsina en PBS. Se deja unos minutos a 37°C para que se desprendan de la placa.

3.- Con una pipeta Pasteur se recogen y trasvasan a un tubo Falcon agregando FBS al 10% final para inactivar la tripsina.

4.- Centrifugar 5 min a 800 rpm. Se descarta el sobrenadante y se agregan 1-2 mL de medio de cultivo para disgregar el pellet celular con una pipeta Pasteur. Se agrega más medio hasta llegar a 10 mL.

5.- Se cuentan las células y se calcula la concentración de una pequeña alícuota, y se ajusta el volumen según la concentración de siembra deseada.

6.- Se siembran las células en las placas correspondientes según el experimento que se desee ejecutar.

Una vez se han realizado las experimentaciones necesarias las células deben ser congeladas nuevamente para mantener su viabilidad y poder ser empleadas en

experimentos posteriores, para ello se procede de la siguiente manera:

1.- Proceder igual que en el procedimiento de subcultivo anterior hasta el final de la tripsinización con FBS.

2.- Centrifugar y resuspender las células en FBS.

3.- Se añaden 0,9 mL de la suspensión de células en un criotubo de 1 mL.

Agregar 0,1 mL de DMSO gota a gota. Tapar bien e invertir suavemente para mezclar. Almacenar en porexpan a -80°C durante 1 o 2 días para luego colocar los criotubos en el depósito de nitrógeno líquido.

1.3.2.- Células embrionarias de riñón humano

Las células embrionarias de riñón humano (HEK 293), fueron generadas mediante transformación de cultivos de células normales embrionarias de riñón humano con un inserto de 4,5 kilobases del brazo izquierdo del genoma del adenovirus 5, incorporado en el cromosoma 19 humano. Las células embrionarias de riñón fueron obtenidas en el laboratorio de Alex Van der Eb en Leiden, Holanda, mientras que la transformación por adenovirus fue ejecutada por Frank Graham. El número 293 se refiere al número de experimento. Línea cedida por Bryce Sopher, Universidad de Washington

Para el cultivo de las HEK 293 se utilizaron el mismo medio y procedimientos descritos en el apartado anterior para las células MEF.

2.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

2.1.- Ensayo de MTT

El método del MTT para medir la citotoxicidad y el crecimiento celular desarrollado por Mosmann (1983), se realiza siguiendo las modificaciones de Hansen et al. (1989). Las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (MTT), que es incolora, formando entonces cristales de formazán, de color azul oscuro e insolubles en agua. La formación de formazán ocurre básicamente en mitocondrias intactas, aunque también hay cierta actividad reductora en el citoplasma. La absorbancia se mide en un espectrofotómetro.

Soluciones:

Solución de MTT: 3(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazolio bromidío) se disuelve a una concentración de 5 mg/mL en PBS, se esteriliza por filtración y se guarda (un mes como máximo) a 4°C, protegido de la luz.

Solución de lisis: Se prepara una solución de extracción para lisar las células y disolver los cristales de formazán. Se disuelve un 20% de sodio docecilo sulfato (SDS) en una solución de N,N dimetil formamida/agua (1:1), se ajusta el pH hasta 4,7.

Procedimiento:

1.- El ensayo del MTT se llevó a cabo en cultivos sembrados en placas de 96 pozos. Se sacan las placas del incubador y se añaden 10 µL de solución de MTT a cada pozo a una concentración final de 500 µg/mL.

2.- Se ponen las placas en el incubador y se dejan 2 h. Durante este tiempo las células viables con mitocondrias activas reducirán la sal de MTT dando lugar a la formación de cristales. Para hacer el blanco se dejan algunos pozos sin añadir la solución de MTT.

3.- Posteriormente, para disolver los cristales, se añade 100 µl de solución de lisis a cada pozo preferiblemente con pipeta multicanal y puntas recortadas, también los pozos del blanco.

4.- Se incuban en la estufa a 37°C durante la noche, o a temperatura ambiente 1-2 días. Las placas se mantienen envueltas envuelven en Parafilm para evitar la evaporación.

5.- Se mide la densidad óptica a 560 y 620 nm en el espectrofotómetro. Se utilizan los valores de la absorbancia a 620 nm como referencia y se obtiene la diferencia respecto a la absorbancia a 560 nm.

6.- Los resultados de calculan según:

$$\text{Porcentaje de reducción de MTT} = \left[\frac{(\text{DO}/\text{DO0})}{(\text{DOc}-\text{DO0})} \right] * 100$$

Donde DO es la absorbancia de cada pozo, DOc es la medida de absorbancia de los pozos control y DO0 es la medida de absorbancia de los pozos usados como blanco.

3.- MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

3.1.- Ensayo de TMRM/NAO

Este ensayo mide el potencial de membrana mitocondrial en los cultivos celulares mediante la tinción fluorescente con TMRM que se acumula en las mitocondrias en función del potencial de membrana y la de NAO que es independiente de potencial y por tanto indica la masa mitocondrial.

Soluciones:

Medio de incubación (Solución salina tamponada con HEPES (SSTH)).

-NaCl 135 mM, KCL 5 mM, CaCl₂.2H₂O 1,8 mM, MgSO₄.7H₂O 0,62 mM, HEPES (ácido libre) 10 mM, glucosa 6 mM.

- Se ajusta a pH 7,4 con NaOH. La solución preparada sin glucosa puede mantenerse en nevera durante varios días. Antes de su uso se añade la glucosa y se calienta a 37°C.

Tetrametil rodamina metil éster (TMRM, Molecular Probes T-668) 10 mM

- Disolver 2,5 mg de TMRM en 500 µl de DMSO. Agitar en vortex. Guardar a -20°C.

Nonil-naranja de acridina (NAO, Molecular Probes A-1372) 10 mM

- Disolver 2,5 mg de NAO en 529 µL de H₂O. Agitar en vortex. Guardar a -20°C.

Procedimiento:

1.- Extraer el medio de cultivo por inversión de la placa sobre papel absorbente y realizar dos lavados agregando SSTH a 37°C con pipeta multicanal y puntas recortadas para no desprender las células.

2.- Se vuelve a colocar 80 µL de la solución de SSTH en los pozos, a excepción de los pozos seleccionados como blanco donde se colocan 100 µl.

3.- Incubar 30 min a 37°C.

4.- Agregar 10 µL/pozo de NAO (1 µM final) excepto en la columna de pozos que se usará como blanco.

5.- Incubar 5 min a 37°C.

6.- Agregar 10 µL/pozo de TMRM (10 µM final) excepto en la columna que se usará como blanco.

7.- Incubar 20 min a 37°C.

8.- Lavar 2 veces con solución SSTH a 37°C y llenar los pozos con 100 µL SSTH.

9.- Medir en el fluorímetro TMRM: λ excitación = 535 nm / λ emisión = 590 nm.

10.- Medir en el fluorímetro NAO: λ excitación = 490nm / λ emisión = 535 nm.

3.2.- Ensayo de Rodamina 123

La rodamina 123 (Molecular Probes R-302) es un colorante fluorescente permeable a las células, catiónico y relativamente no tóxico. Una vez en el citoplasma se acumula en las mitocondrias activas en función de la diferencia de potencial de su membrana. Tiene una respuesta similar al TMRM.

Soluciones:

Medio de incubación (SSTH) (ver apartado anterior).

Rodamina 123 (solución madre)

- Se prepara una solución concentrada que contiene 1 mg de rodamina 123 por mL de etanol absoluto (2,56 mM). Esta solución se divide en alícuotas de 70 µL que se conservan en tubos eppendorf a -80°C aisladas de la luz.

Solución de rodamina 123 (solución de trabajo).

- Para cada ensayo, la solución madre se diluye 200 veces en solución SSTH para obtener la concentración final de 5 µg/mL (12.8 µM). La concentración final de etanol es del 0,5% (V/V).

Procedimiento:

1.- Se saca el medio de cultivo de la placa por vertido sobre un papel absorbente y se hacen dos lavados añadiendo medio de incubación a 37°C con pipeta multicanal con puntas cortadas y sacándolo con papel absorbente.

2.- Se añaden 100 µL por pocillo de la solución de rodamina, excepto la primera columna de células que se añade 100 µL de SSTH solo (se usa como blanco).

3.- La placa se coloca inmediatamente en una estufa de incubación a 37°C protegida de la luz con papel de aluminio durante 60 min.

4.- Finalizada la incubación se saca el contenido de la placa, se hacen dos lavados y se llenan los pocillos con 100 µL de SSTH.

5.- Se realiza la lectura a las longitudes de onda de excitación/emisión 507/529 en el fluorímetro.

6.- Los resultados se calculan según:

Porcentaje relativo de acumulación de rodamina 123: $[(R-R_0)/R_0] * 100$

Donde R es la fluorescencia del pocillo y R₀ es el valor promedio de los pocillos control.

3.3.- Uso de desacopladores e inhibidores selectivos de los complejos mitocondriales

Para estudiar la respuesta funcional de los diferentes complejos mitocondriales se usaron compuestos que inhiben selectivamente cada uno de los diversos complejos. Como referencia se usó también un desacoplador de la cadena de transporte electrónico.

Sustancias químicas:

- Carbonil cianido de p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), 10 μM , desacoblador mitocondrial.
- Rotenona, 40 μM , inhibidor del complejo I.
- Ácido trifluoroacético (TFA) 20 μM , inhibidor del complejo II.
- Antimicina A, 8 μM , inhibidor del complejo III.
- Azida sódica, 10 mM, inhibidor del complejo IV.
- Oligomicina, 20 μM , inhibidor del complejo V.

Procedimiento:

Los diversos compuestos se añadieron a los pocillos de las placas de cultivo durante 1 h después de la carga de rodamina 123 (punto 4 del procedimiento). El aumento de fluorescencia en comparación con el control sin desacoplador ni inhibidores mide la respuesta de reducción del potencial de membrana mitocondrial inducida por cada toxina mitocondrial.

4.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD OXIDATIVA INTRACELULAR

4.1.- Ensayo de Diacetato 2',7'-Diclorofluorescina.

El diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA, Molecular Probes D-399) es una molécula no fluorescente y permeable a las células. Dentro de las células los acetatos son hidrolizados por esterasas endógenas. La presencia de peróxidos principalmente y otros radicales oxidantes, oxidan la DCFH, que es poco fluorescente, a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que es altamente fluorescente.

Soluciones:

Medio de incubación (SSTH)

DCFH-DA (solución madre)

- Se prepara una solución concentrada 2 mM de DCFH-DA que contiene 1,95 mg en 2 mL de metanol. Esta solución se divide en alícuotas de 50 μ l que se conservan en tubos eppendorf a -80°C aisladas de la luz.

Solución DCFH-DA (solución de trabajo)

- La solución madre se diluye 200 veces en medio de incubación justo antes de su uso para obtener una concentración final de 10 μ M.

Procedimiento:

1.- Se saca el medio de cultivo de la placa por vertido sobre un papel absorbente y se hacen dos lavados añadiendo 200 μ l de SSTH a 37°C con pipeta multicanal con puntas cortadas y sacándolo con papel absorbente.

2.- Se añaden 100 μ L/pocillo de la solución de DCFH-DA.

3.-La placa se coloca inmediatamente en una estufa de incubación a 37°C protegida de la luz con papel de aluminio.

4.- A los 20 min se finaliza la carga intracelular de DCFH-DA y se sustituye la solución de por SSTH (se procede como en el punto 1).

5.- Se realiza una lectura basal a las longitudes de onda de excitación/emisión 485/530 en el fluorímetro.

6.-En el caso de valorar el efecto de agentes: se añaden 10 μ L de cada solución/pocillo. Alternativamente se saca el contenido de los pozos y se llenan con 100 μ L de los agentes diluidos en SSTH.

7.- Se deja la placa incubando durante 1 h a 37°C.

8.- Se realiza una nueva lectura.

5.-MEDIDA DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CELULAR

5.1.- Ensayo de producción de óxido nítrico

Soluciones madre:

- Reactivo de Griess A: 1g sulfanilamida (1%), 5 mL de ácido orto-fosfórico (5%) y 100 mL de agua doble destilada (dH₂O).

- Reactivo de Griess B: 100 mg N-(1-naftil) de dihidrocloruro de etilendiamina (0,1%) y 100 mL

- Nitrito sódico (NaNO₂) 1 mM (6.9 mg en 10 mL dH₂O) para la curva patrón.

Estos reactivos se almacenan a 4°C y son estables durante 2 meses y mientras se mantienen completamente transparentes.

Soluciones de trabajo:

Solución de Griess A+B (1:1) que se prepara en el momento del ensayo.

Curva patrón de nitrito sódico que se prepara a partir de una primera dilución de la solución madre de nitrito sódico 1:10 para obtener: NaNO₂ 100 µM, y diluciones seriadas 1:1 para obtener: 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6 µM, 3,125 µM, 1,562 µM y 0,781 µM. Siempre en tubos de plástico.

Recolección de las muestras:

1.- Se recoge el medio de cultivo en tubos eppendorf.

2.- Se centrifuga a 1200 rpm durante 5 min a 4°C para descartar la presencia de restos celulares.

3.- Si no se procesan las muestras enseguida, se pueden congelar a -20°C.

Procedimiento:

1.- En placa de 96 pozos, se colocan 50-100 µl/pozo de las soluciones patrón y de las muestras y un blanco (medio de cultivo sin células), por duplicado o triplicado.

2.- Se agregan 50-100 μ L del reactivo de Griess A+B/pozo con pipeta multicanal.

3.- Se mezcla bien con la pipeta multicanal.

4.- Se deja incubar 10 min a temperatura ambiente.

5.- Se lee en el espectrofotómetro a 540 nm.

5.2.- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) de citoquinas

Tres fueron las sustancias proinflamatorias que se detectaron mediante ELISA: interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y tumor necrosis factor α (TNF- α). El principio de detección fue el mismo ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima cuantitativo tipo “sandwich”. Para ello se emplearon anticuerpos monoclonales específicos.

Cada uno de los anticuerpos está adherido a las placas de 96 pozos que luego entran en contacto con los estándares y muestras de sobrenadantes provenientes de cultivos de astrocitos y de microglía. Las citocinas se unirán al anticuerpo monoclonal específico respectivo, luego de lavar cualquier sustancia que no esté adherida se procede a colocar el anticuerpo policlonal específico a la citocina unido a un enzima, que para TNF- α e IL-6 es biotinilado. Luego de lavar nuevamente retirar cualquier sustancia en exceso se procede a colocar el substrato del enzima para lo que se agrega una proteína conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (estreptavidina-HRP para IL-6 y avidina-HRP para TNF- α). Para IL-1 β el anticuerpo policlonal ya está directamente conjugado con HRP así que no requiere substrato conjugado. Se cuantificara leyendo absorbancia a 450 nm.

Procedimiento general:

- Pipetear por placa 20 μL del anticuerpo de captura en 10 mL de tampón de revestimiento.

-Distribuir 100 μL de la dilución en cada pozo de las placas de poliestileno.

- Cubrir la placa e incubar durante la noche a 4°C.

-Lavar 2 veces con 400 μL aproximadamente con el tampón de lavado y bloquear los pocillos con 250 μL del tampón de saturación durante 2 h a temperatura ambiente.

- Vaciar la placa y dejar escurrir sobre papel absorbente durante 24 h. La placa esta ya lista para ser usada y puede ser almacenada a 4°C por 2 semanas.

- Diluir los estándares y las muestras en el tampón diluyente del estándar o en medio de cultivo o suero según corresponda.

- Dispensar 100 μL de la dilución en cada pozo incluyendo blancos preferiblemente por duplicado.

- Reconstituir el vial del anticuerpo de detección en agua destilada. Por placa diluir 100 μL del vial reconstituido en tampón diluyente y distribuir 50 μL por pozo.

- Incubar el antígeno y el anticuerpo de detección durante 3 h a temperatura ambiente.

- Lavar 3 veces con 400 μL de tampón de lavado y continuar inmediatamente.

- Por placa pipetear 5 μL del anticuerpo policlonal en 500 μL de su tampón correspondiente. Tomar 150 μL de la dilución en 10 mL del mismo tampón y dispensar 100 μL por pozo. Incubar 20 min a temperatura ambiente y lavar 3 veces con el tampón de lavado.

- Distribuir 100 μL del sustrato correspondiente y esperar 10-15 min en la oscuridad (cubrir placa con papel de aluminio).

- Detener la reacción agregando 100 μL del ácido sulfúrico 1 M.

- Leer absorbancia a 450 nm.

5.3.- Estimulación mediante el uso de sustancias proinflamatorias

Para medir la respuesta inflamatoria de los astrocitos y de la microglía, se sometieron los cultivos celulares de SAMP8 a distintas dosis de sustancias pro-inflamatorias: lipopolisacárido (LPS), interferón γ (IFN- γ) y TNF- α .

Para la solución de LPS se partió de solución a 1 mg/mL para dosis de 100 ng/mL y 2000 ng/mL. Para el IFN- γ se partió de una solución de 100 μ g /mL para dosis de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 3 ng/mL y para el TNF- α se partió de una solución 0,1mg/ml para dosis de 0,1, 1, 10, 30 y 100 ng/mL.

Después de que cada cultivo llegara a término durante aproximadamente 3 semanas se procede a estimularlos con las dosis arriba mencionadas en una combinación de LPS/IFN- γ de 100/0,01, 100/0,05, 100/0,1, 100/0,5 y 2000/3 y por otra parte estimulación sólo con TNF- α en las dosis arriba mencionadas.

Esta estimulación se mantuvo durante 48 h a 37°C, posteriormente se procedió a recoger los sobrenadantes para hacer determinaciones de óxido nítrico y los ELISA.

6.- TINCIÓN ESPECÍFICA DE ASTROCITOS Y MICROGLÍA

Para identificar las células astrogiales y comprobar su morfología se ha empleado la técnica de tinción inmunocitoquímica con un anticuerpo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Para la microglía se ha empleado la lectina del tomate (*Lycopersicon esculentum*) que se une a carbohidratos específicos de la membrana celular de las células microgliales.

Soluciones y reactivos:

- Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4.
- Solución salina tamponada con Tris (TBS).
- Suero normal de cabra para cubrir las uniones no específicas.
- Anticuerpo primario GFAP, anti-vaca hecho en conejo (DAKO, Z 0334).

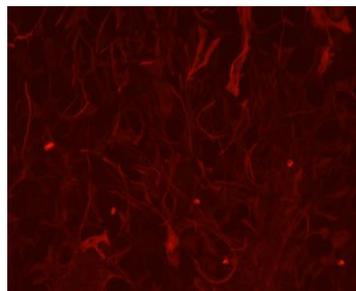
- Lectina de *Licopersicon esculentum*, biotinilada (Sigma, L0651).
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 546, anti-conejo hecho en cabra (Molecular Probes, A11081).
- Fluoresceína estreptavidina, para marcar los compuestos biotinilados (Vector, SA-5001).

Procedimiento en cultivos celulares:

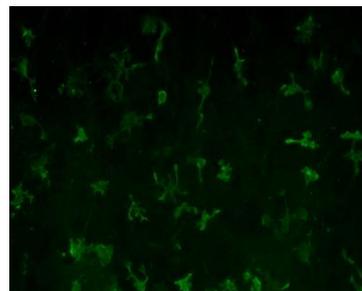
-Después de fijar las células cultivadas con paraformaldehído durante 1 h a temperatura ambiente, se realizan 2 lavados con TBS y se permeabiliza la membrana con tritón a 0,2% en TBS durante 8 min antes de bloquear las uniones inespecíficas con suero normal de cabra al 3% durante 1 h a temperatura ambiente.

-Para los cultivos astrogiales se realiza una doble tinción con anti-GFAP 1:500 y con lectina 1:400 con 1% de suero de cabra en TBS. Para los cultivos de microglía se empleará sólo la lectina. La incubación se realizará durante la noche a 4°C en caja húmeda.

-Al día siguiente se realizan 2 lavados durante 5 min con TBS para posterior incubación, durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad, con los anticuerpos secundarios. Para GFAP se utiliza Alexa Fluor 546 que tiene fluorescencia roja y para la lectina se utiliza fluoresceína estreptavidina de fluorescencia verde, con 1% de suero de cabra, en TBS.

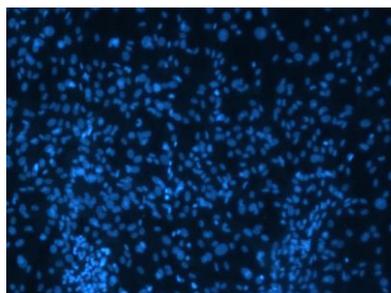


Tinción con anti-GFAP



Tinción con lectina

-Posteriormente se realizan 2 lavados con TBS durante 5 min y se tiñen los núcleos con fluorescencia azul con bisbezimida 5 μ M durante 30 min, se hacen 2 lavados nuevamente y se montan con Mowiol poder observar al microscopio.



Tinción con bisbenzimidida

7.- ESTUDIO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA IN VIVO

7.1.- Tratamiento de ratones SAMR1 y SAMP8 con LPS

Se trataron ratones SAMR1 y SAMP8 de 6 meses y 12 meses de edad, machos, con LPS de *Escherichia coli* 026:B6, por inyección intraperitoneal (i.p). Se administraron 100 µg/ratón i.p. Los ratones se devolvieron a su jaula durante 3 h.

7.2.- Evaluación comportamiento animal de “sickness behavior”

Se realizó un estudio de interacción social para determinar el efecto del LPS sobre la motivación de explorar individuos juveniles que se presentan en la jaula. Citoquinas y diversos agentes inflamatorios disminuyen esta interacción e inducen el comportamiento llamado “sickness behavior” (Konsman, et al 2002). Se analizó la cantidad de tiempo que el ratón residente dedicó al contacto social con el juvenil.

Procedimiento:

-En una prueba basal, se introdujo un individuo juvenil de la misma cepa y sexo en la jaula del ratón en estudio para determinar la actividad de interacción social basal.

-Se contabilizó el tiempo de exploración en la zona ano-genital y anterior, y el oler del ratón en estudio sobre el ratón juvenil, en segundos acumulados durante 2 min y 5 min. Se descartaron tiempos más largos para evitar episodios de agresividad.

-Se inyectaron los ratones con salino fisiológico o con LPS i.p.

-A las 3 h de la inyección se introdujo un nuevo individuo juvenil de la misma cepa y sexo en la jaula del ratón tratado con salino o con LPS.

-Se contabilizaron nuevamente los segundos de interacción social del ratón en estudio.

7.3.-Determinación de citoquinas en sangre y tejido cerebral

Después de la evaluación de la interacción social los ratones se mataron por decapitación y se recogió sangre del tronco que se recogió en tubos para su coagulación y posterior obtención de suero. Inmediatamente se procedió a la disección en hielo de la corteza cerebral e hipocampo. El suero y los tejidos se congelaron a -80°C para análisis posteriores.

Se determinaron las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α en suero y tejido cerebral, con el mismo procedimiento descrito para los medios de cultivos celulares (ver apartado 5.2). Previamente los tejidos fueron homogenizados en un tampón RIPA con inhibidores de proteasas igual al utilizado en las técnicas de Western Blot (Ver apartado 14).

7.4.- Estudio histológico cerebral

Ratones seleccionados de los diversos grupos experimentales se mantuvieron en jaulas hasta las 24 h del tratamiento con salino o LPS, para un posterior estudio histológico. Los animales se perfundieron con 4% paraformaldehído y se procesaron para cortes con criotomo. Los cortes se tiñeron con anti-GFAP y lectina del tomate por un procedimiento similar al descrito para los cultivos celulares (ver apartado 6).

Soluciones y reactivos:

- Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4.

- Solución salina tamponada con Tris (TBS).
- Suero normal de cabra para cubrir las uniones no específicas.
- Anticuerpo primario GFAP, anti-vaca hecho en conejo (DAKO, Z 0334).
- Lectina de *Licopersicon esculentum*, biotinilada (Sigma, L0651).
- Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488, anti-conejo hecho en cabra (Molecular Probes, A11034).
- Fluoresceína estreptavidina, para marcar los compuestos biotinilados (Vector, SA-5001).

Procedimiento en tejido cerebral:

-Los ratones anestesiados con 10 mg/mL xilacina i.p. y 80 mg/mL ketamina i.p., se perfundieron con 15 mL de solución salina y a continuación con 90 mL de 4% paraformaldehído en tampón fosfato. Se extrajeron los cerebros, se postfijaron 24 h en 4% paraformaldehído, se crioprotegieron en soluciones sucesivas de 10, 20 y 30% sacarosa y se congelaron sobre hielo seco.

-Los cerebros congelados se conservaron a -80°C en recipientes herméticos para evitar su desecación hasta que se cortaron en un micrótopo de congelación. Se realizaron cortes seriados de 20 µm de grosor que se recogieron en medio de congelación para mantenerlos hasta el momento de realizar las tinciones.

-El procesado de los cortes de tejido se realizó por el método de libre flotación (“free-floating”) en un sistema de pozos con rejillas. Lavados, permeabilización, bloqueo de uniones inespecíficas, y tinción con GFAP o con lectina se realizó de manera similar al procedimiento descrito en cultivos. Para revelar las uniones con lectina se usó fluoresceína estreptavidina. Para revelar la revelar las uniones del anticuerpo contra GFAP se utilizó el anticuerpo secundario Alexafluor 488 con fluorescencia verde. Los núcleos se tiñeron con bisbenzimidida. Tras los últimos lavados, los cortes se montaron en portaobjetos con Mowiol y se observaron al microscopio de fluorescencia.

8.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Técnica ampliamente empleada y difundida que consiste en amplificar el número de copias de un fragmento de ADN de interés.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, motivo por el cual se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN, replicarlas, y a continuación, dejar que las hebras de ADN vuelvan a unirse para poder duplicarlas nuevamente.

Según la aplicación pueden modificarse el número de ciclos de replicación y las condiciones, como verán, en esta investigación tuvo muchas aplicaciones, entre las formas que se empleó la PCR, encontrarán PCR screening, mutagénesis dirigida y la PCR convencional que se explica en este apartado y tuvo como principal aplicación amplificar los fragmentos de ADN finales seleccionados insertados en los vectores (MSVC2.2 y pcDNA3.1) que contenían las mutaciones de interés.

Materiales:

- Tampón de PCR (10X) (Ref. 112713318001; Roche Diagnostics)
- Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L) (Ref. 11435094001; Roche Diagnostics)
- Dinucleosides trifosfato (dNTPs) de timina (T), adenina (A), citosina (C) y guanina (G) (dTTTP, dATP, dCTP, dGTP) a 2 mM.
- Oligonucleótidos cebadores a 10 μ M (ver Tabla 3)
- Mg₂Cl a 25 mL
- DNA molde a 50 ng/ μ L

Procedimiento:

1.- Preparar el volumen necesario de mezcla de todos los componentes de la reacción, excepto el DNA molde de cada muestra, para todas las muestras a amplificar.

- a.- Tampón de PCR 10X a concentración final 1X
 - b.- dNTPs a concentración 0,2 mM.
 - c.- Mg₂Cl, en los casos que sea necesario añadir este reactivo en mayor cantidad del que ya lleva el tampón de PCR, hasta que la concentración final entre los dos alcance de 1,5-4 mM.
 - d.- Oligonucleótidos cebadores a concentración final de 0,25 µM. (Tabla 3)
 - f.- Taq DNA polimerasa 0,5 unidades por reacción.
 - g.- dH₂O hasta alcanzar un volumen de 24 µL para cada muestra a amplificar.
- 2.- Agitar suavemente y hacer un pulso de centrifuga.
 - 3.- Repartir la mezcla en tubos estériles de 0,2 mL, 24 µL /tubo.
 - 4.- Añadir a cada tubo 50 ng de DNA molde (1 µL).
 - 5.- Colocar los tubos en el termociclador programado para que se produzca la reacción específica de ampliación. Las condiciones específicas de reacción se indican en la Tabla 4.

Nombre	Secuencia	Tm
Secuencia Forward-MSVC 2.2	5' CTCCTTCTCTAGGCGCCGG '3	59,9°C
Secuencia Reverse-MSVC 2.2	5' GGCTTCGGCCAGTAACGTTAG '3	58,1°C
Secuencia Forward-pcDNA 3.1	5' CTCGAGATGACAGAGTTACCTGCAC CG '3	61,9°C
Secuencia Reverse-pcDNA 3.1	5' GAATTCCTAGATATAAAATTGATGG '3	47,8°C

Tabla 3: Secuencias y Tm de oligonucleótidos cebadores para MSVC2.2 y pcDNA 3.1.

Proceso	Temperatura	Tiempo	# de repeticiones
1.-Desnaturalización Inicial	94°C	5min	1
2.-Desnaturalización (amplif)	94°C	30 seg	35
3.-Hibridación	58,5°C para MSVC2.2 52,5°C para pcDNA3.1	1min	35

4.-Extensión	72°C	1 min	35 volver al paso 2
5.-Extensión Final	72°C	3 min	1
6.-Pausa	4°C	-----	1

Tabla 4: Condiciones basales PCR convencional.

9.- CLONAJE DE DNA DENTRO DE UN PLÁSMIDO

El objetivo de esta técnica es introducir dentro de un vector de expresión eucariota (el plásmido) un fragmento de cDNA para poder estudiar posteriormente su expresión, regulación o las distintas funciones que pueda ejercer en el organismo del que procede. Para ello el cDNA a insertar puede originarse de una digestión con una enzima de restricción, tanto del fragmento plasmídico donde se encuentra el cDNA de interés a introducir como del plásmido receptor, para que tengan así los mismos extremos y puedan unirse posteriormente.

Con la finalidad de que el plásmido no se recirculice en presencia de ligasa se debe tratar con fosfatasa alcalina, que defosforila los extremos del mismo.

Después se une el vector con el fragmento a clonar gracias a una ligasa, que unirá los extremos y de esta forma obtendremos la construcción.

Materiales:

- Eppendorfs estériles de 0,5 mL y 1,5 mL.
- Enzima de restricción con su tampón de reacción.
- Tampón TBE 5X: Tris 450 mM, ácido bórico 360 mM, EDTA 12 mM. Ajustar el pH a 8,3 con ácido acético glacial. Conservar a temperatura ambiente.
- Agarosa 1% en TBE 0,5X.

- Tampón de carga para electroforesis en agarosa (6X): glicerol al 30 % y azul de bromofenol al 0,1% en TBE 1X.
- Bromuro de etidio o SYBR Safe (0,5 µg/mL).
- Fosfatasa alcalina con su tampón de reacción (Roche).
- EDTA 5 mM.
- QIAquick® Gel Extraction kit.
- Acetato sódico 3 M.
- Isopropanol.
- T4 DNA Ligasa® con su tampón de reacción (Roche)
- Bacterias *E. coli* DH5 α supercompetentes.
- Bacterias *E. coli* STBL2 supercompetentes.
- Medio de cultivo LB con y sin antibiótico.
- Medio de cultivo TB.
- Placas selectivas LB-Agar-Antibiótico.
- Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 2 mM.
- Taq DNA polimerasa con su tampón de reacción 10X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂).

Procedimiento:

Digestión del plásmido y del DNA a clonar

1.- Añadir en cada eppendorf:

- 2 µL del tampón de incubación (10X) que corresponda a cada enzima.
- 4 µL de la construcción (vector / ADN) a digerir.
- 0,4 µL de la enzima de restricción a 10 U/µl que vayamos a usar el volumen de dH₂O necesario hasta completar 20 µL.

2.- Incubar el tiempo indicado para cada enzima y a la temperatura correspondiente a la de actuación de ésta.

3.- Visualizar la digestión cargando en un gel de agarosa al 1%, 0,5 μL de la digestión junto con 0,5 μL de tampón de carga (1X). Correr la electroforesis a 90V.

4.- Calcular la cantidad de fragmento que queremos subclonar que se tiene después de la digestión. Aproximadamente se conoce por el límite de resolución de la agarosa que cuando se intuye la existencia de una banda, la concentración de DNA es de unos 8-10 ng/ μL y cuando la banda es visible, 10 ng/ μL .

5.- Congelar a -20°C las digestiones hasta que se usen o continuar con el procedimiento.

Defosforilación del vector receptor

1.- Dispensar en un eppendorf:

- 4 μl del tampón de reacción (10X) de la fosfatasa alcalina proveído por el kit.

- 19,5 μL del producto de la digestión del vector recipiente.

- 1 μl de fosfatasa alcalina 10 U/ μL .

- El volumen de dH_2O necesario hasta completar 40 μL .

2.- Incubar 30 min a 37°C .

3.- Añadir 1 μl de fosfatasa alcalina y dejar a 37°C 1 h 30 min más.

4.- Parar la reacción añadiendo 0,4 μL de EDTA 5 mM o colocándola en hielo durante 15 min.

5.- Almacenar a -20°C hasta su utilización o continuar con el procedimiento.

Aislamiento o extracción del vector receptor y del fragmento a introducir

Se realiza por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, cortando del mismo los fragmentos correspondientes y purificándolos con un kit comercial (QIAquick[®] Gel Extraction kit, *Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA*).

1.- Cargar en un gel de agarosa al 1%, en pocillos no correlativos:

- 19,5 µl del producto de la digestión del fragmento a introducir junto con tampón de carga (6X) a una relación 5:1.
- 40 µl de la reacción de defosforilación del vector receptor junto con tampón de carga (6X) a una relación 5:1.
- marcador de peso molecular de 1 Kb.

2.- Correrlo a 60 V hasta que el tampón de carga llegue al final del gel.

3.- Exponer el gel al transiluminador de luz UV y cortar con un bisturí estéril las bandas deseadas.

4.- Pesarlas y depositarlas dentro de un eppendorf estéril.

Purificación de bandas (QIAquick[®] Gel Extraction kit, *Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA*)

1.- Añadir 3 volúmenes de tampón QC, que es un tampón de solubilización y unión de DNA (con indicador de pH), por cada volumen de banda de gel, sabiendo que en éstas 100 mg \approx 100 µL.

2.- Incubar a 50°C 10 min o hasta que el gel esté totalmente disuelto. Mezclar con vórtex cada 2-3 min para agilizar este proceso.

3.- Comprobar que el color de la mezcla es el mismo que el del tampón QG. Si no fuese así, añadir 10 µL de acetato sódico 3 M.

4.- Añadir el mismo volumen de isopropanol que de banda de gel que había al principio del proceso y mezclarlo por inversión.

5.- Colocar la columna QIAquick spin dentro de un eppendorf estéril y poner en ella la mezcla anterior. Centrifugar a 13200 rpm durante 1 min. Si la mezcla no cupiese en la columna, repetir este paso con el volumen de mezcla que hubiera quedado en exceso.

6.- Eliminar el filtrado.

7.- Añadir a la columna 0,5 ml de tampón QG y centrifugar a 16100xg 1 min.

8.- Para lavar la columna, dispensar 0,75 ml de tampón PE, que es un tampón de lavado para ADN, y dejarlos 2-5 min. Centrifugar 1 min a 16100xg.

9.- Eliminar el filtrado y volver a centrifugar 1 min a 16100xg.

10.- Colocar la columna en otro eppendorf estéril para la recogida de la muestra.

11.- Añadir, por el centro de la columna, 30 μ L de dH₂O y dejarla 1 min. Centrifugar 1 min a 16100xg.

12.- Calcular la concentración de DNA que hemos recuperado, tanto de vector receptor como de la banda donde estaba el fragmento a subclonar, sabiendo que en el proceso se recupera el 75% de la cantidad inicial de DNA que teníamos.

Ligación del vector receptor y del fragmento a subclonar.

Calcular los ng de fragmento a subclonar que hay que añadir en la reacción de ligación por los 50 ng de vector receptor que pondremos, según la fórmula:

$ng \text{ fragmento} = [(50 \text{ ng vector receptor} \times Kb \text{ fragmento} / Kb \text{ vector recipiente}] \times (6/1)$

1.- Añadir en un eppendorf:

- 1,5 μ L de tampón de reacción de la ligasa (10X).
- El volumen necesario de vector receptor para adicionar 50 ng del mismo.
- El volumen necesario de fragmento a subclonar para tener los ng que hemos calculado con la fórmula anterior.
- 1 μ l de ligasa (10 U/ μ L).
- El volumen de dH₂O necesario para completar 15 μ L.

2.- Realizar tres reacciones control en las que faltará alguno de los componentes anteriores: en una no añadir fragmento, en otra no añadir vector y en la otra, no añadir ligasa.

3.- Incubar a 16°C durante la noche.

4.- Transformar con *E. coli* DH5 α supercompetentes o STBL2 según sea el producto (ver apartado 10). Hacerlo también con las tres reacciones control.

5.- Incubar a 37°C durante la noche. Sólo debe haber colonias en la placa que proviene de la reacción de ligación que contenía todos los elementos referidos en el punto 1.

PCR screening

Con esta técnica se puede conocer si el fragmento de DNA que se ha introducido dentro del vector se ha colocado en la dirección que interesa tras la ligación. Se basa en realizar una reacción de PCR en la que se emplea una pareja de cebadores en la que uno de ellos corresponda al vector y el otro, al fragmento que se ha clonado. Sólo se amplificarán aquellas colonias en las que el inserto esté colocado en el sentido adecuado.

1.- Se hacen crecer las colonias del producto de la ligación en 150 μL LB selectivo (con el correspondiente antibiótico al que el plásmido tenga resistencia) a 37°C 1 h.

2.- Se dispensa en un tubo de PCR:

- 2,5 μL de tampón de reacción de la polimerasa (10X).
- 1 μL de dNTPs 2 mM.
- 2 μL de cada primer a 5 μM .
- 0,5 μL de Taq DNA polimerasa 10 U/ μL .
- 2 μL del cultivo anterior.
- el volumen de dH_2O hasta completar 25 μL .

3.- Se introduce en el aparato de PCR con el programa siguiente:

- Denaturalización: 95°C , 4 min.
- 30 ciclos: Denaturalización: 95°C , 30s.
Hibridación : * T_a , 30-60 s.
Extensión: 72°C , 30 s.
- Extensión final: 72°C , 4 min.

* T_a es la temperatura teórica de hibridación de los oligonucleótidos. Se calcula la temperatura para cada oligonucleótido según el número de cada tipo de bases con la siguiente fórmula: $4(\text{G}+\text{C}) + 2(\text{A}+\text{T})$, y se resta 4 para obtener $^{\circ}\text{C}$.

4.- Se visualizan las colonias positivas cargando 10 μl de la reacción de PCR junto con tampón de carga (6X) a una relación 5:1 en un gel de agarosa al 1%.

5.- De las colonias positivas realizar minipreps de DNA y secuenciarlas para comprobar que la secuencia de la construcción que se ha obtenido es la deseada.

Todos los productos obtenidos en esta investigación fueron analizados en el servicio de secuenciación del CRAG en la Universidad Autónoma de Barcelona.

10.- MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La mutagénesis dirigida introduce mutaciones puntuales que pueden producir cambios de aminoácidos o pequeñas inserciones o deleciones.

Se realizó mediante el kit: QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla CA).

Se usa un DNA superenrollado de doble cadena que lleva el inserto de DNA de interés y dos oligonucleótidos sintéticos que contienen la mutación deseada. Para la amplificación se usa una polimerasa especial, la *PfuTurbo DNA polimerasa*, caracterizada por la alta fidelidad en la replicación del DNA lo que, junto con el bajo número de ciclos de replicación, favorecen una elevada eficiencia de mutación específica con una baja tasa de mutaciones al azar. Además los cebadores no se desplazan de las cadenas de DNA hijas, quedando incluidos en las mismas, y esta incorporación genera copias del plásmido que contienen la mutación deseada. Para eliminar los plásmidos parentales que queden (los cuales tienen genotipo no mutado) y seleccionar sólo los mutados, se trata el producto de la reacción con la enzima *DpnI*, que es una endonucleasa específica que reconoce el DNA metilado y hemimetilado y lo digiere. Como los plásmidos no mutados han sido clonados en *E. coli*, que metila el DNA que posee, este enzima los elimina.

Una vez seleccionados, los plásmidos con el inserto mutado se usan para transformar *E. coli supercompetentes DH5 α* , mediante la técnica del *Heat-shock*. No se puede transformar por electroporación debido a la alta cantidad de sales que contiene el tampón de amplificación usado para la PCR.

Para confirmar la eficiencia de la generación de plásmidos mutados se usa un plásmido de control *pWhitescriptTM* (4,5 Kb). Este plásmido se caracteriza por tener una mutación en el gen de la β -galactosidasa que produce un enzima truncado y no funcional, ya que tiene un cambio de base que provoca un codón de parada.

Las bacterias con el plásmido no metabolizan la galactosa. En placas de medio LB con ampicilina (Amp), suplementado con isopropil-1-thio- β -D- galactopiranosido (IPTG) y con el análogo cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosido (X-gal), al no metabolizar X-gal las colonias bacterianas crecen de color blanco.

En la mutagénesis se realiza una reacción con este plásmido y unos cebadores que restauran el fenotipo normal, lo que permite la síntesis de β -galactosidasa funcional. Así las colonias donde la mutagénesis se haya producido, metabolizarán la X-gal y crecerán de color azul en una placa LB-Amp-IPTG-X-gal.

Materiales adicionales

- Tubos Falcon de 15 ml de polipropileno.
- Tubos Eppendorf de propietileno de 2 mL.
- Tubos de PCR.
- X-gal (5-bromo-4-cloro-2-indoil- β -D-galactopiranosido) al 2% en dimetilformamida
- IPTG 10 mM (isopropil-1-tio- β -D- galactopiranosido) en dH₂O.
- Ampicilina 1000x (100 mM).
- MgCl₂ 1M ó MgSO₄ 1M.
- Glucosa 20% (p/v) esterilizada por filtración (con filtros de 0,22 μ m de diámetro).
- LB líquido: 10 g NaCl, 10 g Triptona, 5 g extracto de Levadura, 800 mL de dH₂O, ajustar pH a 7,0, enrasar hasta 1 L, autoclavar y poner 25 mL en cada placa.
- LB agar 1L:10 g NaCl, 10 g Triptona, 5 g extracto de Levadura, 20 g Agar, 800 mL de dH₂O, ajustar pH a 7,0, enrasar hasta 1 L, autoclavar y poner 25 ml en cada placa.

- LB agar-Ampicilina: 1 L de LB agar Autoclavado, dejar que se enfríe hasta 55°C (más o menos), poner 1 ml de Ampicilina 100 mM (1000x) y poner 25 mL en cada placa.
- Medio TB Bacto-triptona 12 g, extracto de levadura 24 g, glicerol 4 mL, agua destilada 900 mL. Después de esterilizar añadir 100 mL de una solución de KH_2PO_4 170 mM esterilizado en autoclave.
- TBE 5X.
- Agarosa 1 % en TBE 0,5X.
- Tampón de carga para electroforesis en agarosa (6X).
- Bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o colorante SYBR Safe.
- Tampón KCM 5X (KCl 0,5 M, CaCl_2 0,15 M, MgCl_2 0,25 M).
- dH_2O .

Procedimiento:

Diseño de cebadores

1.- Cada uno de los cebadores (tanto directo como reverso) debe contener la mutación deseada e hibridar en la misma secuencia del plásmido, tanto en la cadena + (sentido 5'-3'), como en la cadena - (sentido reverso 3'-5').

2.- Deben tener un tamaño entre 25-45 pares de bases (pb) y la temperatura de fusión (T_M) debe ser mayor o igual que 78°C. Para calcularla debemos aplicar la siguiente fórmula:

- En cambio de nucleótidos: $T_M = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - (\%mismatch)$.
- N: número de nucleótidos del primer.
- En deleciones o inserciones: $T_M = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N$.

3.- La mutación deseada debe estar en el centro de cada primer, con 10–15 bases flanqueantes a cada lado.

4.- Los cebadores deberían tener un mínimo del 40% GC y deberían poseer una o más C's o G's en su extremo 3'.

5.- Los cebadores no deben estar fosforilados en su extremo 5' y deben haber sido purificados por FPLC o PAGC.

6.- Debe mantenerse los cebadores en una concentración en exceso.

Preparación de las placas de LB-Amp-IPTG-X-gal

Hay dos formas de prepararlas

1.- Mezclarlo todo y plaquear:

- LB agar-Amp (aún líquido; las concentraciones están indicadas en el apartado de materiales).
- X-gal (a una concentración final de 80 µg/mL).
- IPTG (a una concentración final de 20 mM).

2.- Añadir, 30 min antes de su uso, a las placas de LB agar-Amp (25 ml más o menos):

- 100 µL IPTG 10 mM.
- 100 µL X-gal 2% (p/v) en dimetilformamida.

No se deben mezclar nunca el IPTG y la X-gal antes de añadirlos a las placas ya que estos productos pueden precipitar.

Reacción de amplificación

1.- Sintetizar los cebadores tal y como se indica en el apartado de diseño de los cebadores. Se resuspenden a una concentración final de 200 µM y se realiza una alícuota de trabajo a 125 µM.

2.- Se preparan las reacciones de amplificación, tanto para las muestras como para el control de mutagénesis.

En la amplificación de cada mutante se recomienda realizar una serie de reacciones en paralelo donde, manteniendo constantes las concentraciones de los reactivos, varíe únicamente la concentración de DNA desde 5 a 50 ng en 50 μ L.

Muestra Problema	Cantidades	Concentración final
dH ₂ O	c.p.u.	
Tampón (10X)	5 μ L	1X
dNTPs	1 μ L	
Oligo 1 (125 μ M)	1 μ L	2,5 μ M
Oligo 2 (125 μ M)	1 μ L	2,5 μ M
ADN(pCADN3.1-HPS)	X μ L	0,1-1 μ M
<i>Pfu Turbo</i> (2,5 U/ μ L)	1 μ L	0,05 U/ μ l
Volumen final	50 μ L	

Control	Cantidades	Concentración Final
dH ₂ O	38,5 μ L	
Tampón (10X)	5 μ L	1X
dNTPs	1 μ L	
Oligo 1 (34-mer) (100 μ M)	1,25 μ L	2,5 μ M
Oligo 2 (34-mer) (100 μ M)	1,25 μ L	2,5 μ M
ADN(<i>pWhiteScripts</i>) (5 ng/ μ L)	2 μ L	(0.2 ng/ μ L)
<i>Pfu Turbo</i> (2,5 U/ μ L)	1 μ L	0,05 U/ μ L
Volumen final	50 μ L	

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

Segmento	Ciclos	T ^a	Tiempo
1	1	95°C	30 s
2	12-18	95°C	30 s
		55°C	1 min
		68°C	2 min/Kb plásmido

El tiempo de extensión se ajusta dependiendo del tamaño del plásmido.

El número de ciclos se ajusta según el tipo de mutación:

- Mutaciones puntuales: 12 ciclos
- Cambio simple de aminoácido: 16 ciclos
- Inserciones/delecciones múltiples de aminoácidos 18 ciclos

Las condiciones de la reacción control son las siguientes:

Segmento	Ciclos	T ^a	Tiempo
1	1	95°C	30 s
2	12	95°C	30 s
		55°C	1 min
		68°C	12 min

3.- Una vez que acabe la reacción, colocar los tubos en hielo 2 min para enfriar la reacción a menos de 37°C.

4.- Analizar 10 µl de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Normalmente se visualizará un solo fragmento, pero aunque no sea así, seguir con el protocolo.

Electroforesis en agarosa

1.- Preparar un gel de agarosa al 1% en TBE (0.5X): Tris 45 mM, ácido bórico 36 mM, EDTA 1,2 mM, ajustar el pH a 8,3 con ácido acético glacial. Conservar a temperatura ambiente.

2.- Dejar solidificar con el peine para que éste forme los pocillos.

3.- Introducirlo en una cubeta de electroforesis horizontal con TBE (0.5X)

4.- Cargar las muestras, mezclándolas previamente con tampón de carga para electroforesis en agarosa (6X): glicerol al 30% y azul de bromofenol al 0,1% en TBE (1X) con una relación 5:1.

5.- Conectar la fuente de electroforesis a 60-120V.

6.- Cuando creamos oportuno según el tamaño del ADN, parar la fuente e introducir el gel en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Visualizar el DNA con un trans-luminador de luz UV.

Digestión del plásmido no mutado

Añadir 1 µL del enzima *Dpn I* (10 U/µL) a cada tubo usando puntas de filtro. Mezclar bien por pipeteo suave. Dar un pulso en la microcentrífuga e incubar 37°C 1 h en agitación.

Transformación Bacteriana

Transformación por electroporación

- Bacterias *E. coli* competentes
- LB líquido
- Placas selectivas de LB-Agar-Antibiótico

- Eppendorf estéril 1,5 mL

Procedimiento:

1.- Programar el aparato de electroporación (BIO-RAD GENE PULSER[®] II) a 2.5 kV, 25 μ F, 200 Ω para cubetas de electroporación de 0,2 cm.

2.- Colocar las cubetas en hielo al menos 5 min antes de utilizarlas.

3.- Descongelar 50 μ l de bacterias competentes (*E. coli*) y colocarlas inmediatamente en hielo.

4.- Preparar 1 μ L de plásmido con concentración 5 -0,5 μ g/ μ L en un eppendorf (se mezcla un máximo de 1/10 partes de DNA en el volumen final de bacterias).

5.- Depositar los 50 μ L de bacterias en el eppendorf donde está el plásmido. Mezclar con la pipeta.

6.- Pasar con cuidado los 51 μ L a la cubeta de electroporación previamente enfriadas. Eliminar las burbujas que hayan podido formarse.

7.- Colocar la cubeta en el electroporador y proceder a electroporar.

8.-Recuperar las bacterias de las cubetas añadiendo 1 mL LB-líquido previamente atemperado a 37°C y pasarlo todo a un eppendorf estéril.

9.- Incubar 1 h a 37°C a 225-250 rpm.

10.- Sembrar 10 μ L de este cultivo líquido en placas de LB-agar-antibiótico.

Transformación mediante choque térmico en células supercompetentes DH5 α

Las células supercompetentes son muy sensibles a los cambios de temperatura. Deben estar a -80°C y cuando se descongelan para alicuotarlas, este proceso se debe realizar gradualmente (en hielo) y con tubos eppendorf de propietileno preenfriados. Pueden entonces alicuotarse y volverse a congelar.

La duración del pulso de calor en el *Heat-Shock* es muy importante para estas bacterias: el óptimo es 45 s, disminuyendo la eficiencia por debajo de los 30 s y por encima de los 45 s.

Procedimiento:

1.- Sacar un tubo de células competentes (DH5 α) y dejar que se descongele en hielo.

2.- Dependiendo de si se procede de miniprep, maxiprep o ligación se utilizarán las siguientes cantidades:

Ligación	Maxi	Mini
20 μL ligación	0,5 μL ADN	2 μL ADN
60 μL dH ₂ O	8 μL dH ₂ O	40 μL LH20 MiliQ
20 μL KCM (10% VF)	2 μL KCM	10 μL KCM
100 μL Bacterias.	10 μL Bacterias	50 μL Bacterias.

3.- Mezclar con golpecitos y dejar 20 min en hielo.

4.- Dejar a temperatura ambiente 10 min.

5.- Añadir 300 μl de LB sin antibiótico.

6.- Incubar durante 1h a 37°C con agitación.

7.- Centrifugar 15 s a 14000 rpm.

8.- Aspirar el sobrenadante y añadir 200 μL de LB fresco, resuspender y sembrar en placas de agar con LB y antibiótico.

9.- Dejar crecer durante la noche a 37°C.

Transformación mediante choque térmico en células supercompetentes STBL2

Un stock de solución pUC19 (0,01 µg/mL) es suministrada con el kit como control para determinar la eficiencia de transformación. Es importante que el DNA experimental esté libre de fenoles, alcoholes, detergentes o proteínas para obtener el máximo de eficiencia en la transformación. Es necesario para esta transformación emplear tubos Falcon de 17 x 100 mm de polipropileno (Falcon® 2059) y todo el procedimiento debe hacerse siempre en hielo.

1.- Suavemente mezclar y alicuotar 100 µL de las células competentes en los tubos de polipropileno.

2.- Recongelar cualquier cantidad no usada de las células manteniéndolas primero en un baño de etanol en hielo seco durante 5 min y luego retornarlas al congelador de -80°C. No es necesario el uso de nitrógeno líquido.

3.- Para determinar la eficiencia de la transformación, agregar 5 µL (50 pg) del DNA control a uno de los tubos que contiene 100 µL de células competentes, mezclar con la pipeta mientras se dispensa, tapar el tubo y mezclar suavemente.

4.- Para DNA proveniente de reacciones de ligación diluir 5 veces en 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 1 mM EDTA. Agregar 1 µL de la dilución a las células, mezclar con la pipeta mientras se dispensa, tapar el tubo y mezclar suavemente.

5.- Incubar en hielo durante 30 min.

6.- Aplicar choque térmico durante 25 s, en baño a 42°C, sin agitación.

7.- Colocar nuevamente en hielo durante 2 min.

8.- Añadir 0.9 ml de medio S.O.C. (suministrado con el kit) a temperatura ambiente.

9.- Para tubos que contengan reacciones de ligación agitar a 30°C durante 90 min a 225 rpm. Para tubos control o con DNA no proveniente de ligación agitar a 225 rpm a 37°C for 60 min.

10.- Diluir la reacción que contenga el control 1:100 con medio S.O.C. (*Super Optimal broth with Catabolic repressor*). Sembrar 100 µl de esta dilución en placas de LB con ampicilina 100 µg/ml. Incubar durante la noche en estufa a 37°C.

11.- Esparcir 100-200 µL del DNA experimental de igual forma que como se describe en el paso 10.

12.- Las células competentes Stbl2™ que hayas sido transformadas con plásmidos deben crecer a 30°C durante la noche en medio TB.

Comprobación de las mutantes

Posterior a transformación, comprobar cuáles de las colonias han incorporado la mutación y cuáles no, picamos 10 colonias de cada placa las hacemos crecer en un cultivo líquido con 5 ml de LB-antibiótico a 37°C durante la noche, a 225-250 rpm.

A la mañana siguiente se realiza:

- Preservación de muestras en glicerol de cada cultivo: 400 µL de cultivo en 800 µl de glicerol estéril al 60% y congelar a -80°C.
- Minipreps con QIAGEN MINIPREP KIT (procedimiento en el apartado 11)
- Una vez las minipreps estén realizadas, comprobar cuáles de ellas tiene la mutación deseada mediante:

- Enzimas de restricción, en los casos que la mutación cree o destruya alguna diana para estas enzimas
- Secuenciación directa del fragmento que contenga la mutación.

Una vez identificadas las minipreps que han incluido el cambio, se secuencia el inserto completo con el fin de comprobar que no se ha introducido otra mutación no deseada por error de la polimerasa.

Una vez secuenciadas realizar maxipreps (**apartado 11.2**).

11.- EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

11.1.- Miniprep

Una miniprep permite la extracción de DNA plasmídico de un cultivo bacteriano. Para ello las células se rompen con un choque alcalino. Es una técnica inicial de purificación y concentración para analizar clones bacterianos durante el proceso de clonaje molecular. Se obtienen de 50 a 100 µg de DNA. Se realiza mediante el kit QIAprep™ Spin Miniprep Kit (*Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA*).

Materiales adicionales:

- LB con Antibiótico
- Tubos de cultivo líquido de bacterias
- Eppendorfs
- TBE (5X)
- Agarosa 1 % en TBE (0.5X)
- Tampón de carga para electroforesis en agarosa (6X)
- Bromuro de etidio (0,5 µg/mL)

Procedimiento:

1.- Picar una colonia e inocularla en 5 ml de LB líquido-Antibiótico (el que corresponda). Incubar durante la noche a 37°C y 225-250 rpm.

2.- De cada cultivo, repartir 3 mL en dos eppendorfs (1,5 mL en cada uno) y centrifugar 13200 rpm durante 1 min.

3.- Eliminar el sobrenadante con cuidado.

4.- Resuspender el pellet de bacterias de uno de los tubos en 125 µl de tampón P1 (al que se la ha añadido previamente RNasa). Pasarlo al otro tubo que contiene el mismo tipo de pellet y añadir otros 125 µL de tampón P1. Resuspenderlo todo de nuevo.

5.- Añadir 250 µl de tampón P2 y mezclarlo cuidadosamente 4-5 veces por inversión.

6.- Agregar 350 µL de tampón N3 y mezclar rápida pero cuidadosamente el tubo 4-5 veces por inversión.

7.- Centrifugar 10 minutos a velocidad máxima.

8.- Traspasar el sobrenadante a una columna QIAprep por decantación o pipeteo.

9.- Centrifugar 60 s a velocidad máxima. Descartar el filtrado.

10.- Lavar la columna añadiéndole 0,5 mL de tampón PB y centrifugarla inmediatamente 60 s a máxima velocidad. Descartar el filtrado.

11.- Añadir a la columna 0,75 mL de tampón PE y centrifugar a velocidad máxima 60 s. Descartar el filtrado y centrifugar de nuevo otros 60 s.

12.- Colocar la columna QIAprep en un eppendor estéril de 1,5 mL.

13.- Eluir el DNA de dos formas alternativas:

- Añadir en el centro de la columna, apoyando la punta de la pipeta pero sin hacer presión sobre la membrana, 50 μ L de tampón EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)

- Añadir, de la forma descrita anteriormente, 50 μ L de dH₂O.

14.- Mantener la columna así 1 min. Centrifugar a máxima velocidad 1 min.

15.- Poner 10 min a 65°C para que el plásmido se resuspenda en dH₂O.

16.- Cuantificar una dilución 1:20 de la miniprep y para calcular su concentración medir su densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro. Para ver el estado de la miniprep, someter 1 μ L de las misma a electroforesis a 60-110 V en agarosa al 1%, por 30 min. Al finalizar la electroforesis, teñimos el gel en bromuro de etidio para visualizar el ADN.

11.2.- Maxiprep

Una maxiprep permite la extracción de DNA plasmídico de un cultivo bacteriano partiendo de un volumen mayor que en la miniprep, de 100 a 200 ml. Se obtienen de 500 a 850 μ g de DNA. Se realiza mediante el kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, EUA).

Materiales adicionales:

- Placas selectivas LB-Agar-Antibiótico.
- LB-Antibiótico.
- Tubos córex de vidrio de 30 mL.
- Ultracentrífuga Sorvall o equivalente.
- Repel-silane ES[®] (Plus-one).
- Lana de vidrio

- Jeringuilla de 20 ml
- Isopropanol
- Etanol 70 %
- Eppendorf estéril 1,5 mL
- TBE (5X)
- Agarosa 1 % en TBE (0,5X)
- Tampón de carga para electroforesis en agarosa (6X)
- Bromuro de etidio (0,5 µg/mL) o colorante SYBR Safe

Procedimiento:

1.- Transformar *E. coli* competentes con el plásmido y hacerlas crecer en césped en una placa de LB agar-selectivo (con el antibiótico específico del plásmido) a 37°C durante la noche.

2.- Preparar 100ml de LB-selectivo líquido y autoclavar (se usará al día siguiente).

3.- Picar una colonia y empezar un cultivo líquido con 5 mL de LB-selectivo. Dejar a 37 ° C alrededor de 8 h y en agitación de intensidad media (≈ 300 rpm).

4.- Autoclavar tubos de centrifuga centrifuga de vidrio, tipo corex, de 30 mL y 250 mL.

5.- Añadir de 100-200 µL del cultivo líquido anterior a 100 mL de LB-selectivo líquido (para plásmidos de “*high copy*”) o a 500 mL (para plásmidos de “*low copy*”). Incubar 37°C durante la noche en agitación (≈ 300 rpm).

6.- Al día siguiente, poner el tampón P3 a 4°C.

7.- Centrifugar el cultivo a 6000xg (o en Multifuge 3 L-B Haeraeus a 4300 rpm), 15 min a 4°C en 2 tubos Falcon de 50 mL (para cada plásmido) o en 1 tubo de centrifuga de vidrio de 250 mL.

8.- Eliminar el sobrenadante con mucho cuidado por inversión. El pellet se puede mantener 24 h a -20°C.

9.- Resuspender el pellet con 10 mL de tampón P1. Mezclar por vorteo o pipetear “*up/down*” para resuspender. Debe resuspenderse muy bien y que no queden grumos.

10.- Añadir 10 mL de tampón P2. Mezclarlo por inversión 4-5 veces. Incubar a temperatura ambiente 5 min.

11.- Pasarlo a tubos de centrifuga corex de 30 mL.

12.- Añadir 10 ml de tampón P3. Rápidamente mezclarlo por inversión 4-5 veces. Incubar en hielo 20 min.

13.- Centrifugar a $\geq 20.000xg$ 30 min a 4°C, mezclando por inversión justo antes de centrifugar.

14.- Equilibrar la columna QIAGEN-tip-500 llenándola con 10 mL de tampón QBT y dejándolo que se filtre por gravedad. Una vez equilibrado, descartar el QBT.

15.- Recuperar el sobrenadante, que es donde se encuentra el DNA plasmídico. Se limpiarán, habiendo dos formas para ello:

- Por filtración en lana de vidrio: mojamos un poco de lana de vidrio en Repel-silane ES[®] (Plus-one) y se introduce en una jeringuilla de 20ml. Se lava 2 veces

con dH₂O (para eliminar el exceso de silane). Se filtra el sobrenadante, recogiendo el filtrado en un tubo Falcon.

- Por centrifugación: se recoge el sobrenadante en un nuevo tubo corex y se centrifuga a $\geq 20.000xg$ 30 min a 4°C, mezclando por inversión justo antes de centrifugar.

16.- Llenar la columna pre-equilibrada con el filtrado o el sobrenadante del paso anterior y dejar que se filtre por gravedad. Descartar el filtrado

17.- Lavar 2 veces el QIAGEN-tip-500 con 30 mL de tampón QC. Descartar el filtrado.

18.- Eluir el DNA plasmídico con 15 mL de tampón QF y recoger el filtrado en un tubo corex de 30 ml. Se puede parar el proceso si mantenemos el eluido a 4°C aunque no se recomienda exceder las 16 h.

19.- Precipitar el DNA plasmídico con 10,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente (0,7 volúmenes), mezclando cuidadosamente por inversión.

20.- Centrifugar a 15000xg 30 min 4°C, marcando previamente en el córex a qué lado se depositará el pellet.

21.- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante por inversión por el lado opuesto a donde se encuentre el pellet. Las últimas gotas eliminarlas con una micropipeta.

22.- Lavar con 5 mL de etanol 70% a temperatura ambiente.

23.- Centrifugar a 15000xg 30 min 4°C, marcando previamente en el córex a qué lado se depositará el pellet.

24.- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante por inversión por el lado opuesto a donde se encuentre el pellet. Las últimas gotas eliminarlas con una micropipeta con mucho cuidado de no llevarse el pellet.

25.- Secar el pellet de 5-10 min a temperatura ambiente y/o bajo un foco de luz.

26.- Resuspender el DNA en 500 μ L de dH₂O ó de TE (1X). Para hacer transformaciones o para congelar a -20°C es mejor resuspender en dH₂O pero para almacenarlo largos periodos de tiempo a -80°C es mejor en TE.

27.- Poner 10 min a 65 °C. Hacer una alícuota a dilución 1:200 y medir la densidad óptica. Calcular así la concentración del plásmido recuperado. Someterlo a electroforesis en un gel de agarosa al 1% para ver en qué estado se encuentra.

12.-EMPAQUETAMIENTO RETROVIRAL EN HEK 293

Se usan vectores retrovirales ectópicos deficientes en la replicación para transferencia de genes en células hematopoyéticas progenitoras.

El virus es producido por una co-transfección transitoria de células 293T con un vector retroviral que expresa el gen de interés y un plásmido gag-pol-env con funciones de empaquetamiento que expresa estas tres proteínas principales del genoma retroviral. Gag es una poliproteína, acrónimo de Antígenos de Grupo, y se refiere a las proteínas del núcleo estructural del retrovirus. Pol se refiere a la transcriptasa reversa, la cual transforma el ARN a ADN, que tiene también actividades de integrasa y RNasaH, Env se refiere a las glicoproteínas de la cubierta, que determinan el tropismo viral.

El vector retroviral varía dependiendo de la aplicación y diseño de construcción. En este estudio hemos usado MSCV 2.2 (Clontech). El plásmido de envoltura usado es el estándar EcoPack (Clontech).

Transfección y recuperación del sobrenadante viral

Materiales:

- Línea celular HEK 293
- DMEM 1X
- Solución penicilina/estreptomicina 10X
- FBS 10%
- Reactivo de transfección *TransIT-LT1*
- Placas de cultivo de 6 cm
- Jeringas y filtro 0,22 μ m

Procedimiento:

1.- La tarde anterior a la transformación, sembrar células HEK 293 a $3-5 \cdot 10^6$ por placa.

2.-La siguiente tarde revisar la confluencia ya que deberían estar entre 70-90%.

- Preparar mezcla de transfección: 90 μ L reactivo *TransIT-LT1* y 3,0 ml medio libre de suero.
- Esperar 5 - 15 min.
- Agregar: 10 μ g plásmido *Ecopack* y 20 μ g vector retroviral *MSCV 2.2*.
- Incubar durante 30 min.
- Agregar 31 ml de medio completo.
- Aspirar completamente el medio de cada placa y añadir 4 ml por placa de 6 cm.

3.- La siguiente mañana reemplazar el medio con 1,15 ml de medio de cultivo completo.

4.- Al cabo de 24 - 26 h recuperar el virus contenido en el sobrenadante aspirando con una jeringa de 10 mL y filtrar a través de un filtro 0,22 μ m. Congelar

en alícuotas de 200 μ L en nitrógeno líquido. El sobrenadante puede guardarse a -80°.

NOTA: La viabilidad celular y la titulación viral decrecen después de 26 h. Es posible realizar una segunda recolección 24 h más tarde, aunque se obtiene menor rendimiento.

13.- TRANSFECCIÓN CON VECTORES ADENOVIRALES

Para estudiar el efecto de las mutaciones que alteren el procesamiento de APP, como es el caso de las mutaciones de PSEN1 en modelos celulares, se coexpresa APP^{swe}. Esto facilita la detección de cambios en los niveles de generación de A β 42/A β 40 inducidos por las mutaciones problema. Se usaron vectores adenovirales para expresar la proteína APP^{swe} y la proteína no mutada APP^{wt}. Un vector control β -gal expresaba la proteína β -galactosidasa como control de transducción. Los plásmidos correspondientes se obtuvieron de lisados de células HEK 293 infectadas con adenovirus de β gal, APP^{wt}, y APP^{swe} que se habían mantenido congelados a -80°C (lisados cedidos por Bryce Sopher, Universidad de Kentucky, Lexington USA). El adenovirus de β gal permite comprobar la eficiencia de transfección por la actividad β galactosidasa.

13.1.- Titulación de partículas adenovirales en HEK 293

Los lisados se sometieron a dos ciclos de descongelación/congelación para completar la lisis de todas las células. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y se alicuotaron los sobrenadantes a -80°C (descongelaciones repetidas causan pérdida de actividad).

Para la titulación se infectaron HEK 293 en placas de 96 pozos con diferentes diluciones de los lisados, desde 10^{-4} a 10^{-14} . Durante 10 días se controló la aparición de calvas, indicadoras de lisis celular, para así calcular las unidades formadoras de placa (PFU). En todas las placas de titulación se destinaron pozos

control sin virus para evaluar el crecimiento y muerte celular.

Todas las titulaciones se hicieron por duplicado y se empleó como valor de PFU el promedio de ambas placas:

13.2.- Transfección con vectores adenovirales en MEF

Procedimiento:

1.- Sembrar los pozos a infectar para que estén aproximadamente al 70% de confluencia al día siguiente, en que se realizará la infección.

2.- Colocar las alícuotas de lisados adenovirales en hielo.

3.- Calcular el valor de multiplicidad de infección (MOI) en cada pozo de acuerdo a la titulación previa del lisado y a las células sembradas.

Para deducir la cantidad de virus que se necesita para determinado MOI se usa la siguiente fórmula: $\text{Volumen de lisado viral/MOI} = \text{número de células} \times \text{MOI/PFU}$.

4.- Ejecutar las diluciones respectivas en tubos pequeños empleando el mismo medio.

5.- Aspirar el medio de cultivo de las placas y agregar las diluciones según el MOI respectivo disueltas en el medio respectivo.

6.- Colocar las placas ya infectadas a incubar entre 2 a 6 h.

7.- Aspirar el medio y añadir medio de cultivo nuevo.

8.- Colocar las placas nuevamente a incubar durante 24 h.

13.3.- Cuantificación de la transfección en MEF por detección de β galactosidasa

Para evaluar la eficacia de la transfección con los vectores adenovirales en células MEF, se realizaron pruebas control en MEFwt. Se midió la actividad enzimática de β galactosidasa mediante el uso del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal):

Materiales y procedimiento:

- Preparación del sustrato

Solución madre de X-gal (40X)

40 mg/ml en dimetilformamida

Se conserva protegido de la luz en contenedor de vidrio a -20°C .

Tampón de reacción X-gal

35 mM ferrocianido de potasio

35 mM ferricianido de potasio

2 mM MgCl_2

0.02% Nonidet P-40 (NP-40) (diluido desde una solución al 10%)

0.01% deoxicolato sódico (diluido desde una solución al 10%) en PBS

Se conserva a temperatura ambiente protegido de la luz.

- Sembrar las células MEFwt a 1×10^5 .
- Al día siguiente retirar el medio, y fijar con gluteraldehído al 0,5% en PBS e incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Realizar 3 lavados suaves con PBS 1X los 2 primeros rápidamente y el último con incubación durante 5 min.
- Añadir el sustrato X-gal 1X, diluido en tampón de reacción:
- Incubar durante la noche a 37°C .
- Visualizar al microscopio la reacción en color azul y guardar a 4°C .

14.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

La técnica de Western blot permite la detección de proteínas específicas de lisados biológicos o soluciones proteicas, mediante la separación por electroforesis junto a un estándar de pesos moleculares, su transferencia a membranas (“blotting”) y su posterior detección tras la unión a los anticuerpos correspondientes. Se obtienen resultados semicuantitativos (referidos a una proteína control).

Soluciones:

Tampón Electrolito: Tris base 0.025M + glicina 0.192 M+SDS 0.1% (RT):

Stock = 10X → pasar a 1x para utilizar en western (900 mL H₂O + 100 mL tampón 10x)

60,6 g Tris base

288,2 g Glicina (mw=75.07) (SIGMA G-4392, 500g)

20 g SDS (o bien 100 mL solución al 20% SDS)

2 L H₂O

Tampón de Transferencia: Tris base 0.025M + glicina 0.192 M + metanol 20% (conservar a 4°C):

Stock = 5X → poner 3 L dH₂O + 1 L metanol + 1 L transfer 5x

15,14 g Tris base

72 g glicina

4 L dH₂O

1 L metanol

Tampón T-TBS

1 L tampón TBS 1X: diluir 10 veces el TBS 10X

1 mL Tween 20 con punta cortada

Solución 1: Tris base 0.75M + SDS 0.2% (RT)

45,4 g Tris base (mw 121,14) (BIO-RAD 161-0719, 1Kg)

500 mL H₂O. Ajustar el pH a 8,8 con HCl fumante

1 g SDS (FLUKA 71729, 500g)

Solución 3: Tris base 0.25M + SDS 0.2% (RT)

15.14g Tris base

500 mL H₂O. Ajustar pH 6,8 con HCl 37%

1 g SDS

Persulfato amónico 13% (PSA) (a 4°C)

6,5 g persulfato amónico (BIO-RAD 161-700, 10 g)

50 mL H₂O

TEMED (RT)

Se utiliza directamente (BIO-RAD 161-0800, 5 mL)

Tampón de carga 3X: (se guarda en alícuotas de 0,5 mL a -20°C)

1,5 g SDS

30 mg DTT (SIGMA D-9779, 1g)

10 mg BPB

12,8 mL H₂O.

Una vez disueltos los productos, añadir:

1,2 mL NaPi 0.5 M, pH 7 (0,5 M Na₂HPO₄ + 0,5 M NaH₂PO₄) + 6 mL glicerol (MERCK 1.04094.1000)

Tampón TBS: Tris 0,02 M + NaCl 0,150 M (a 4°C)

Se prepara 10X

24,2 g Tris base

Ajustar el pH a 7,5

87,6 g NaCl

1 L H₂O

Tampón de stripping : Tris-HCL 62,5 mM + SDS 2% + β-mercaptoetanol 100 mM

Procedimiento:

Preparación de las muestras

Homogenizar los tejidos o cultivos celulares con tampón de lisis RIPA (10 mM PBS, 1% IGEPAL, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% dodecil sulfato sódico) suplementado en el momento de uso con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche), e inhibidores de fosfatasa (5 mM ortovanadato sódico y 5 mM

fluoruro sódico). Se añade 150 μL de la solución de lisis por cada 10 mg de tejido o por cada frasco de cultivo T75.

- Descongelar las muestras y sonicar en 4 rondas de 5 s para romper los núcleos (ciclo 1, amplitud 80). Los tubos con las muestras deben estar siempre sumergidos en hielo. Centrifugar a 12000 $\times g$, 20 min, a 4°C. Recoger el sobrenadante y conservarlo alicuotado a -20°C.

Determinación del contenido total de proteínas

- Cuantificar la proteína total de las muestras homogenizadas por el método de Bradford. Preparar eppendorf para cada muestra y añadir 795 μL de agua y 5 μL de muestra (volumen final de 800 μL).
- Preparar la recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) (solución stock BSA de 0,2 mg/mL, conservada a -20°C).

<i>Recta patrón BSA Bradford</i>		
μg BSA	μL BSA stock	μL agua
0	0	800
1	5	795
2	10	790
4	20	780
8	40	760
16	80	720
20	100	700
30	150	650

- Añadir 200 μL del reactivo Bradford a todos los eppendorfs preparados (muestra y patrón), se homogenizan con vórtex y en placa de 96 pocillos se añaden 200 μL /pocillo por triplicado.
- Se determinan las absorbancias y se calculan las concentraciones de proteína de cada muestra ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a partir de la recta patrón en cada placa.

Preparación de las muestras a cargar

- Calcular el volumen de muestra correspondiente a la cantidad que queremos cargar de proteína, usualmente entre 20-60 μg según sea la proteína, en función de la concentración obtenida en el lisado inicial. El tampón de carga se añade preparado a una concentración 3X, y se igualan todos los volúmenes con dH_2O para dar la solución final de tampón fosfato 0,5 M, 20% glicerina, 4% dodecil fosfato sódico (SDS), 10% ditioneitol (DTT) y 0,05% azul de bromofenol. Se mantendrá la misma cantidad de proteína total y el mismo volumen final para todas las muestras de cada ensayo.
- Se descongelan en hielo las muestras a analizar y se preparan para el western con los volúmenes ya calculados de muestra, tampón de carga y dH_2O .
 - Hervir las muestras preparadas durante 5 min en el termoblock a 100°C para desnaturalizar las proteínas. Durante este tiempo se prepara el tampón electrolito a partir de una solución 10X (0,25 mM Tris-base, 1,92 mM glicina, 1% SDS), diluyendo con dH_2O .

Electroforesis en gel

Preparación de los soportes

- En primer lugar se lavan los cristales con etanol y después con dH_2O .
- Colocar el cristal más pequeño sobre el grande que contiene los espaciadores (sándwich de placas de vidrio). Se monta en el armazón correspondiente. Se han utilizado geles de 1,5 mm de espesor y 15 pocillos o de 1mm de espesor y 10 pocillos.

Preparación del gel separador

- El gel se prepara con acrilamida en porcentajes adecuado al peso molecular de las proteínas a separar (ver tabla), en un tubo Falcon de 50 mL.

Percent acrylamide (resolving gel)	Size range transferred (~100% efficiency)
5–7	29–150 kD
8–10	14–66 kD
13–15	<36 kD
18–20	<20 kD

- Se vortea y se añade TEMED y PSA en el último momento antes de se añaden justo antes de añadir la solución entre los cristales porque polimerizan rápido.

<i>Gel separador (acrilamida)</i>						
x1 gel	6 %	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Solución 1 (RT)	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Acrilamida 30% (4°C)	2 mL	2,4 mL	2,8 mL	3,4 mL	4 mL	5 mL
dH ₂ O (RT)	3 mL	2,6 mL	2,2 mL	1,6 mL	1 mL	0 mL
TEMED (4°C)	14 µL	14 µL	14 µL	14 µL	14 µL	14 µL
PSA 3% (4°C)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Nota: RT= temperatura ambiente

- Tirar la solución de acrilamida preparada entre los dos cristales hasta la marca (donde lo verde). Un residuo de la solución en el tubo permite visualizar la polimerización, para añadir posteriormente el gel concentrador (stacking).
- Una vez se ha añadido el gel separador, se añade por encima isopropanol, aproximadamente 200 µL, para evitar la tensión superficial, las burbujas y también conseguir que el gel quede recto.

Preparación del gel concentrador

- Se prepara el gel stacking en un Falcon de 15 mL y se vortea. De nuevo, TEMED y el PSA se añaden justo antes de añadir el gel a los cristales porque polimerizan rápido.

<i>Stacking gel (concentrador)</i>	
Acrilamida(4°C)	0,55 mL
Solución 3	2 mL
dH ₂ O (RT)	1,5 mL
TEMED (4°C)	10 µL
PSA 3% (4°C)	20 µL

- Cuando el gel separador ya ha polimerizado se saca por decantación el isopropanol (restos eliminar con papel filtro). Se añaden el TEMED y el PSA al stacking y se tira sobre el primer gel.
- Poner el peine inmediatamente y dejar polimerizar (2 min).

Preparación del soporte de electroforesis

- Sacar el sándwich de placas del armazón verde, y Colocar el sándwich con el gel en el armazón de electrodos (verde y blanco) con el cristal más pequeño de cara al interior y el más grande hacia a fuera.
- Deslizar el armazón de electrodos cargado con el sándwich de placas en el marco de sujeción y empujar bien hacia abajo el armazón de electrodos mientras se bloquean las dos palancas del marco de sujeción.
- Introducir el marco de sujeción en la cubeta de electroforesis (rojo con rojo y negro con negro).
- Llenar la cubeta, comenzando por el centro con tampón electrolito 1x y finalmente quitar el peine.

Carga de las muestras

- Comprobar que no ha quedado acrilamida dentro de los pocillos del sándwich porque si no se podría perder muestra al cargarla (para sacarla se usa la pipeta de carga y se añade buffer de electroforesis a los pocillos).
- Para cargar usar la jeringa Hamilton o puntas MultiFlex Roud Tips.

- En primer lugar se cargan 8 μL del marcador de pesos moleculares y después el volumen previamente calculado para cada una de las muestras, en los pocillos correspondientes.

Electroforesis

- Se coloca la tapa a la cubeta de electroforesis asegurando las conexiones: rojo con rojo y negro con negro.
- Conectar la fuente.
- Correr el gel a X Voltios durante X tiempo (depende del anticuerpo) hasta que el BPB llegue al final pero sin que se salga del gel. El paso de corriente se comprueba por las burbujas que se generan.

Transferencia

Preparación de la membrana

- Cortar la membrana de polivinilidene difluoride (PVDF) (Imobilon TM-P, Millipore Corp.) a la medida del gel, y hacer un corte en esquina arriba-derecha para identificar posición de las muestras.
- Preparar dos bandejas pequeñas.
- Humedecer la membrana PVDF en metanol, para activarla, durante 30 s en agitación.
- Equilibrar membrana con buffer transferencia durante 2 min para hidratarla (después del metanol).

Preparación de la transferencia

- Preparar dos bandejas grandes para preparar el casete de transferencia.
- Añadir tampón de transferencia (ya preparado, en frío) y poner los cristales con el gel. Se desenganchan los cristales del gel con la cuña y se desecha la parte del gel con los pocillos y el frente. Con el tampón de transferencia se equilibra el gel.

- Llenarla con tampón de transferencia y poner 4 papeles Whatman y 2 esponjas por cada gel.
- Se monta el casete de transferencia sobre la parte negra en la bandeja donde se ha estado humedeciendo:
 - Negro
 - Esponja
 - Papel Whatman
 - Gel (como se ha cargado - con el loader a la izquierda)
 - Membrana de PVDF 0,45 μ m (girada - corte a la izquierda)
 - Papel Whatman
 - Esponja
 - Blanco
- Se cierra el casete de transferencia y se mete en la cubeta de transferencia según los electrodos (pestaña blanca hacia arriba), ya que las proteínas están cargadas negativamente y migrarán hacia el polo positivo (rojo) de la unidad de transferencia (negro con negro y rojo con rojo). Asegurarse de que el casete se ha insertado con la membrana situada hacia el polo positivo (rojo) y los geles hacia el negativo (negro).
- Añadir tampón de transferencia hasta marca blotting, poner en el fondo de la cubeta una pastilla de agitación y en el otro lado un bloque de hielo. Hacer transferencia en frío y con agitación durante 1 h a 100 V. Se puede hacer por amperaje 1:30 h a 400 mA (0'4 A), ya que de este modo es constante.

Tinción con Ponceau

La tinción de la membrana con rojo Ponceau es opcional, pero permite visualizar la transferencia de proteínas totales. Se activa la membrana en metanol durante 3 min. Lavar en PBS 2x10 min. Incubar 4 min en rojo Ponceau hasta que la membrana esté completamente teñida. Lavar en agua hasta que se puedan ver las bandas. Lavar en PBS 2x10 min. Lavar en T-TBS.

DetECCIÓN INMUNOLÓGICA

Bloqueo

- Al finalizar la transferencia se desmonta el casete y se activa la membrana con metanol durante 3 min en una cubeta y en agitación.
- Realizar 3 lavados de 5 min con T-TBS en agitación (para equilibrar), y preparar solución de bloqueo (preparar solución fresca cada vez).
- Solución de bloqueo según la proteína a detectar T-TBS con 5% de leche en polvo en proteínas no fosforiladas, y T-TBS con 5% BSA en proteínas fosforiladas.
- Incubar membrana durante 1 h con la solución de bloqueo y en agitación.
- Realizar 3 lavados de 5 min con T-TBS para eliminar restos de leche.

Anticuerpo primario

- Preparar la solución de anticuerpo primario a la concentración adecuada en la solución de bloqueo que se ha utilizado.
- Introducir la membrana en el tubo Falcon mediante pinzas, colocando la cara que estuvo en contacto con el gel (dónde se transfirieron las proteínas) hacia el interior del tubo, para estar en contacto con el anticuerpo. Mirar que no queden burbujas.
- Incubar la membrana a 4°C durante la noche, en agitador de tipo roller.
- Al día siguiente sacar la membrana del Falcon y realizar 3 lavados con T-TBS durante 10 min en agitación para eliminar el exceso de anticuerpo.
- Añadir 5 µL (1:1000) de azida sódica 16% al Falcon que contiene el anticuerpo primario para poder conservar en nevera. Se prepara concentrada (16 g /100 mL dH₂O).

Anticuerpo Secundario

- Durante los lavados se prepara la solución de incubación del anticuerpo secundario (ver tabla) en un tubo Falcon de 50 mL al que añadimos 5 mL de la solución de bloqueo (T-TBS + 5% leche/BSA) que se preparó el día anterior (dura dos días en la nevera).

<i>Anticuerpo secundario</i>	<i>Dilución de trabajo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti- Mouse Ig Peroxidase Linked antibody	1:2000	Sigma Chemical
Anti- rabbit IgG, Horseradish Peroxidase Linked whol antibody	1:2000 (2,5 μ L en 5 mL)	Sigma Chemical
Anti-rabbit IgG Peroxidase- Linked antibody	1:5000 (1 μ L en 5 mL)	Amersham, GE Healthcare, NA934V

- Incubar la membrana durante 1 h a temperatura ambiente en el agitador roller.
- Realizar 3 lavados de 5 min en T-TBS a temperatura ambiente en agitación para eliminar el exceso de anticuerpo.

Revelado

El proceso de revelado se realiza por detección quimioluminiscente la cual requiere la incubación de la membrana con un sustrato, que emitirá luminiscencia al ser expuesto al reportador que trae unido el anticuerpo secundario.

La luz emitida es captada por una película fotográfica o, más recientemente, por cámaras CCD, que toman una imagen digital del Western blot. Para ello se utilizó el equipo Versadoc.

Se analiza la imagen por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantifica el resultado en términos de densidad óptica. Esta cuantificación se realizó con el programa Quantity One permite realizar análisis más profundos si se aplican ciertos estándares, como la obtención del peso molecular.

Conservación de la membrana

Guardar o incubar de nuevo

- Al finalizar la detección se lava la membrana con T-TBS (3 lavados de 5 min).
- La membrana posteriormente se puede incubar con otro anticuerpo primario o bien inactivarla con metanol durante 1 min en agitación y dejarla secar sobre papel de filtro para guardarla a 4°C hasta que vuelva a usarse, entre dos papeles Whatman y envuelta en papel de aluminio hasta su próximo uso.

Stripping de la membrana

- Si la membrana estaba seca, primero hay que activarla 1 min en metanol y lavar con T-TBS durante 10 min.
- Incubar la membrana con el tampón de stripping dentro de un recipiente hermético en un baño a 50°C durante 30 min.
- Lavar con T-TBS 3x 10 min o 2x 15 min a RT con agitación.
- Bloqueo e incubación con el correspondiente anticuerpo primario.

15.- DETECCIÓN DE PROTEINAS OXIDADAS POR OXYBLOT

El estrés oxidativo modifica la actividad de las proteínas y las hace más susceptibles a la degradación. Los radicales libres derivados del O₂ afectan a las proteínas modificando algunos aminoácidos, mediante la formación de puentes disulfuro en cisteína, o introduciendo grupos carbonilo (aldehídos y cetonas).

Estos grupos carbonilo se pueden detectar por Western blotting. Al derivatizar las muestras con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), los grupos carbonilos quedan

marcados con 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP). Después de la electroforesis y transferencia, las proteínas carboniladas se detectarán con anticuerpos específicos contra DNP. Se ha usado el kit de detección de oxidación proteica: OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Millipore).

Procedimiento

Excepto por la derivatización de las muestras, se procede de la misma manera que en el apartado anterior en donde se explica el proceso general del Western Blot.

Proceso de derivatización

Para la derivatización de las muestras se utilizan los reactivos presentes en el kit OxyBlot, así como el protocolo aconsejado por el fabricante.

1.- En tubos eppendorfs de 0,75 µL: 5 µL total de solución (20 µg de proteínas + dH₂O). Alguna muestra se prepara por duplicado para tener control negativo.

2.- Denaturalizar todas las muestras añadiendo 5 µL de SDS 12%.

3.- Derivatizar las muestras con: 10 µL de DNPH a cada muestra, y 10 µL de solución de derivatización control a los controles negativos.

4.- Incubar a temperatura ambiente durante 15 min (no pasar de 30 min).

5.- Añadir 7,5 µL de la solución de neutralización.

6.- Añadir 1-1,5 µL de 2-mercaptoetanol.

Una vez derivatizadas las muestras se carga el gel de poliacrilamida y se sigue con el procedimiento de un Western blotting normal, como se indica en el punto anterior.

Marcaje y revelado

1.- Tras la transferencia las membranas se incuban 60 min a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 1% BSA en PBS con Tween-20 (PBS-T, 0,1% Tween-20 (v/v) en PBS).

2.- Se realizan 3 lavados de 5 min con 10 mL de PBS-T

3.- Incubación con anticuerpo primario (1:150 diluido en 1% BSA/PBS-T)

- Opción 1: durante 1 h a temperatura ambiente.

- Opción 2: durante la noche a 4°C. (Ambos casos en agitación).

4.- Lavados con PBS-T (a temperatura ambiente)

- Enjuagar dos veces.

- Lavar durante 15 min.

- Lavar dos veces durante 5 min.

5.- Incubar las membranas durante 60 min con el anticuerpo secundario en una solución de 1% BSA/PBS-T con una dilución del secundario de 1:300.

6.- Lavados con PBS-T.

- Enjuagar dos veces.

- Lavar durante 15 min, (a temperatura ambiente).

7.- Revelado como se explica en el apartado anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO 1:

ESTUDIO DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LAS ALTERACIONES
MITOCONDRIALES EN CULTIVOS DE ASTROCITOS SENESCENTES
SAMP8. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON SUERO DE RESTRICCIÓN
CALÓRICA.

Como primer objetivo se estudió el modelo celular de astrocitos senescentes de ratones SAMP8. Se caracterizó el estado de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial de cultivos primarios de astrocitos, con el objeto de comprobar su validez e interés como modelo *in vitro* de senescencia y envejecimiento cerebral patológico. Como astrocitos control se utilizaron cultivos de astrocitos de ratones SAMR1.

Para completar la caracterización se analizó la capacidad de respuesta a un tratamiento de la restricción calórica (CR), con conocidos efectos protectores contra patologías asociadas al envejecimiento cerebral y sistémico. Para realizar el tratamiento *in vitro* se utilizó suero de ratas sometidas a restricción calórica durante 6 meses, con una disminución del 30% de su dieta diaria y una pérdida del 20% de peso corporal. El suero para el tratamiento control se obtuvo paralelamente de ratas alimentadas *ad libitum* (AL).

Se realizaron ensayos funcionales y también análisis de los extractos celulares. En todos los casos, los experimentos se realizaron en 4-6 cultivos independientes. Se muestran los resultados como media \pm ESM. Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA seguida del test de Bonferroni. Entre las imágenes microscópicas obtenidas se seleccionaron las más representativas.

1. RESULTADOS

1.1.- La restricción calórica disminuyó la generación de radicales libres de oxígeno

El estrés oxidativo en los cultivos primarios de astrocitos SAMP8 ha sido cuantificado mediante evaluación de la actividad oxidativa intracelular empleando diacetato de 2',7'-Diclorofluorescina (DCFH-DA) que mide la generación de ROS.

En primer lugar se analizaron los niveles basales de ROS en cultivos SAMR1 y SAMP8 en condiciones basales y después de una lesión con peróxido de hidrógeno 500 μ M, durante 24 h. El mismo experimento se repitió con un tratamiento previo de suero de restricción calórica al 10% durante 48 h.

Se ha encontrado que los SAMP8 son más sensibles a la formación de radicales peróxidos y por lo tanto tienen un mayor grado de estrés oxidativo. Los astrocitos SAMP8 mostraron mayores niveles de ROS que las SAMR1 (Fig. 9). Las diferencias entre los dos cultivos fueron más bajas después de la lesión oxidativa causada por peróxido de hidrógeno, que aumentó en gran medida la generación de ROS como fue probado por la fluorescencia de las moléculas de DCF generadas (ANOVA indicó un efecto de la cepa $F(1,63) = 6,412$, $p = 0,0138$; $F(1,63)$ y peróxido de hidrógeno = 98,87, $p < 0,0001$).

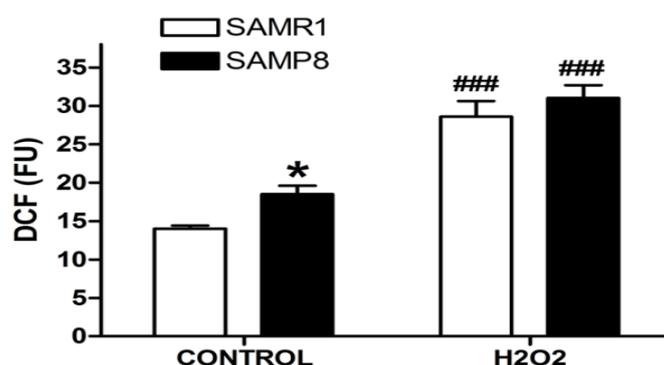


Figura 9. Estrés oxidativo en astrocitos SAMP8. Los astrocitos SAMP8 resultaron más sensibles que los SAMR1 a la formación de radicales peróxidos y por lo tanto tienen un mayor grado de estrés oxidativo, indicado por la técnica de DCFH-DA. El tratamiento de peróxido de hidrógeno 24 h, incrementó la generación de DCF en ambos cultivos. FU, unidades de fluorescencia. Estadística: * $p < 0,05$ comparado con SAMR1, ### $p < 0,001$ comparado con el tratamiento control.

CR redujo la generación de ROS en los astrocitos SAMR1 tratados con peróxido de hidrógeno (Fig. 10), mientras que los efectos protectores de CR en SAMP8 fueron mayores en condiciones basales (ANOVA indicó la importancia de la cepa en las condiciones de control y de peróxido de hidrógeno, $F(1,42) = 11,24$,

$p = 0,0017$ y $F(1,51) = 6,269$, $p = 0,0155$, respectivamente, y un efecto de tratamiento CR contra peróxido de hidrógeno, $F(1,51) = 6,072$, $p = 0,0171$).

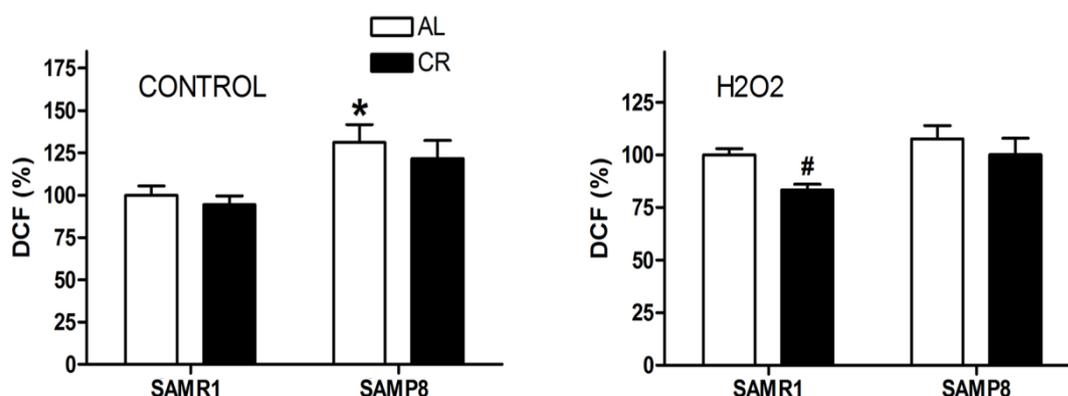


Figura 10. Efecto del tratamiento de restricción calórica sobre el estrés oxidativo en astrocitos **SAMP8**. Los astrocitos **SAMP8** presentaron una tendencia a la reducción de generación de ROS. Los astrocitos **SAMR1** sometidos a lesión con peróxido de hidrógeno redujeron significativamente la producción de ROS ante el tratamiento con CR. Estadística: * $p < 0,05$ comparado con **SAMR1**, # $p < 0,01$ comparado con el tratamiento control.

1.2.- La restricción calórica disminuyó la carbonilación de proteínas

La presencia de proteínas oxidadas fue significativamente mayor en los astrocitos **SAMP8**, como se muestra por el análisis de grupos carbonilo (Fig. 11). Los niveles de proteínas oxidadas en **SAMP8** estaban cerca de los valores de **SAMR1** después del tratamiento con CR (ANOVA indicó significación de cepa, $F(1,32) = 6,729$, $p = 0,0142$).

1.3.- La restricción calórica aumento la defensa antioxidante

Los niveles del enzima antioxidante mitocondrial aconitasa 2 mostraron una tendencia a disminuir en los astrocitos **SAMP8** y un aumento significativo después del tratamiento con CR (Fig. 12). El aumento de niveles enzimáticos inducido por CR no se observó en los astrocitos de la cepa control **SAMR1** (ANOVA indicó una interacción de cepa por tratamiento, $F(1,22) = 5,975$, $p = 0,230$).

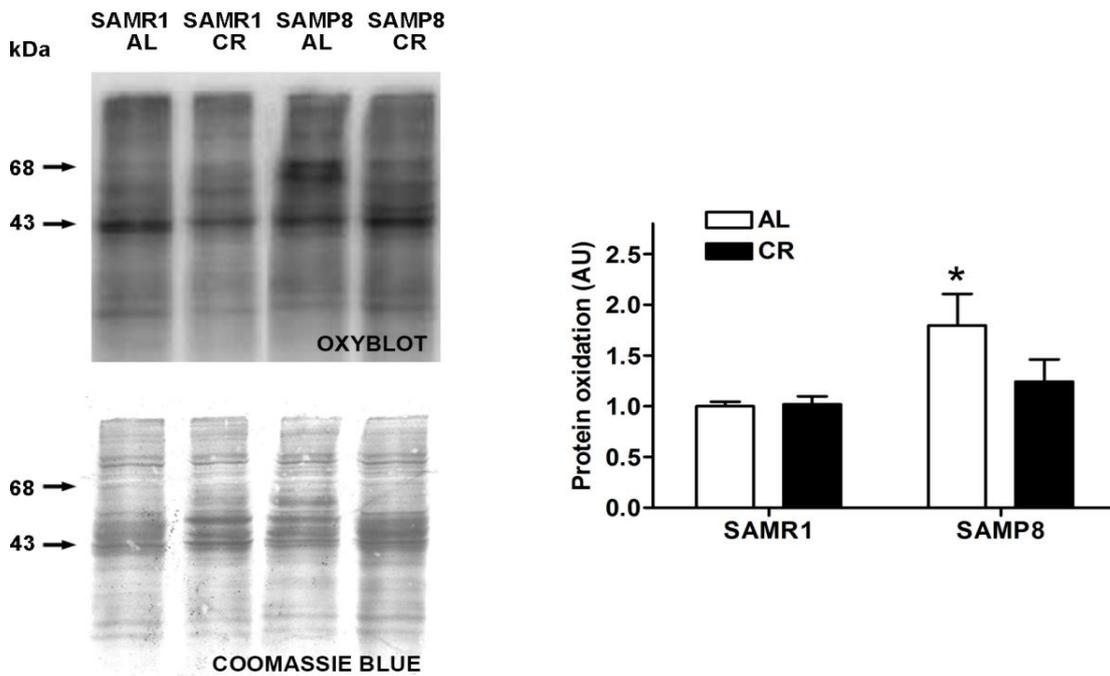


Figura 11. Presencia de proteína carboniladas posterior al tratamiento con suero de restricción calórica: SAMP8 presentó una oxidación proteica significativamente mayor que SAMR1 con una tendencia a la disminución de dicha oxidación posterior al tratamiento con suero de restricción calórica. Se muestra una membrana de Oxyblot representativa y la correspondiente tinción de proteínas totales con Coomassie blue, que se usó para normalizar los resultados en unidades arbitrarias (AU). Estadística: * $p < 0.05$ comparado con SAMR1.

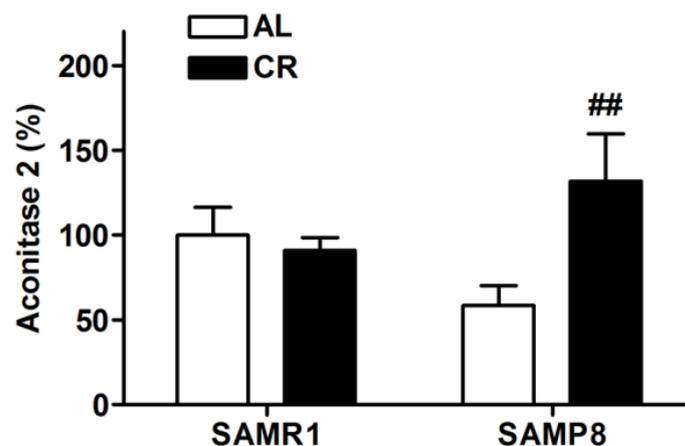


Figura 12. Niveles del enzima antioxidante mitocondrial aconitasa 2. SAMP8 mostró una tendencia a niveles disminuidos de aconitasa 2 y un aumento significativo después del tratamiento con CR Estadística: ## $p < 0.005$ comparado con el tratamiento control.

1.4.- La restricción calórica no protegió de la disminución de potencial de membrana mitocondrial

Para el estudio de la función mitocondrial se han evaluado los cambios basales del potencial de membrana mitocondrial (PMM) mediante la utilización de rodamina 123 y también de TMRM/NAO.

Ha resultado que la captación de rodamina se encuentra disminuida significativamente en los SAMP8 en comparación con el control SAMR1, lo que indica una disminución del PMM (Fig. 13).

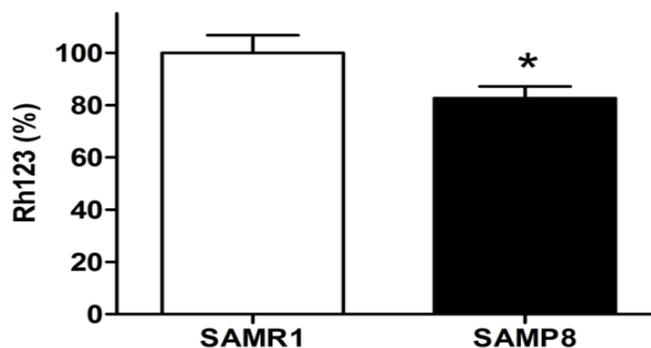


Figura 13. Disminución del potencial de membrana mitocondrial en SAMP8. La captación de rodamina 123 resultó significativamente disminuida en los astrocitos SAMP8 en comparación con los SAMR1. Estadística: * $p < 0.05$ comparado con SAMR1.

SAMP8 también mostró una disminución de PMM en comparación con SAMR1, empleando la técnica de TMRM / NAO (Fig. 14). Esta diferencia no se ha mejorado por CR (ANOVA indicó un efecto de la cepa $F(1,18) = 15,20$, $p = 0,0011$, y ningún efecto significativo del tratamiento CR).

Además, los astrocitos SAMP8 tienen severas deficiencias del complejo respiratorio III como se probó mediante el uso del inhibidor selectivo de este complejo, la antimicina A (Fig. 15).

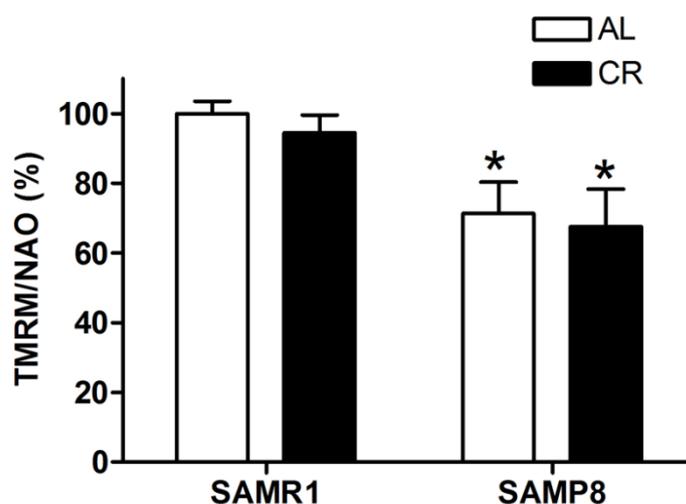


Figura 14. La disminución del potencial de membrana mitocondrial en SAMP8 no se protegió con restricción calórica. La captación de TMRM/NAO resultó significativamente disminuida en los astrocitos SAMP8 en comparación con los SAMR1 sin mejora después del tratamiento con CR. Estadística: * $p < 0.05$ comparado con SAMR1.

En efecto, la aplicación de los inhibidores selectivos de los complejos mitocondriales I (rotenona), II (TFA), IV (azida sódica), V (oligomicina), y el desacoplador FCCP indujeron una liberación de la rodamina 123 retenida, tras incubación previa, similar en astrocitos SAMR1 y SAMP8. No fue así con el uso de antimicina A, que indujo una pérdida de potencial significativamente mayor en SAMP8. Esto demuestra que los astrocitos SAMP8 son más sensibles a antimicina A y a la disfunción del complejo III.

CR no protegió SAMP8 de la sensibilidad a antimicina A (resultados no mostrados).

1.5.- La restricción calórica no modificó la masa mitocondrial

El NAO como indicativo de la masa mitocondrial no mostró cambios significativos entre SAMR1 y SAMP8, ni con el tratamiento con CR (Fig. 16).

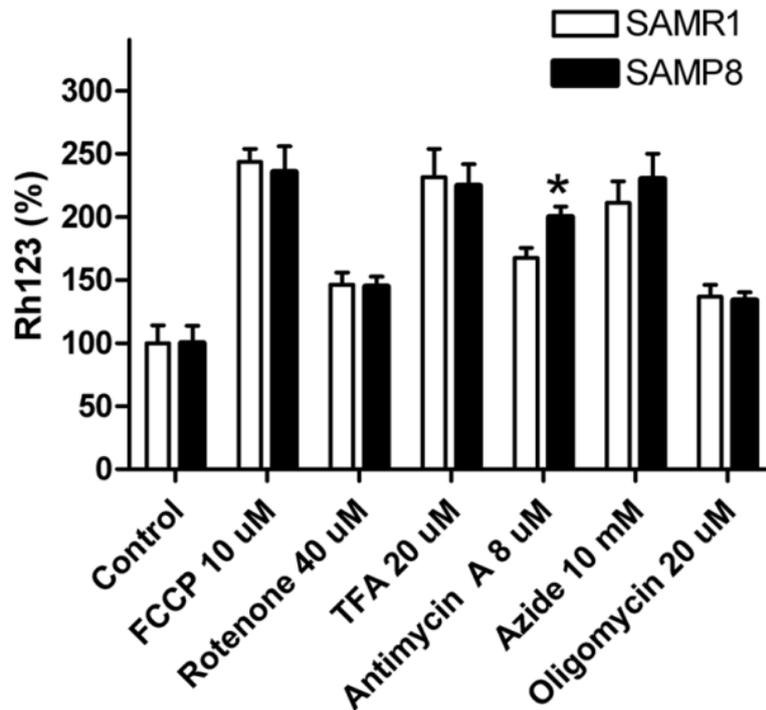


Figura 15. Efecto de inhibidores selectivos de los complejos mitocondriales. Los astrocitos SAMP8 demostraron ser más sensibles a la Antimicina A y a la disfunción del complejo III. La sensibilidad a los diversos inhibidores se comprobó en astrocitos previamente incubados con rodamina 123. El desacoplador mitocondrial FCCP se usó como referencia. Estadística: * $p < 0.05$ comparado con SAMR1.

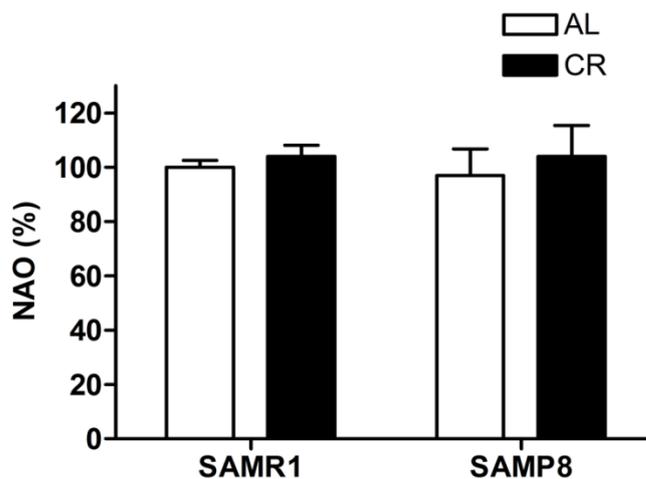


Figura 16. Efecto del NAO como indicativo de la masa mitocondrial. No se observaron cambios significativos relativos a la masa celular en ninguno de los dos tipos celulares ni con el tratamiento con CR.

La tinción de las mitocondrias con el marcador selectivo MitoTracker Green tampoco demostró cambios significativos de masa mitocondrial de los astrocitos SAMP8 (Fig. 17). CR no indujo modificaciones a nivel microscópico.

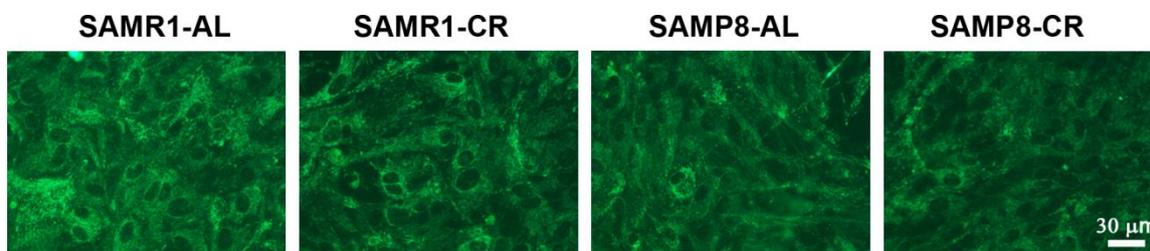


Figura 17. Cultivos de astrocitos teñidos con MitoTracker Green. Se muestran imágenes representativas de cultivos SAMR1 y SAMP8 tratados con suero control (AL) y con suero de restricción calórica (CR). No se observan diferencias microscópicas de la masa mitocondrial teñida con el marcador específico MitoTracker Green.

1.6.- La restricción calórica protegió de la disminución de proteínas de complejos mitocondriales

SAMP8 mostró niveles de marcadores de complejos mitocondriales disminuido en comparación con SAMR1, que fueron significativos para los complejos III, IV y V (ANOVA, factor de cepa, $F(1,28) = 7,295$, $p = 0,0120$, $F(1,28) = 5,317$, $p = 0,0290$ y $F(1,28) = 7,301$, $p = 0,0116$, respectivamente).

CR indujo una tendencia a recuperar los niveles de proteínas de los complejos mitocondriales, principalmente del complejo más afectado que como bien se mencionó fue el III (Fig. 18).

1.7.- La restricción calórica indujo un rejuvenecimiento de los astrocitos senescentes.

Finalmente, buscando una prueba funcional en la protección del tratamiento de CR en los astrocitos SAMP8 se analizó la senescencia celular. La tinción de β -galactosidasa, demostró un incremento de astrocitos en fase de senescencia

replicativa en los cultivos de SAMP8 tratados con suero control (Fig. 19). CR causó una disminución del marcaje hasta niveles cercanos a los astrocitos SAMR1. Por tanto el suero de CR redujo la senescencia replicativa e indujo un rejuvenecimiento celular.

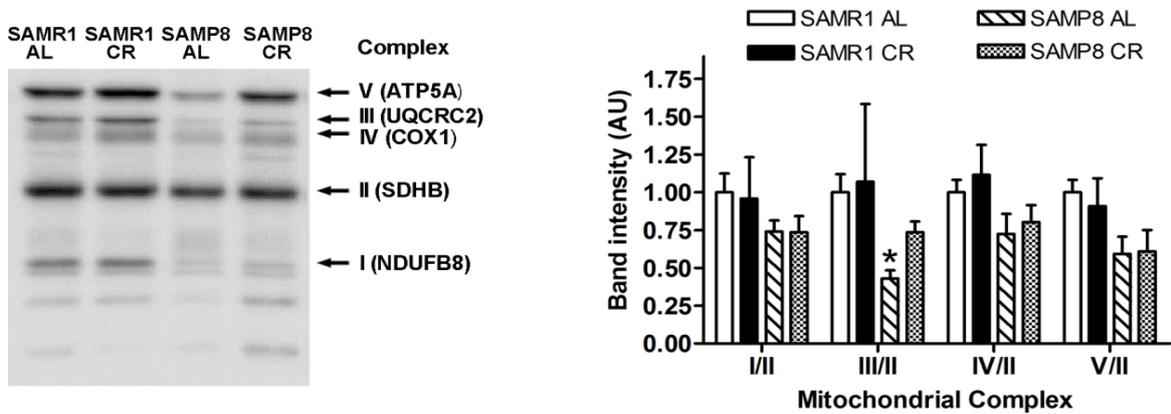


Figura 18. Protección de la restricción calórica sobre la disminución del complejo mitocondrial III en SAMP8. SAMP8 mostró niveles disminuidos significativamente de proteínas marcadores de los complejos mitocondriales III, IV, y V. CR indujo una recuperación significativa del complejo III. Se muestra una membrana representativa de Western blot en la que se indican las proteínas analizadas para cada complejo mitocondrial. La proteína del complejo II se utilizó para normalizar los valores en unidades arbitrarias (AU). Estadística: * $p < 0.05$ comparado con SAMP8 AL.

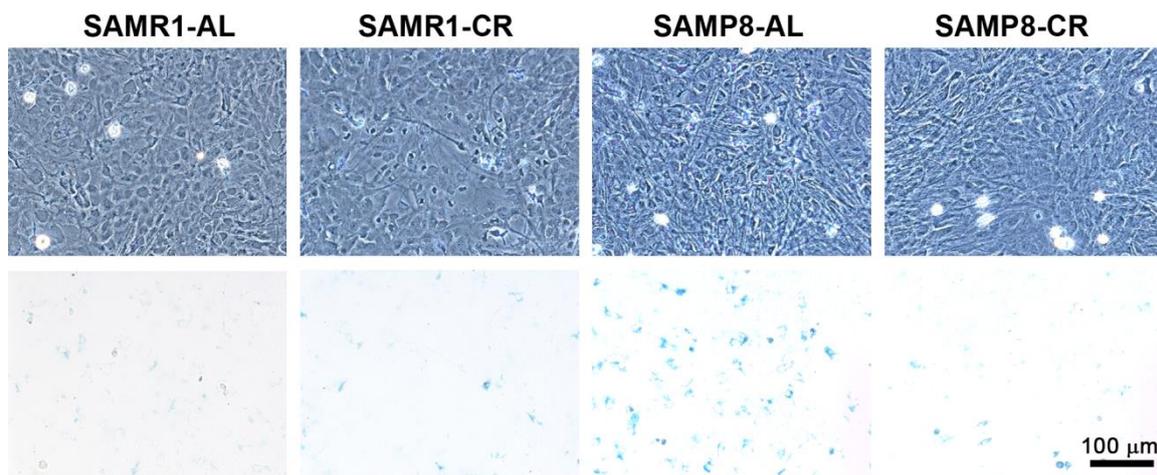


Figura 19. Efectos del tratamiento de restricción calórica sobre la senescencia celular en astrocitos SAMP8. Se muestran imágenes representativas de contraste de fase (hileras superior) de los diversos cultivos en estudio y la tinción con β-galactosidasa del mismo campo microscópico (hileras inferior). La tinción indica senescencia replicativa en los astrocitos SAMP8. El tratamiento con CR indujo un rejuvenecimiento de los astrocitos SAMP8.

2.- DISCUSIÓN

Se han obtenido cultivos primarios de astrocitos de ratón SAMR1 y SAMP8. Previamente se demostró que estos cultivos estaban altamente enriquecidos en astrocitos, conteniendo un 80-95% de este tipo celular (García-Matas et al., 2008). Los cultivos primarios de astrocitos mantienen en gran medida las características de los modelos animales de los cuales se obtuvieron. Así, hemos demostrado las características de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y senescencia.

A modo de discusión se remarca que los astrocitos SAMP8 mostraron un aumento de la generación de ROS y la oxidación de proteínas, los cuales son signos de envejecimiento acelerado. La acumulación de daño oxidativo con la edad podría derivar en el aumento de la producción de ROS mitocondrial desequilibrado como respuesta celular al estrés oxidativo (Balaban, et al 2005)

Sorprendentemente, el tratamiento con CR disminuyó la carbonilación de proteínas astrocitos SAMP8 aunque su generación de ROS no se redujo significativamente. Curiosamente, los niveles de la enzima antioxidante mitocondrial aconitasa 2 fueron mayores en los astrocitos SAMP8 después del tratamiento con CR, pero no en los SAMR1. Esto indicaría un incremento de la defensa antioxidante mitocondrial solo en los astrocitos con un nivel de estrés oxidativo que compromete la funcionalidad mitocondrial.

Los tratamientos con CR y otros agentes antioxidantes contribuyen a mejorar el estado redox y disminuir los marcadores de daño oxidativo. Una investigación previa ha mostrado una reducción de los niveles de carbonilo, nitrotirosina de proteínas y de 8-isoprostano, como marcador de peroxidación lipídica, en un modelo in vitro similar con neuroblastoma humano SH-SY5Y luego del tratamiento con CR (Hyun et al, 2006).

Este estudio también ha demostrado un aumento de las defensas antioxidantes y una disminución del daño oxidativo en la membrana plasmática de cerebro de rata sometido a CR. Otros autores han informado que el tratamiento con CR *in vivo* aumenta la actividad del sistema de glutatión y reduce la generación de ROS en cerebro de rata (Ribeiro et al., 2012).

Disfunciones mitocondriales pueden ser un principal contribuyente al estrés oxidativo relacionado con la edad y la fragilidad de la célula. En este sentido, las deficiencias generales que se encuentran en los complejos mitocondriales, más notable en el complejo III, pueden ser la base del fenotipo senescente de SAMP8.

Una disminución en la actividad del complejo III también se ha informado en las mitocondrias a partir de homogeneizados de cerebro enteros de SAMP8 en comparación con SAMR1 a las 4 semanas de edad (Fujibayashi et al., 1998). Un contenido reducido de ATP en el tejido del hipocampo de SAMP8 edad (Xu et al., 2007) confirma el fallo progresivo de la función mitocondrial *in vivo*, aunque no se encontró una disminución del consumo de oxígeno *in vitro*. La eficiencia bioenergética aumenta en las mitocondrias tratadas con CR, lo que conduce a la generación de menos ROS para la producción de ATP (López-Lluch et al., 2006).

El tratamiento CR *in vitro* mejoró la maquinaria mitocondrial de SAMP8, pero esto no fue suficiente para normalizar las alteraciones mitocondriales, como la reducción de PMM. De hecho, se ha informado que CR disminuye el PMM como parte del cambio adaptativo en el metabolismo energético mitocondrial y la resistencia al estrés oxidativo (López-Lluch et al., 2006). En línea con mayor eficiencia mitocondrial, una disminución en el consumo de oxígeno después del tratamiento con CR se ha demostrado en hepatocitos de rata y células HeLa humanas (López-Lluch et al., 2006) todo el cuerpo sano (Civitarese et al., 2007) y seres humanos obesos (Redman y Ravussin, 2011).

La adaptación metabólica en los seres humanos representa una reducción del 6% en el gasto de energía sedentaria (Redman y Ravussin, 2011). El análisis de estos mismos cultivos de astrocitos SAMR1 y SAMP8 demostró una disminución del consumo de oxígeno inducida por RC (García-Matas et al., 2014). Esta disminución fue de un 30% en el consumo de oxígeno de los astrocitos SAMR1 similares a la disminución del 40% encontrada previamente en rata y cultivos de células humanas (López-Lluch et al., 2006). Una disminución también se muestra por SAMP8, aunque no estadísticamente significativa, que fue consistente con una respuesta de adaptación a los cambios inducidos por CR.

Además CR induce efectos rejuvenecedores en las mitocondrias SAMP8, a saber, la restauración parcial de orgánulos dañados a través de la regulación positiva de genes para los componentes mitocondriales, mejora de vías funcionales y protección contra daños adicionales a través de la regulación positiva de las vías antioxidantes. El ajuste del gasto energético y la mejora general de las respuestas al estrés celular inducidas por CR parece ser la base de la mejora cognitiva reportada en varios modelos de ratón de envejecimiento y EA.

Los astrocitos están profundamente involucrados con el funcionamiento del cerebro, ya sea mediante el apoyo a la supervivencia neuronal y plasticidad, o participando directamente en las vías de neurotransmisión. Por lo tanto la mejora de los astrocitos SAMP8 por el tratamiento con CR sugiere la mejora cognitiva en SAMP8 después de las intervenciones in vivo. De hecho, la mejora en el resultado de la prueba de evitación pasiva por SAMP8 se ha descrito después de un tratamiento CR (Komatsu et al., 2008).

Se ha planteado la hipótesis de que CR retrasa la activación de las enfermedades relacionadas con la edad incluyendo EA. Los ratones SAMP8 muestran rasgos cerebrales de degeneración de EA (Pallas et al, 2008). También se presentan en los cultivos de astrocitos SAMP8 (García-Matas et al, 2008; Díez-Vives et al, 2009).

En general, el suero CR ayudó a los astrocitos SAMP8 senescentes a hacer frente a las condiciones adversas y teniendo sobre ellos un efecto rejuvenecedor.

En conclusión, los cultivos primarios de astrocitos SAMP8 reproducen las características de envejecimiento cerebral patológico de los ratones SAMP8 y son sensibles a tratamientos protectores como el suero CR.

CAPÍTULO 2:

ESTUDIO DEL ESTADO INFLAMATORIO Y LA RESPUESTA A LIPOPOLISACÁRIDO DE LOS CULTIVOS DE ASTROCITOS Y DE MICROGLIA SENESCENTES SAMP8. COMPARACIÓN CON LA RESPUESTA INFLAMATORIA IN VIVO.

En el segundo objetivo se caracterizaron los cultivos primarios de astrocitos y de microglía de ratón SAMP8, como modelos para el estudio de la inflamación cerebral patológica en envejecimiento y Alzheimer. La microglía desempeña un papel crucial en los mecanismos de desencadenamiento de la inflamación, con lo cual se analizaron los cultivos de astrocitos, que siendo enriquecidos contienen un 10-15% de microglía, y los cultivos puros de microglía. Como referencia se utilizaron cultivos de ratones SAMR1.

Además del estado inflamatorio basal se caracterizó la respuesta inflamatoria al LPS, potenciada por $INF\gamma$, en ambos tipos celulares. En experimentos seleccionados se caracterizó la respuesta a $TNF\alpha$. Se realizaron ensayos de liberación de NO y de citoquinas y se observaron los cambios morfológicos a nivel microscópico.

Se completó este apartado con el estudio de la respuesta inflamatoria cerebral in vivo al LPS, y de marcadores de inflamación en suero de ratones SAMP8 y controles no senescentes SAMR1.

Los experimentos in vitro se realizaron en 4-6 cultivos independientes. Los experimentos in vivo se realizaron en ratones de 6 meses de edad (n=5-10) y de 12 meses de edad (n=3-7). Se muestran los resultados como media \pm ESM. Los análisis estadísticos se realizaron con ANOVA seguida del test de Bonferroni.

1.-RESULTADOS

1.1.- La producción de óxido nítrico fue potenciada por lipopolisacárido e interferón γ en astrocitos

Para evaluar la respuesta inflamatoria de los cultivos de astrocitos SAMP8 y SAMR1 se determinó la producción de óxido nítrico (NO) por determinación de los nitritos acumulados en el medio de cultivo tras 24 h, al ser

estimulados con distintas dosis de 3 sustancias proinflamatorias. Por una parte se usó la combinación de LPS a 100 ng/mL con concentraciones crecientes de IFN γ (0,01, 0,05, 0,1, y 0,5 ng/mL) y LPS 2000 ng/mL + IFN γ 3 ng/mL, y por otra TNF α (0,1, 1, 10, 30, y 100 ng/mL). Los cultivos de ambas cepas de ratón demostraron una liberación de NO similar en condiciones basales. El tratamiento de LPS más IFN γ indujo una marcada potenciación de la generación de NO, obteniendo que la respuesta de los SAMP8 fue significativamente más elevada que los SAMR1, especialmente al ser estimulados con 100 ng/mL de LPS y 0,01 ng/mL de IFN γ (Fig. 20) (ANOVA indicó un efecto de la cepa $F(1,234) = 8,592$, $p = 0,0037$ y del tratamiento $F(5,234) = 21,36$, $p < 0,0001$, aunque sin diferencias específicas entre las concentraciones usadas).

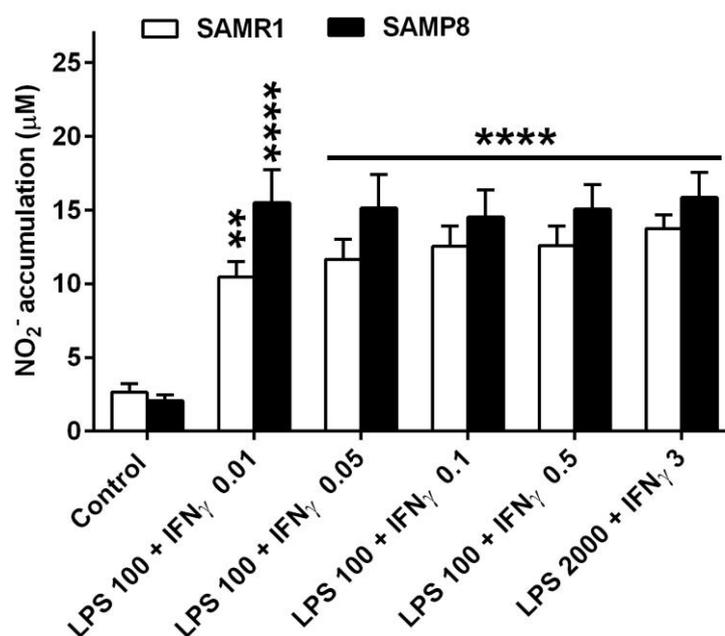


Figura 20. Producción de óxido nítrico en astrocitos tratados con lipopolisacárido e interferón γ . Se observan valores similares de nitritos acumulados en el medio de cultivo en condiciones basales en cultivos SAMP8 y SAMR1, durante 24 h. La respuesta a la lesión proinflamatoria de LPS e IFN γ resultó mayor en cultivos SAMP8 que en SAMR1. Las concentraciones se indican en ng/mL de medio de cultivo. Estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ comparado con el valor control de la cepa correspondiente.

1.2.- La producción de óxido nítrico fue potenciada por el factor de necrosis tumoral α en astrocitos

Los cultivos de astrocitos mostraron un leve aumento de generación de NO por tratamiento con TNF α a concentraciones elevadas. Sin embargo no se observó ninguna respuesta significativamente mayor en cultivos SAMP8 respecto a SAMR1 (Fig. 21) (ANOVA indicó un efecto del tratamiento $F(5,233) = 2,793$, $p = 0.0180$, pero no de la cepa).

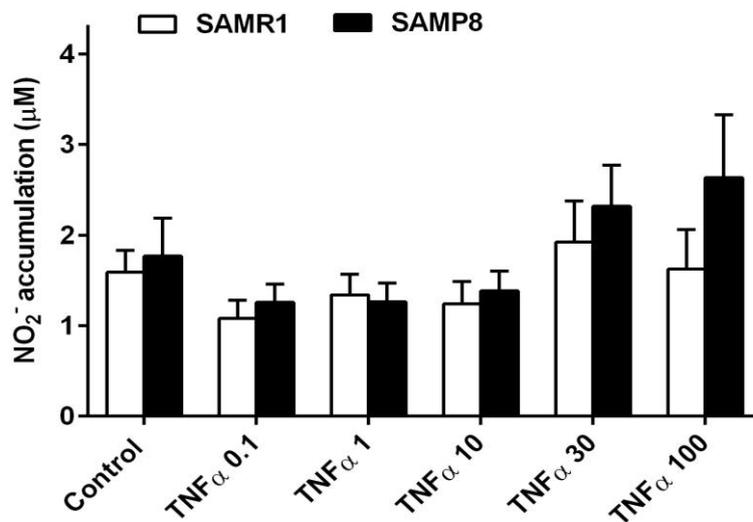


Figura 21. Producción de óxido nítrico en astrocitos tratados con factor de necrosis tumoral α . Se observan valores similares de nitritos acumulados en el medio de cultivo en condiciones basales en cultivos SAMP8 y SAMR1, durante 24 h. La respuesta a la lesión proinflamatoria de TNF α resultó prácticamente inexistente en ambos tipos de cultivos. Las concentraciones se indican en ng/mL de medio de cultivo.

1.3.- La producción de óxido nítrico fue potenciada por lipopolisacárido e interferón γ en microglía SAMP8

En los cultivos de microglía se evidenciaron diferencias significativas de generación de NO, observando una respuesta significativamente mayor en los SAMP8 a los agentes proinflamatorios LPS e interferón γ , aunque las diferencias respecto al control SAMP8 no alcanzaron significación estadística (Fig. 22) (ANOVA indicó un efecto de la cepa, $F(1,242) = 42.68$, $p < 0,0001$).

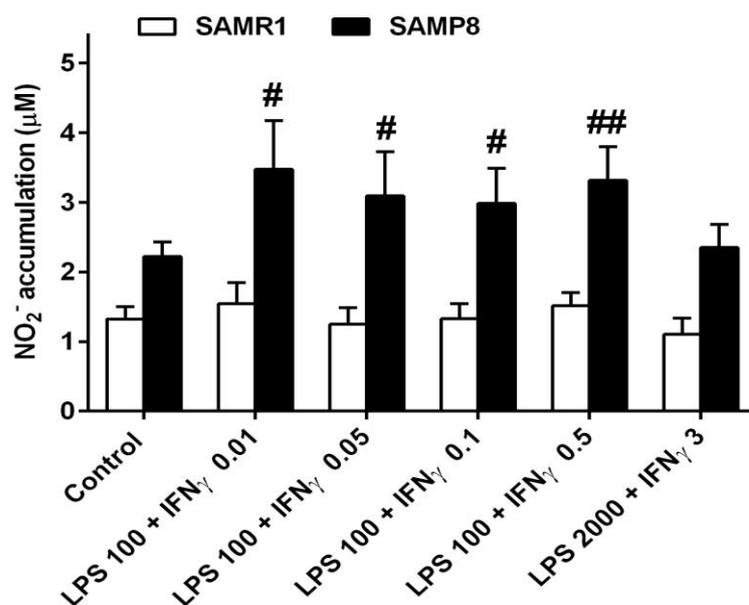


Figura 22. Producción de óxido nítrico en microglía tratada con lipopolisacárido e interferón γ . Se observa un incremento de nitritos acumulados en el medio de cultivo durante 24 h, tras la lesión proinflamatoria de LPS e IFN γ en cultivos SAMP8 respecto a SAMR1. Las concentraciones se indican en ng/mL de medio de cultivo. Estadística: #p < 0,05, ##p < 0,01, comparado con el valor de los cultivos SAMR1 con el mismo tratamiento.

1.4.- La producción de óxido nítrico fue potenciada por el factor de necrosis tumoral α en microglía SAMP8.

El tratamiento de la microglía con TNF α indujo también un efecto mayor en SAMP8 que en SAMR1, sin que el incremento de generación de NO alcanzara valores significativos respecto al tratamiento control con el vehículo (Fig. 23) (ANOVA indicó un efecto de la cepa $F(1,267) = 37,65$, $p < 0,0001$).

1.5.- La producción de citoquinas proinflamatorias fue potenciada por lipopolisacárido e interferón γ en astrocitos

Por otro lado se hicieron determinaciones por ELISA de la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF α , por los cultivos de astrocitos estimulados con los tratamientos proinflamatorios descritos para el análisis de NO. Aunque no se observaron variaciones significativas entre SAMP8 y SAMR1, los SAMP8 mostraron una tendencia general a mayor generación de citoquinas inflamatorias. Los efectos más marcados se observaron a las concentraciones de LPS 100 ng/mL + IFN γ 0,1 ng/mL (Fig. 24) (ANOVA indicó un efecto del tratamiento para IL-1 β , F(1,13) = 8,967, p = 0.0103; IL-6, F(1,14) = 36,09, p < 0.0001; y TNF α , F(1,19) = 17,46, p = 0.0005).

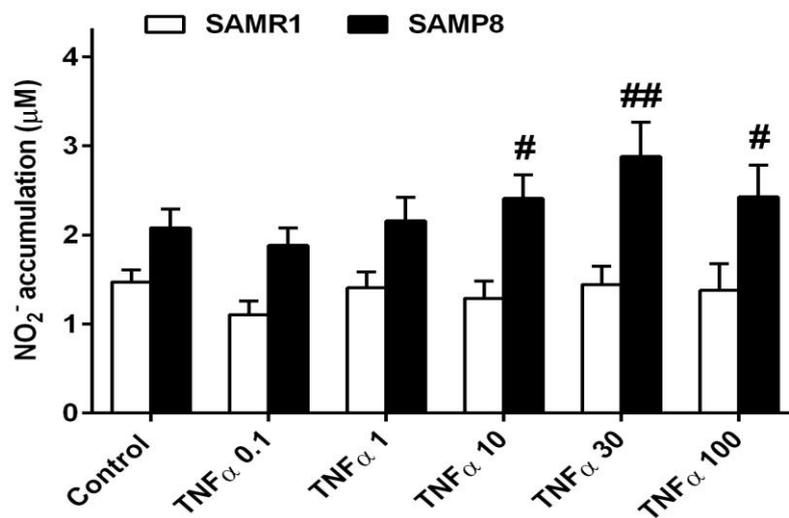


Figura 23. Producción de óxido nítrico en cultivos de microglía tratados con factor de necrosis tumoral α . Los cultivos SAMP8 presentaron una tendencia a mayor generación de NO durante 24 h que los SAMR1, que resultó significativa por el tratamiento con TNF α . Estadística: #p < 0,05, ##p < 0,01, comparado con el valor de los cultivos SAMR1 con el mismo tratamiento.

1.6.- La producción de citoquinas proinflamatorias fue potenciada por lipopolisacárido e interferón γ en microglía

Se analizó la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF α , por los cultivos de microglía en las mismas condiciones descritas para los cultivos de astrocitos. La liberación de citoquinas tras estimulación con LPS 100 ng/mL + IFN γ 0,1 ng/mL, fue de un orden aproximado de 5-10 veces mayor que en astrocitos. Se observó una mayor liberación de IL-6 y una disminución de TNF α en microglía SAMP8, aunque la variabilidad existente no permitió obtener diferencias significativas. (Fig. 25) (ANOVA indicó un efecto del tratamiento para IL-1 β , F(1,11) = 4,604, p = 0.0551; IL-6, F(1,8) = 13,71, p = 0.0060; y TNF α , F(1,11) = 10,68, p = 0.0075).

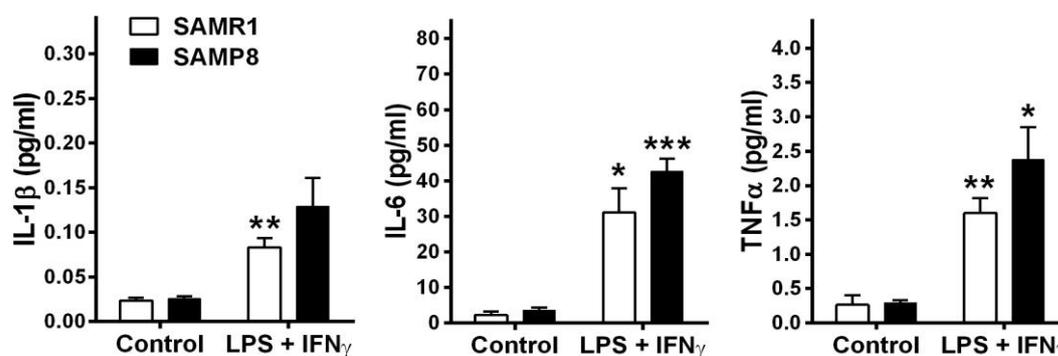


Figura 24. Producción de citoquinas inflamatorias por astrocitos SAMR1 y SAMP8 tratados con lipopolisacárido e interferón γ . Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF α se determinaron en medio de cultivo tras 24 h de tratamiento con LPS 100 ng/mL + IFN α 0,1 ng/mL. Estadística: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 comparado con el grupo control respectivo.

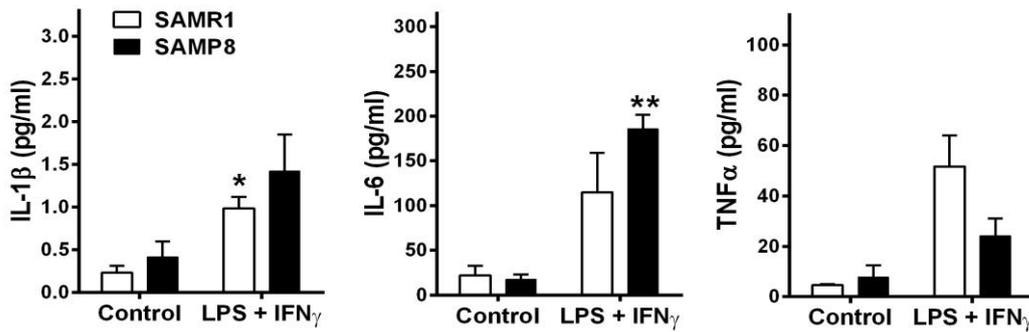


Figura 25. Producción de citoquinas inflamatorias por microglía SAMR1 y SAMP8 tratada con lipopolisacárido e interferón γ . Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF α se determinaron en medio de cultivo tras 24 h de tratamiento con LPS 100 ng/mL + IFN α 0,1 ng/mL. Estadística: *p < 0,05, **p < 0,01 comparado con el grupo control respectivo.

1.7.- Lipopolisacárido e interferón γ indujeron cambios morfológicos en astrocitos y microglía en cultivo

Los astrocitos SAMR1 y SAMP8 mostraron una morfología similar en condiciones basales y adquirieron el esperado aspecto filiforme de sus prolongaciones tras incubación con LPS 100 ng/mL + IFN α 0,1 ng/mL (Fig. 26).

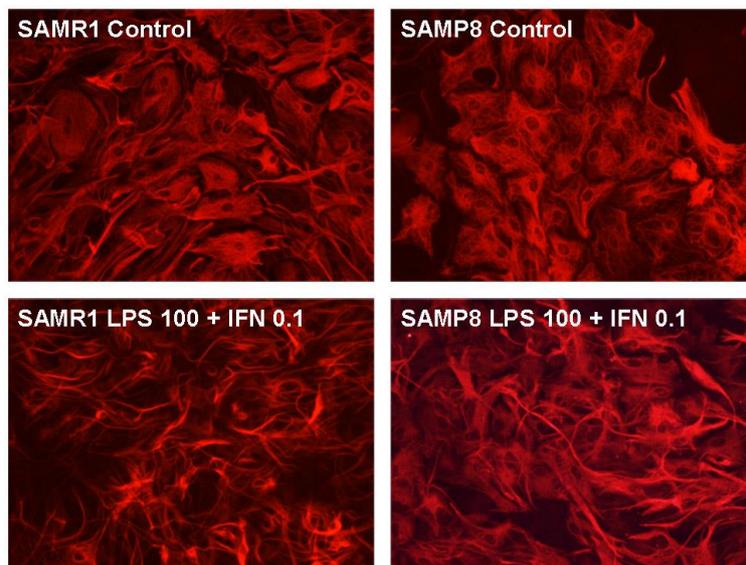


Figura 26. Morfología de astrocitos SAMR1 y SAMP8 tratados con lipopolisacárido e interferón γ . Se presentan imágenes representativas obtenidas con tinción de GFAP de cultivos de astrocitos en condiciones control y tras una lesión proinflamatoria con LPS 100 ng/mL + IFN α 0,1 ng/mL durante 24 h.

Los cultivos de astrocitos SAMP8 presentaban un número similar de microglía que los SAMR1, $12 \pm 2,6 \%$ y $9 \pm 2,1 \%$ respectivamente. Sin embargo, la microglía SAMP8 presentaba una morfología más cercana a las formas esféricas de la microglía activada en cultivo que la microglía presente en cultivos SAMR1 (Fig. 27). La respuesta de activación por LPS 100 ng/mL + IFN α 0,1 ng/mL durante 24 h, también fue más acusada en SAMP8, apreciándose mayor cambio morfológico y proliferación.

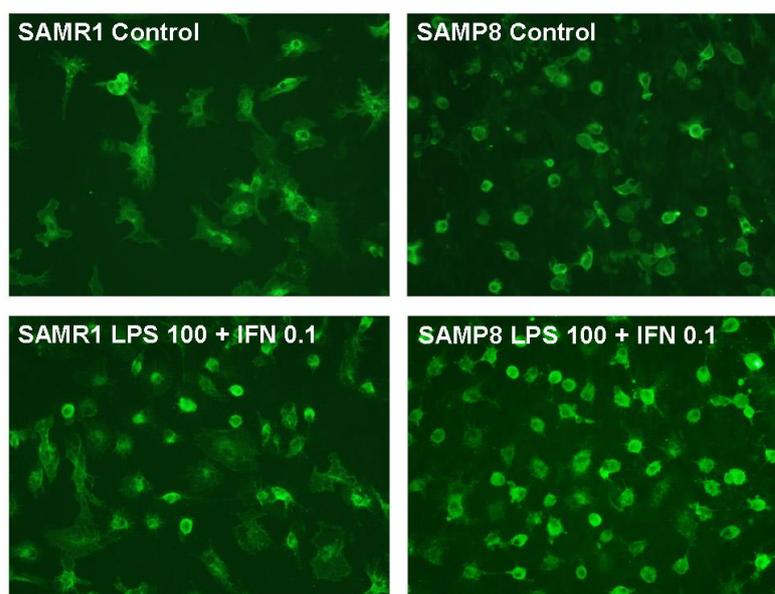


Figura 27. Morfología de microglía presente en cultivos de astrocitos SAMR1 y SAMP8 tratados con lipopolisacárido e interferón γ . Se presentan imágenes representativas obtenidas con tinción de lectina de cultivos de astrocitos en condiciones control y tras una lesión proinflamatoria con LPS 100 ng/mL + IFN α 0,1 ng/mL durante 24 h.

1.8. El tratamiento con lipopolisacárido in vivo aumentó la respuesta inflamatoria cerebral en ratones SAMP8 a los 6 meses y no a los 12 meses de edad

Para evaluar las diferencias en el efecto in vivo de una lesión proinflamatoria, se sometió a ratones macho SAMP8 de 6 y 12 meses de edad y a ratones de la cepa control SAMR1 a una dosis de 100 μ g de LPS intraperitoneal o de PBS como vehículo.

1.8.1. Efecto de lipopolisacárido sobre el comportamiento de interacción social

En primer lugar se evaluó la capacidad de interacción social de los ratones SAMP8 y SAMR1 a las 3 h del tratamiento, para detectar el comportamiento de “sickness behavior” característico del LPS (Konsman, Parnet, & Dantzer, 2002). Se evidenció una disminución de la capacidad de interacción social de ambas cepas tras el tratamiento con LPS pero sin diferencias significativas entre ellas (Fig. 28) (ANOVA mostró un efecto del tratamiento $F(1,44) = 53,18$, $p < 0.0001$).

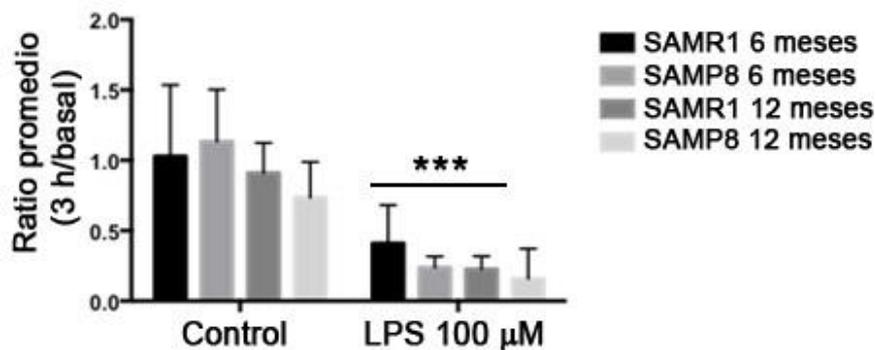


Figura 28. Efecto del tratamiento con lipopolisacárido sobre la respuesta de interacción social “sickness behavior”. Se muestra el ratio de tiempo de interacción social 3 h/basal. A las 3 h del tratamiento con 100 µg de LPS o vehículo ip, se observa disminución de la capacidad de interacción social de ambas cepas SAMR1 y SAMP8. Estadística: *** $p < 0.001$ comparado con la respuesta al tratamiento control con el vehículo en animales de la misma cepa y edad.

1.8.2. Efecto de lipopolisacárido sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias en suero sanguíneo

A continuación del test de comportamiento final, a las 3 h del tratamiento, todos los ratones se sacrificaron inmediatamente y se procedió a la obtención de sangre del tronco y a la disección del tejido cerebral para determinar mediante ELISA las diferencias de IL-1 β , IL-6 y TNF α , a nivel del suero sanguíneo y de la corteza cerebral.

A los 6 meses de edad, los niveles basales de las citoquinas IL-1 β y IL-6 detectados en suero fueron similares entre SAMP8 y SAMR1. Se detectó un aumento significativo de IL-1 β y IL-6 en ambas cepas de ratones a las 3 h del tratamiento con LPS (Fig. 29) ($F(1,11) = 11,54$, $p = 0,0060$; $F(1,8) = 76,58$, $p < 0,001$, respectivamente para IL-1 β y IL-6). Los niveles basales de TNF α en SAMP8 fueron más elevados que en SAMR1, pero no se modificaron con LPS. Los ratones SAMR1, en cambio, mostraron un incremento de esta citoquina en suero tras el tratamiento con LPS (Fig. 29) (interacción cepa x tratamiento, $F(1,13) = 6,398$, $p = 0,0252$).

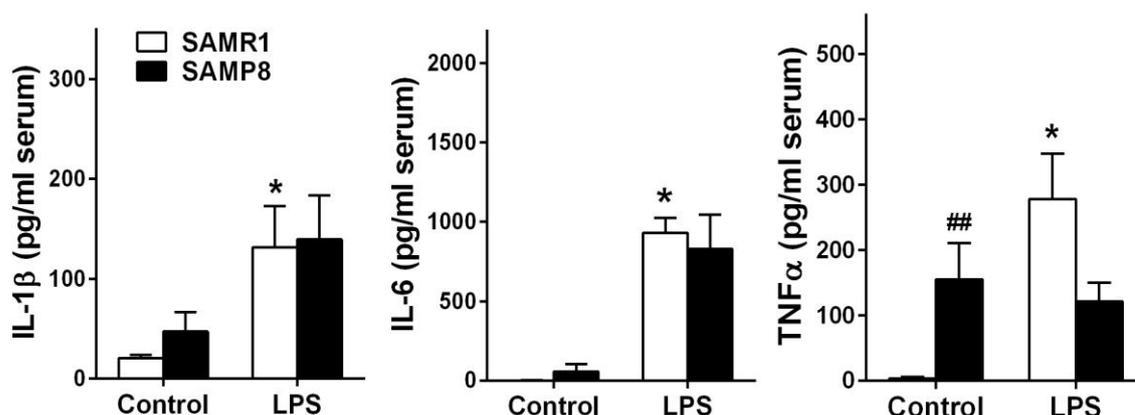


Figura 29. Niveles de citoquinas inflamatorias en suero sanguíneo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 6 meses de edad, tras tratamiento con lipopolisacárido. Los ratones se inyectaron con 100 μ g de LPS o vehículo ip. Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF α se determinaron a las 3 h. Se observaron mayores niveles basales de TNF α en SAMP8. Estadística: * $p < 0,05$ comparado con el grupo control respectivo sin LPS; ## $p < 0,01$ comparado con SAMR1.

A los 12 meses de edad no se detectaron diferencias significativas entre los valores basales de citoquinas en suero sanguíneo de SAMR1 y SAMP8. Un aumento pronunciado se encontró en los niveles séricos de IL-1 β , IL-6 y TNF α en ambas cepas de ratones en respuesta a LPS a los 12 meses de edad (Fig. 29) ($F(1,7) = 0,962$, $p < 0,05$; $F(1,7) = 67,362$, $p < 0,001$; $H(3) = 8,389$, $p < 0,05$, respectivamente).

A pesar de que no se observó ningún efecto de interacción cepa por tratamiento, el efecto de la cepa se detectó para IL-6 ($F(1,7) = 12,706$, $p < 0,01$). Además, el grupo de SAMP8 tratado con LPS mostró una respuesta exacerbada a esta citoquina ($F(1,7) = 67,362$, $p < 0,001$) (Fig. 30).

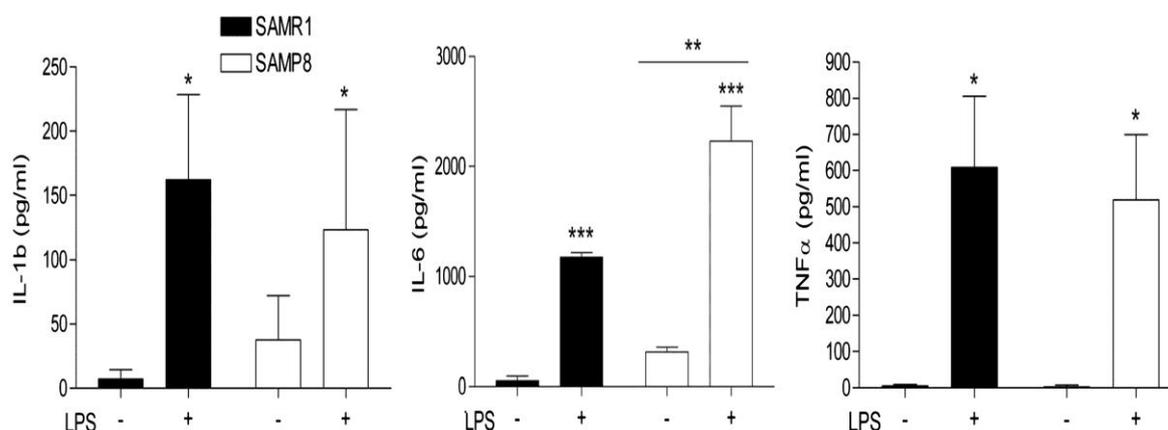


Figura 30. Niveles de citoquinas inflamatorias en suero sanguíneo de ratones SAMR1 y SAMP8 de 12 meses de edad, tras tratamiento con lipopolisacárido. Los ratones se inyectaron con 100 μ g de LPS o vehículo ip. Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF α se determinaron a las 3 h. Se observó una respuesta exacerbada al LPS en los niveles de IL-6 en SAMP8. Estadística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado con el grupo control respectivo sin LPS; para IL-6 se indica un efecto de la cepa ** $p < 0,01$.

1.8.3. Efecto de lipopolisacárido sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias en tejido de corteza cerebral

En cuanto a los resultados en tejido de corteza cerebral, no se detectaron diferencias en los niveles IL-1 β , IL-6 y TNF α en condiciones basales entre SAMR1 y SAMP8, mientras que ambas cepas de ratones mostraron un incremento de niveles de citoquinas tras el tratamiento con LPS (Figs. 31 y 32).

En los ratones SAMP8 de 6 meses de edad se observó una mayor respuesta inflamatoria al LPS que resultó más alta que en los SAMR1 para IL-1 β y TNF α (Fig. 31). Así, se detectó un efecto del tratamiento sobre los niveles de IL-1 β , IL-6 y

TNF α (F(1,34) = 12,85, p = 0,0020; F(1,27) = 11,75, p = 0,0020; y F(1,28) = 8,306, p = 0,0075, respectivamente), un efecto de la cepa para IL-1 β (F(1,34) = 6,477, p = 0,0156) e interacción entre ambos factores para TNF α (F(1,28) = 7,099, p = 0,0126).

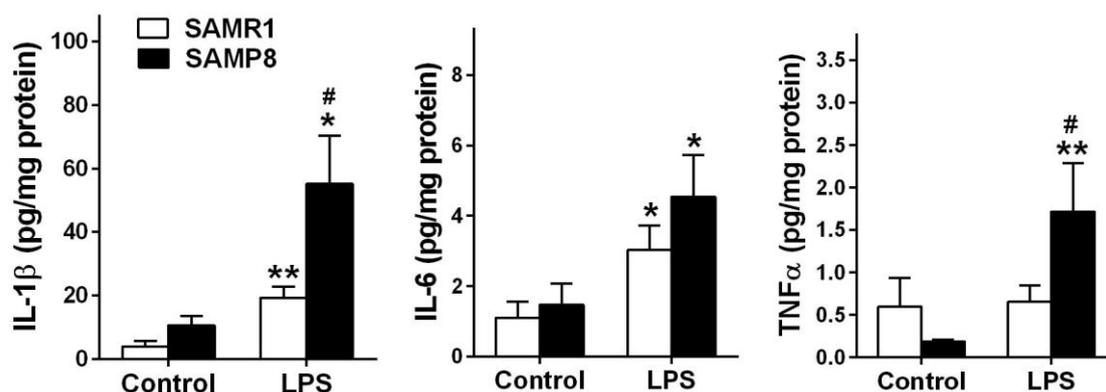


Figura 31. Determinaciones de IL-1 β , IL-6 y TNF α en la corteza cerebral de ratones SAMR1 y SAMP8 de 6 meses de edad tratados con LPS. Los ratones se inyectaron con 100 μ g de LPS o vehículo ip. Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF α se determinaron a las 3 h. Los ratones SAMP8 mostraron una mayor respuesta al LPS. Estadística: *p < 0,05, **p < 0,01, comparado con el grupo control respectivo; #p < 0,05 comparado con el nivel de los ratones SAMR1 con el mismo tratamiento.

A los 12 meses de edad, los ratones SAMR1 presentaron niveles de citoquinas en corteza cerebral similares a los niveles de 6 meses de edad tras el tratamiento con LPS. Sin embargo, en SAMP8 de 12 meses no se mantuvieron los niveles exacerbados de citoquinas observados a los 6 meses. A esta edad avanzada, los niveles cerebrales de IL-1 β , IL-6 y TNF α basales y de respuesta al estímulo inflamatorio de LPS fueron similares en ambas cepas de ratones (Fig. 32) (ANOVA indicó un efecto del tratamiento en todas la citoquinas: F(1,17) = 8,122, p = 0,0111; F(1,16) = 4,949, p = 0,0409; F(1,17) = 7,258, p = 0,0154, para IL-1 β , IL-6 y TNF α respectivamente).

1.8.4. Efecto de lipopolisacárido sobre la morfología de astrocitos y microglía in vivo

El estudio histológico del hipocampo de los ratones SAMR1 y SAMP8 control y tratados con LPS demostró un cambio de morfología en astrocitos a un fenotipo con mayor cuerpo celular y ramificaciones en SAMP8. Estos cambios se evidenciaron con la tinción inmunohistoquímica con GFAP que mostró mayor tinción en SAMP8, sin un efecto destacado del tratamiento con LPS (Fig. 33A).

La tinción con lectina evidenció un aumento de ramificaciones en la microglía de SAMP8 control y de SAMR1 tratados con LPS respecto a SAMR1 control, indicando un estado inflamatorio (Fig. 33B).

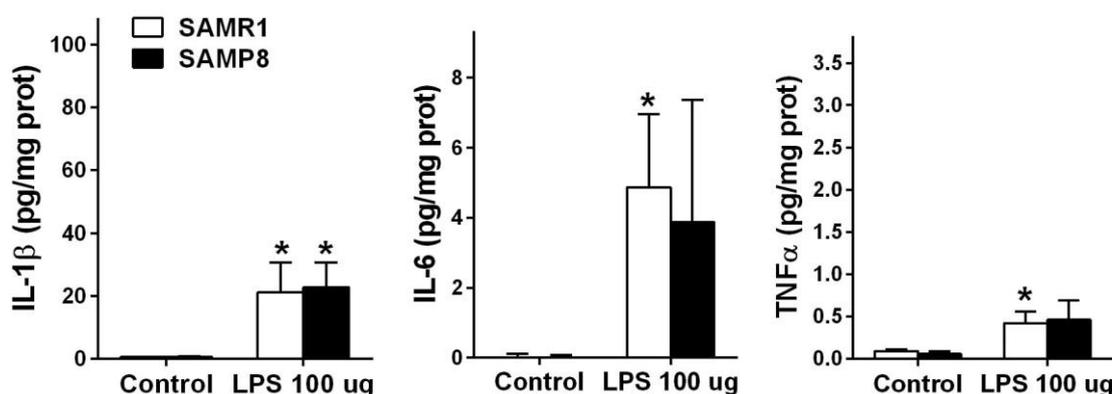


Figura 32. Determinaciones de IL-1 β , IL-6 y TNF α en la corteza cerebral de ratones SAMR1 y SAMP8 de 12 meses de edad tratados con LPS. Los ratones se inyectaron con 100 μ g de LPS o vehículo ip. Los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF α se determinaron a las 3 h. Estadística: *p < 0,05 comparado con el grupo control respectivo.

1.8.5. Efecto de lipopolisacárido sobre la morfología de astrocitos y microglía in vivo

El estudio histológico del hipocampo de los ratones SAMR1 y SAMP8 control y tratados con LPS demostró un cambio de morfología en astrocitos a un fenotipo con mayor cuerpo celular y ramificaciones en SAMP8. Estos cambios se

evidenciaron con la tinción inmunohistoquímica con GFAP que mostró mayor tinción en SAMP8, sin un efecto destacado del tratamiento con LPS (Fig. 33A).

La tinción con lectina evidenció un aumento de ramificaciones en la microglía de SAMP8 control y de SAMR1 tratados con LPS respecto a SAMR1 control, indicando un estado inflamatorio (Fig. 33B).

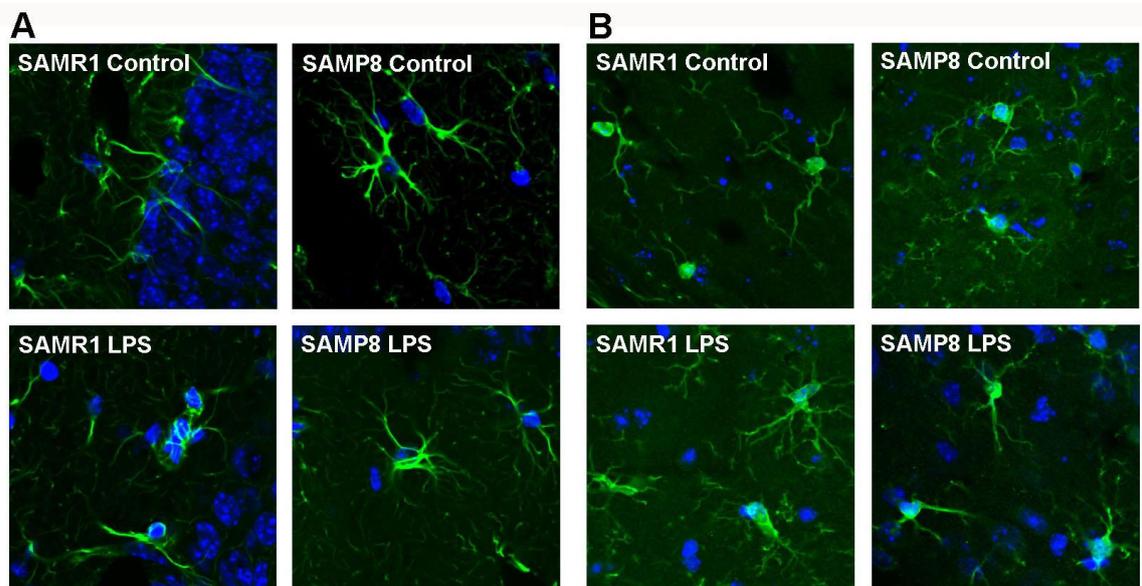


Figura 33. Morfología de astrocitos y microglía en el hipocampo de ratones SAMR1 y SAMP8 tratados con lipopolisacárido. Se presentan imágenes representativas de tejido teñido con GFAP para visualizar astrocitos (A) y teñido con lectina para visualizar microglía (B) de ratones de 6 meses de edad. Los núcleos están contrateñidos con bisbenzimidida. Los ratones se inyectaron con 100 µg de LPS o vehículo ip y se sacrificaron a las 4 h del tratamiento.

2.- DISCUSIÓN

Se han utilizado cultivos primarios gliales del ratón SAMP8 para el estudio de procesos inflamatorios, en comparación con los cultivos de la cepa control SAMR1. Entre los rasgos de envejecimiento patológico de SAMP8 destaca un aumento de los procesos inflamatorios (Tha et al., 2000; Wang et al., 2014) que en concierto con el aumento de los niveles de β amiloide y tau hiperfosforilada, y estrés oxidativo induce la neurodegeneración y pérdida cognitiva en este ratón.

Astroцитos y microglía en cultivo presentaron marcadores de glía activada, demostrando el mantenimiento de las características inflamatorias *in vitro*.

In vivo, se ha analizado el estado inflamatorio de los tejidos de la corteza cerebral de ratones SAMP8 y SAMR1 a dos edades distintas, 6 y 12 meses, que corresponden a dos estadios distintos de senescencia y neurodegeneración en SAMP8. Estos ratones han mostrado una duración máxima de vida de 18 meses. A los 6 meses ya presentan patología cerebral con pérdida cognitiva (López-Ramos et al., 2012). Los 12 meses de edad corresponden aproximadamente a su periodo de vida media y están en avanzado estado de senescencia y neurodegeneración. A ambas edades los niveles de las citoquinas proinflamatorias examinadas demostraron pocos cambios en condiciones basales. Sin embargo la morfología de glía activada en el estudio histológico de SAMP8 demostró la presencia de un componente inflamatorio cerebral en estos ratones de acuerdo con los resultados de otros autores que describen un aumento de citoquinas proinflamatorias a la edad intermedia de 10 meses (Tha et al., 2000).

Además del estado inflamatorio basal se ha analizado la respuesta aguda a un estímulo. La inflamación es una respuesta natural del organismo a daños o infecciones, que está mediada generalmente por citoquinas proinflamatorias como las que determinamos en el presente estudio: IL-1 β , IL-6, y TNF α . La función de la respuesta inflamatoria aguda es eliminar tanto la causa de la lesión como las células que se vean afectadas. Si no se restaura la salud de los tejidos afectados se desencadena una afección crónica que erosiona continuamente los tejidos circundantes. Como agente desencadenante de la respuesta inflamatoria aguda se ha utilizado LPS. El LPS, tratándose de un componente mayoritario de la membrana exterior de numerosas bacterias actúa como una endotoxina y provoca una respuesta inmunitaria con fuerte componente inflamatorio. La respuesta inflamatoria cerebral inducida por inyección intracerebral de LPS en rata induce neuroinflamación asociada con neuropatología de tipo EA (Deng et al., 2014).

In vitro, el LPS se ha administrado con IFN γ para aumentar sus efectos. La concentración más baja ensayada de LPS 100 μ M + IFN γ 0,01 μ M demostró la máxima efectividad en el desencadenamiento de la reacción inflamatoria en cultivos gliales enriquecidos en astrocitos de ambas cepas y en microglía pura de SAMP8. Un estímulo proinflamatorio de TNF α no resultó efectivo en cultivos de astrocitos y sólo indujo respuesta de NO en microglía. Esta citoquina actúa también como señalizador en funciones sinápticas y de plasticidad a través del control de la liberación de glutamato por astrocitos (Rossi & Volterra, 2009). Aunque no indujo una cascada de efectos inflamatorios no podemos descartar que el TNF α esté desregulado en astrocitos SAMP8.

En el estudio in vitro se ha demostrado que los cultivos de SAMP8 responden de forma exacerbada a un estímulo inflamatorio agudo de LPS + IFN γ en cuanto a la generación de NO, en comparación a SAMR1. Se ha descrito una mayor actividad de óxido nítrico sintasa en SAMP8 (Ali et al., 2009) que puede contribuir a esta respuesta. Además, una mayor generación de citoquinas en SAMP8 que en SAMR1 fue una constante para las tres citoquinas analizadas aunque no se alcanzaron diferencias significativas entre ambas cepas.

In vivo se administró LPS ip. Existen dudas acerca del grado de penetrabilidad de LPS a través de la barrera hematoencefálica tras su administración periférica, sea oral o intraperitoneal, aunque se ha demostrado su presencia en cerebro de ratón (Banks & Robinson, 2010). En todo caso, la mínima penetración de LPS es suficiente para provocar la reacción inflamatoria cerebral. Alternativamente, la respuesta inflamatoria periférica inicial induciría una disrupción de la barrera que aumentaría su permeabilidad al paso de LPS.

A los 6 meses de edad, LPS indujo una respuesta inflamatoria cerebral en ambas cepas, aunque SAMP8 mostró una potenciación importante de la respuesta en comparación con SAMR1. Sorprendentemente, los SAMP8 de 12 meses de edad mostraron una disminución de la activación por LPS respecto a la edad de 6 meses, mientras que el nivel de la respuesta fue preservado en ratones SAMR1. Así,

los mecanismos inflamatorios cerebrales de SAMP8 fueron exacerbados únicamente a los 6 meses de edad.

Por lo tanto, la inflamación crónica en el cerebro de ratones SAMP8 conlleva una hiperactivación de la glía. La inflamación crónica podría generar una respuesta alterada a estímulos proinflamatorios externos en el cerebro envejecido SAMP8.

A nivel periférico, las concentraciones de citoquinas detectadas en suero sanguíneo tras la inyección de LPS fueron mucho mayores que en cerebro, en consonancia con posiblemente unos niveles mucho mayores de LPS en los órganos inmunológicos sistémicos que en cerebro. Cabe destacar también que la respuesta inflamatoria exacerbada de SAMP8 se detectó únicamente en la generación de IL6 a los 12 meses de edad.

Estos datos también indican que los niveles séricos de IL6 pueden ser un biomarcador inflamatorio del fenotipo P8 y que también distinguen la respuesta inflamatoria sistémica de los ratones SAMP8 a la observada en los SAMR1.

La inflamación crónica es un factor de riesgo para diversas enfermedades relacionadas con la edad, incluidas las enfermedades neurodegenerativas. La generación y la secreción de mediadores proinflamatorios pueden interactuar en múltiples niveles con la neurodegeneración. En la EA se piensa que la naturaleza intratable de las placas de A β y los ovillos neurofibrilares estimulan una reacción inflamatoria crónica para limpiar estos desechos y que la glía crónicamente activada puede, además, matar neuronas adyacentes por la liberación de productos altamente tóxicos tales como ROS y NO; y adicionalmente A β induce la expresión de citoquinas proinflamatorias en las células gliales generando un círculo vicioso. Varias líneas de evidencia sugieren que todos estos factores pueden contribuir a la disfunción neuronal y muerte celular, ya sea solo o en conjunto. La

neuroinflamación se produce claramente en regiones patológicamente vulnerables del cerebro con EA, con una mayor expresión de proteínas de fase aguda y citoquinas proinflamatorias que son apenas evidentes en el cerebro normal.

La neuroinflamación crónica se considera cada vez más un actor importante en el desencadenamiento y la progresión de la (EA). (Heneka et al., 2015) El papel de astrocitos y microglia en este contexto no está todavía bien definido (Frank-Cannon et al., 2009; Mosher & Wyss-Coray, 2014). Así bien, la neuroinflamación contribuye en gran medida a una disfunción de los mecanismos de defensa neuronal contra alteraciones homeostáticas. Esta pérdida de la conservación fisiológica del cerebro allanará el camino a la fragilidad y a la EA.

CAPÍTULO 3:

**DESARROLLO DE UN MODELO CELULAR QUE EXPRESE
MUTACIONES EN LA PRESENILINA 1 (PSEN1) ASOCIADAS A LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE ORIGEN FAMILIAR.**

En el tercer estudio se desarrolló un sistema experimental celular que expresara mutaciones de PSEN1 descritas en clínica, para el análisis de los mecanismos celulares que puedan inducir sus efectos patológicos en la EA.

En este objetivo se sentaron las bases para el estudio futuro de las tres mutaciones descritas en la Introducción, K239N, E220G y L286P. Se trata de un apartado eminentemente metodológico que representó el abordaje de diversas técnicas de biología molecular, algunas de las cuales no fueron efectivas.

A continuación se describen cronológicamente los ensayos realizados y los problemas acaecidos y como se afrontaron para avanzar en el desarrollo del modelo celular.

1.- RESULTADOS

1.1.- Línea celular de fibroblastos embrionarios deficiente en presenilina

Las líneas MEF control y MEF KO para ambos genes de presenilina (PS-/-) fueron provistas por el grupo que las estableció y describió previamente (De Strooper *et al.*, 1999). Por métodos de Western blot se comprobó la expresión de presenilina 1 y presenilina 2 en la línea control y la ausencia de niveles significativos de ambas proteínas en la línea PS-/-.

1.2.- Generación de mutaciones puntuales en el gen de PSEN1

Se partió del gen *PSENI* humano insertado en el plásmido pcDNA3.1(+/-) (Figura 34) entre KpnI y BamHI (cedido por el Dr. Carlos Saura, UAB) y se procedió a realizar el procedimiento de mutagénesis dirigida.

Se diseñaron las secuencias de los cebadores específicos para cada mutación que cumplieran los requisitos indicados en la sección de métodos de tener un tamaño entre 25-45 bases, con la mutación deseada en el centro de la secuencia, el porcentaje de GC superior a 40%, y la $T_m > 60^\circ\text{C}$ (Tabla 5).

Mutación	Cebadores Secuencias Forward y Reverse	Cambio de triplete	Aminoácido cambiado
K239N	Fwd 5`GTTTATCA <u>AA</u> CTACCTCCCTGAATGG 3` Rev 5`CCATTCAGGGAGGTA <u>G</u> TTGATAAAC 3`	AAG-AAC	Lisina a Asparagina
L286P	Fwd 5`GCTTTTTCCAG <u>CT</u> CCCATTTACTCC3` Rev 5`GGAGTAAATGGG <u>AG</u> CTGGAAAAAGC3`	TTC-CTC	Leucina a Prolina
E120G	Fwd 5`CCATTCACAG <u>G</u> AGATACCGAGACTG 3` Rev 5`CAGTCTCGGTATCT <u>C</u> CTGTGAATGG 3`	GAA-GGA	Glutamato a Glicina

Tabla 5: Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida. Se indica la base nitrogenada cambiada con subrayado y el triplete afectado en negrita.

Se realizaron los PCR con los *cebadores* diseñados, la Pfu polimerasa y el constructo de pCDNA3.1 como molde de DNA. Las nuevas cadenas debían tener las mutaciones ya que los cebadores quedan incorporados en la reacción de amplificación

A continuación, se eliminó el DNA molde por digestión con DpnI y el producto resultante se transformó mediante choque térmico en *E.Coli* DH5 α . La introducción de las mutaciones puntuales que causan la sustitución de los aminoácidos correspondientes se verificó por el método de secuenciación de DNA conocido como método de Sanger (Sanger et al., 1977).

Este análisis se llevó a cabo con un secuenciador automático en los Servicios Científico Técnicos de la UAB (Centre de Recerca en Agrigenómica CRAG).

1.3.- Generación de líneas celulares expresando las mutaciones de PSEN1

Dos fueron los procedimientos que se utilizaron para generar el modelo celular que expresara mutaciones asociadas a la EA de origen familiar.

La primera aproximación consistió en la generación de los plásmidos que expresaban el gen humano de PSEN1 (*p.PSENI*) WT y las mutaciones de estudio mediante técnicas de clonación, seguido de transfección de los distintos plásmidos a células MEF PS^{-/-} con el método de lipofección.

La segunda aproximación consistió en la clonación de PSEN1 WT y de estas mutaciones (p.L286P, p.K239N y p.E120G) en un plásmido retroviral MSVC 2.2-IRES-GFP (Figura 34) para luego transfectar en las células MEF PS^{-/-}.

1.3.1.- Generación de líneas celulares mediante clonación y posterior transfección por lipofección

1.3.1.1.- Obtención de los plásmidos de p.PSEN1 mutada

Se partió de *p.PSEN1* WT insertada en el vector plasmídico pag3ZEO (Figura 35), y de la *p.PSEN1* con las mutaciones (p.L286P, p.K239N y p.E120G) en el pc.DNA 3.1 el primero con resistencia a Zeomicina y como promotor de expresión beta actina que es mucho más potente, el segundo a Neomicina y promotor de expresión de Citomegalovirus (CMV). Para ambos casos el gen de *p.PSEN1* WT y mutado se encuentra insertado entre Kpn I y BamH I.

Todo plásmido contiene un área denominado “Multicloning site” el cual contiene la codificación para diferentes enzimas de restricción lo que permite linealizar el plásmido y unir el fragmento de interés al momento de emplear dichas enzimas. Para mayor practicidad se trabajó con un solo vector, por lo que todos los genes (*p.PSEN1* WT y p.L286P, p.K239N y p.E120G) fueron insertados en pag3ZEO.

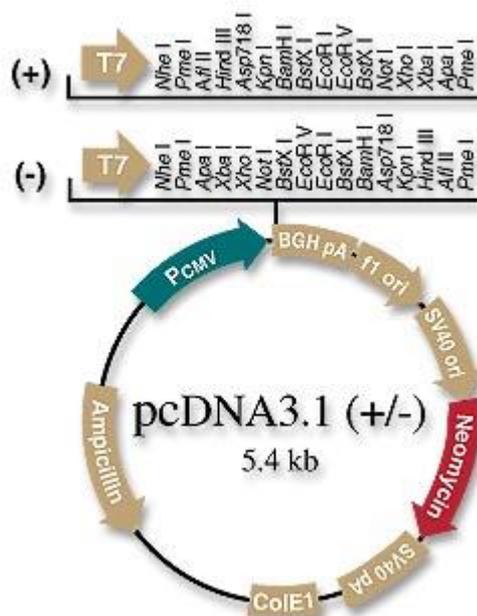


Figura 34: Mapa del vector pcDNA 3.1(+/-), vector plasmídico con resistencia a Neomicina y promotor de Expresión Citomegalovirus (CMV) (Invitrogen)

No sólo se trabajó con las mutaciones previamente mencionadas, también se realizó el procedimiento con otras mutaciones para PSEN1 conocidas que diferían entre sí en la vía de activación proteolítica de β -neurexin-1 (M146L, C410Y, H163R y Δ E9) (Saura et al., 2011) lo cual permitiría relacionar las mutaciones en estudio

con una actividad específica. Los plásmidos p.M146L, p.C410Y, p.H163R, y p.ΔE9 fueron cedidos por el Dr. Carlos Saura.

Posterior a los procedimientos de digestión y ligación y tener a todas las mutaciones y a la forma WT en el vector pAg3ZEO se procedió a realizar la extracción y purificación de ADN mediante las técnicas de minipreps y maxipreps los cuales ofrecen un método simple para la extracción de ADN plasmídico a partir de cultivos de *E.coli DH5α*.

1.3.1.2.- Transfección de los plásmidos por lipofección

Una vez extraído y purificado el ADN, para generar un pool estable de células a partir de la línea celular MEF KO se procedió a transfectar el plásmido pAG3Zeo con PSEN1 WT y con las variantes génicas (p.M146L, p.C410Y, p.H163R, y p.ΔE9, p.L286P, p.K239N y p.E120G) por lipofección, utilizando un lípido catiónico que se acoplará con el DNA plasmídico y facilitará su entrada a través de la membrana a la célula. Se usó Lipofectamina (LF2000 Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en medio OptiMEM enriquecido con glutamina. La selección de las células transfectadas se realizó en presencia de los antibióticos zeocina y geneticina (0.4 mg/ml) (Saura et al., 2004).

1.3.1.3.- Análisis de las líneas celulares obtenidas

Las células resistentes a los antibióticos de selección se analizaron para determinar el nivel de expresión de los plásmidos correspondientes. Para su proliferación se empleó medio DMEM suplementado con 0.1-10% de suero fetal bovino. Los experimentos fueron realizados por triplicados y fueron monitoreados durante 3 semanas, periodo en el que el proceso de selección estaría finalizado de manera adecuada.

Para asegurar que los procedimientos se estaban realizando de la manera correcta se procedió a realizar un Western Blot control para evaluar la transfección transitoria a las 48 h. Se empleó en este caso únicamente anticuerpo anti-presenilina 1, bucle (clon PS1 domain, Millipore) para controlar la expresión de presenilina 1. Como se puede ver en la Figura 36 aparentemente había una buena expresión de presenilina, motivo por el cual se continuó con la selección.

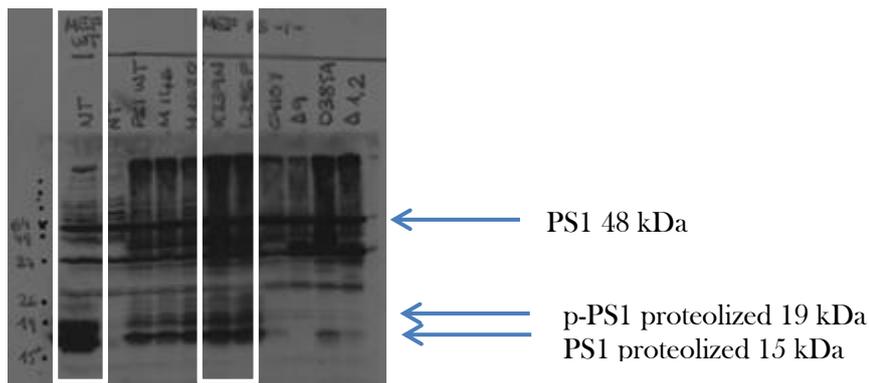


Figura 36: Expresión inicial de presenilina 1 (PS1) tras subclonación en pAG3Zeo y transfección por lipofección. Western Blot control para evaluar la transfección transitoria a las 48h del inicio de proceso de selección celular posterior a la transfección en células MEF. Se indica el carril de MEF WT y los de las mutaciones K239N y L286P

Una vez monitoreado los cultivos celulares durante 3 semanas manteniendo las condiciones de selección se procedió a la realización de los Western Blot, donde las células fueron lisadas y una igual cantidad de proteína fue analizada empleando diferentes anticuerpos para evaluar y comparar la expresión de proteínas y las hidrólisis de algunos substratos de cada una de las mutaciones. Se usaron células MEF WT como control de expresión. Se determinaron los niveles de presenilina 1, alfa Nicastrina, y N-cadherina.

A pesar de ser una muy buena y eficaz técnica la misma fue infructuosa ya que no se obtuvo una recuperación del 100% de los niveles proteicos de presenilina 1 en las MEF transfectadas con p.PSEN1 WT, como puede evidenciarse en la figura 37. Por ende no se puede asegurar que la baja expresión proteica de las

mutaciones se deba efectivamente a la incompleta expresión y no a deficiencias en la transfección. Por esta razón se procedió a realizar la técnica mediante retrovirus similarmente a la realizada por De Stropper (1999).

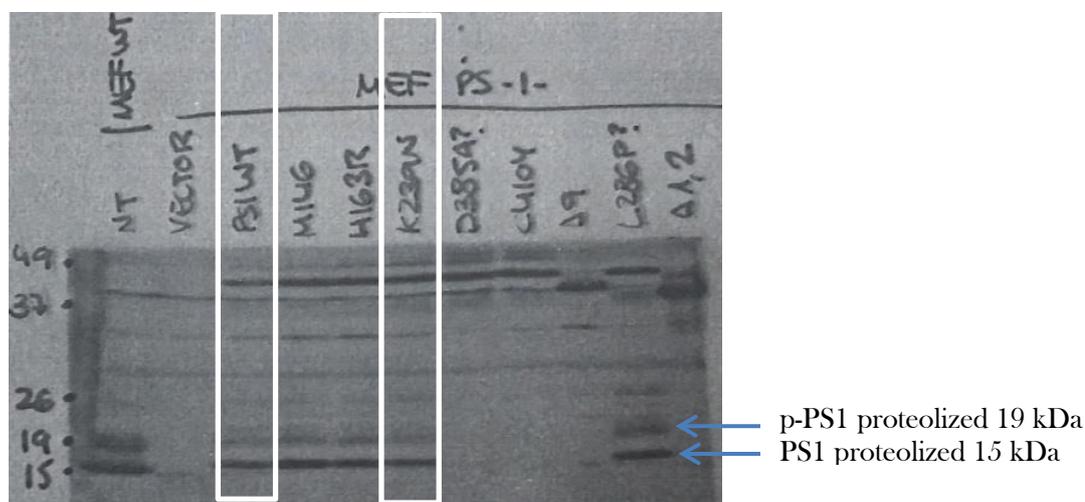


Figura 37: Expresión de presenilina 1 en las líneas celulares obtenidas por clonación y lipofección. Western blot posterior al proceso de selección donde puede evidenciarse que la expresión de las células transfectadas con p.PSEN1WT es mucho menor al control MEF WT.

1.3.2.- Generación de líneas celulares mediante clonación retroviral

Como consecuencia de que la metodología anterior fue infructuosa, se procedió a realizar otro procedimiento en el cual el objetivo era transfectar las MEF PS^{-/-}, pero esta vez con un plásmido de expresión retroviral (MSVC2.2-IRES-GFP^{II}) que permite comprobar la transfección mediante la expresión de GFP.

1.3.2.1.- Obtención de los plásmidos de p.PSEN1 mutada y ligación en vector de expresión retroviral

Con fines de mayor practicidad como ya se había hecho con anterioridad se trabajó con un solo vector, por lo que todos los genes (p.PSEN1 WT y p.L286P, p.K239N y p.E120G) fueron insertados en el pSpark® II como vector de subclonaje de gran eficiencia (Figura 38) empleando la misma técnica de mutagénesis dirigida explicada previamente.

Una vez insertadas la p.PSN1 WT y las formas mutadas en el plásmido MSVC2.2-IRES-GFP, se procedió a producir la partícula viral mediante una transfección transitoria en la línea celular HEK293, con los vectores retrovirales que contiene los genes de interés y el plásmido EcoPack™ 2-293 (Clontech) de envoltura gag-pol-env con funciones de empaquetamiento retroviral que expresa estas tres proteínas del genoma retroviral. Como reactivo de transfección se usó TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio, Madison, WI). Se recogió el medio condicionado conteniendo las partículas de retrovirus a las 24 h de la doble transfección.

1.3.2.3.- Obtención de la línea celular expresando PSEN1 WT

Una vez concluido el procedimiento de empaquetamiento retroviral se procedió a la expresión de los vectores en MEF PS-/. Se infectaron las células con el medio condicionado de HEK293 a diferentes diluciones. Se comprobó la eficiencia de transducción por observación de la fluorescencia de GFP en células fijadas y con sus núcleos teñidos con bisbenzimidida.

Los resultados fueron positivos para el constructo con el gen PSEN1 WT. La expresión de GFP fue del 100% en las células transfectadas con el vector con PSEN1 WT (figura 40) permitiendo la obtención de la primera línea celular deseada, en este caso la línea control que expresa el gen humano de PSEN1.

No se obtuvieron resultados positivos con las partículas virales que contenían las mutaciones. La expresión de estos vectores resultó irregular o negativa. Debían obtenerse nuevos constructos, quedando pendiente de procedimientos posteriores en el laboratorio.

Al resultar la metodología de clonación retroviral más eficiente fue la seleccionada, la cual ya ha sido descrita previamente como un sistema eficiente de expresión (Kitamura et al. 2003). En nuestro caso, además se introdujo el vector de nueva generación pSparkII que facilitó el clonaje.

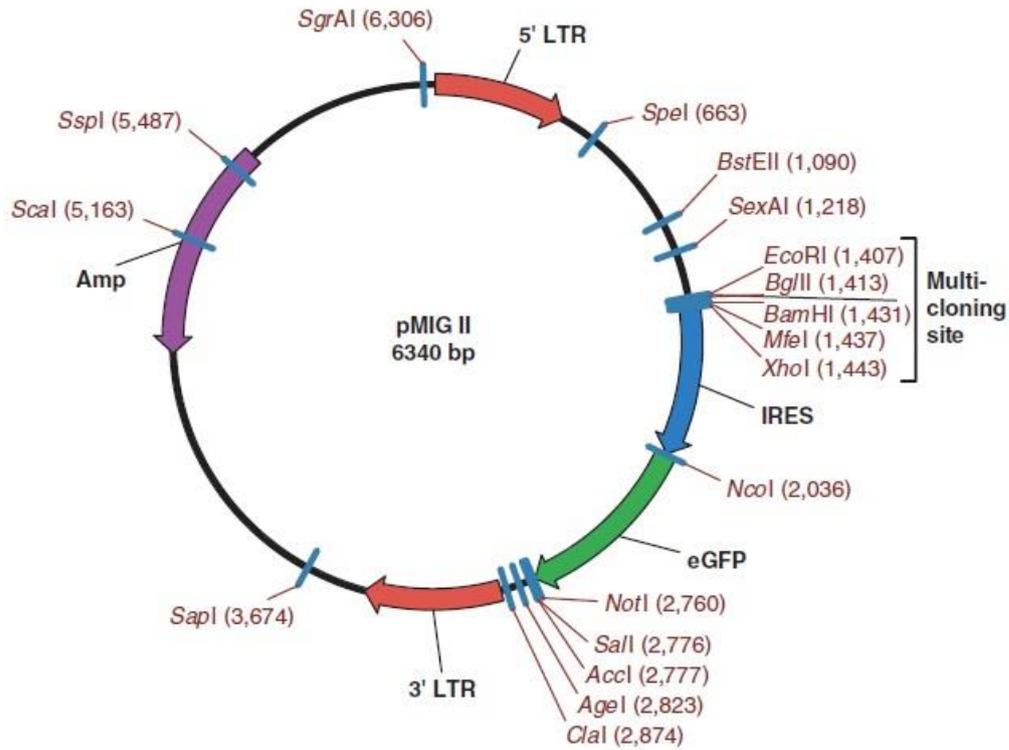


Figura 39: Mapa del vector retroviral pMSVC2.2-IRES-GFP II (Clontech)

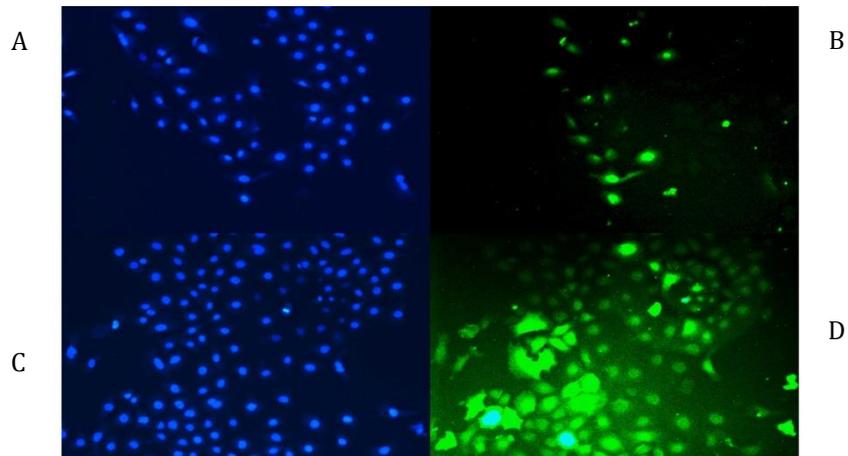


Figura 40: Expresión de PSEN1 WT mediante retrovirus. Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se evidencia la eficiencia en la expresión y transfección del MSVC2.2-PSEN1 WT en MEF KO a 2 diluciones: A y B, dilución 1/5 con una expresión del 50% aproximadamente; C y D, dilución 1/2,5 la expresión es del 100%. A y C, fluorescencia de bisbenzimidá que indica todas las células del cultivo; B y D, imágenes de fluorescencia de GFP indicando las células transducidas con el vector retroviral.

1.4.- Adenovirus

Los niveles de A β 40 y A β 42 eventualmente generados en las células MEF transfectadas con los diversos plásmidos son muy reducidos y cercanos a los límites de detección por ELISA. En la caracterización de mutaciones de PSEN1 en cuanto a la generación de A β 40 y A β 42 se proporciona como substrato APP^{swe} para aumentar la generación de los péptidos (Bentahir et al., 2006). Para ello se transfectan las diversas líneas celulares con adenovirus que expresan APP^{swe}.

Paralelamente a la generación de las líneas celulares se pusieron a punto las condiciones de infección con los adenovirus que expresan APP^{swe} (Ad-APP^{swe}) y su control APP^{wt} (Ad-APP^{wt}) y adenovirus que expresa el marcador β -galactosidasa (Ad- β gal) generado por el sistema de gen reportero LacZ. Los adenovirus se encontraban en un lisado celular cedido por el Dr. Bryce Sopher, que se conservaba congelado.

1.4.1.- Titulación de las partículas adenovirales

La titulación de adenovirus en los lisados se realizó en cultivos de células HEK293. Se procedió a infectar las HEK293 con diferentes diluciones desde 1/10⁴ a 1/10¹⁴. Se hicieron los experimentos por duplicado en placas de 96 pozos. Durante 10 días controlando la lisis celular, para así calcular el valor de PFU (unidades formadoras de placa).

Los datos promedio de PFU fueron para Ad- β gal 5,15x10⁸ PFU/mL, para Ad-APP^{wt} 1,63x10⁷ PFU/mL y para Ad-APP^{swe} 2,84x10⁸ PFU/mL.

1.4.2. Multiplicidad de infección de las partículas adenovirales

Fueron empleadas las células MEF WT infectadas con Ad- β gal para evaluar la eficiencia, controlándolas mediante la técnica de detección de β -galactosidasa en células adheridas a placa. Es importante mencionar que se emplearon como coadyuvantes SuperFect (Quiagen) y polibrene (Sigma) para obtener mayor infección a diferentes concentraciones y determinar cuál era el más eficiente.

A partir de los valores de PFU del lisado de Ad- β gal se ensayaron diversos valores de MOI (multiplicidad de infección), para conseguir un valor mínimo de 50% de MEF WT infectadas.

En la primera serie de experimentos con MOI entre 5 y 50, la eficiencia de transfección no fue suficientemente alta (Figura 41). Los dos coadyuvantes usados fueron poco efectivos, aunque polibrene parece mejorar la infectividad del vector viral.

En una segunda serie de experimentos, los cultivos se mantenían en quiescencia por reducción del suero fetal bovino 24 h antes de la infección. Con este procedimiento se obtuvieron mejores resultados, con un porcentaje de células positivas para β -galactosidasa del orden del 50% deseado al 1% de FBS y sin uso de coadyuvantes (Figura 42).

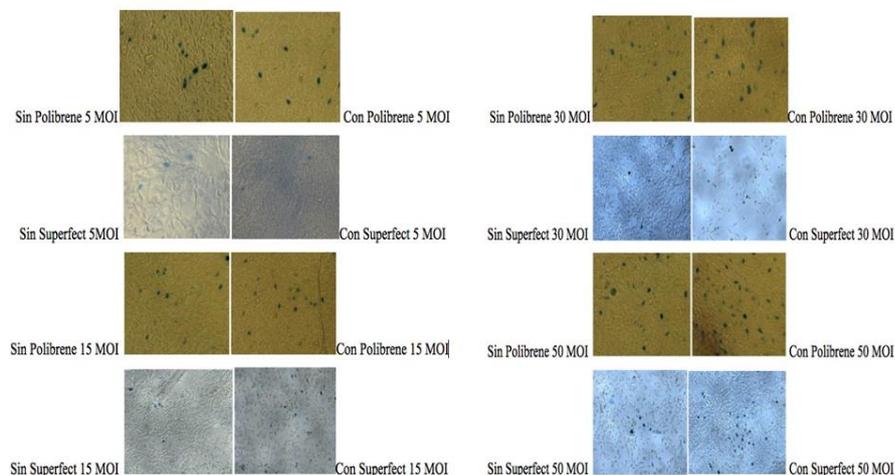


Figura 41: Transducción de Ad- β gal en MEF WT. Un MOI de 50 empleando polibrene es el presenta una transfección más eficiente sin tener aún una transfección mayor al 50%

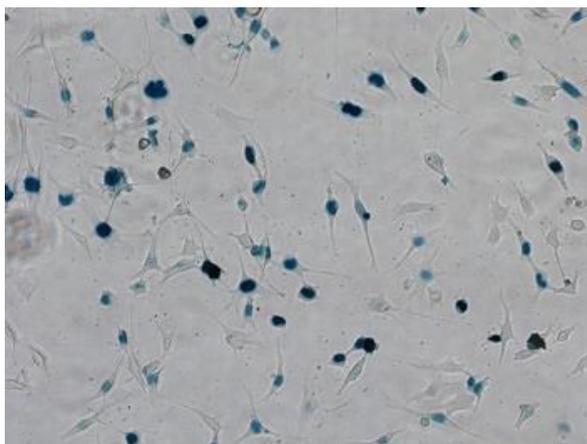


Figura 42: Transducción de Ad-βgal en MEF WT quiescentes. En cultivos quiescentes se obtuvieron valores cercanos al 50% de infección deseado al 1% de FBS y sin coadyuvante

2.- DISCUSIÓN

El uso de fibroblastos como modelo celular permite estudiar los efectos moleculares de las mutaciones de PSEN1, pero presenta limitaciones en cuanto a la caracterización de alteraciones de funciones específicamente neuronales. Para el estudio de mutaciones de PSEN1 se requería el uso de células huésped deficientes en este gen. En la comunidad científica se habían usado previamente líneas celulares derivadas de fibroblastos embrionarios de ratón, control, deficientes en presenilina 1, en presenilina 2 y en ambas enzimas, por el grupo de Bart De Strooper.

La Presenilina 1 es más esencial fisiológicamente que la presenilina 2 porque solo la deficiencia en presenilina 1 induce la muerte embrionaria y además se conocen muchas más mutaciones de EA en presenilina 1 que en presenilina 2. Sin embargo, existe duplicidad parcial de funciones de ambas proteínas, siendo presenilina 2 redundante en estos casos (Herreman et al., 1999). Por lo tanto para evidenciar los efectos de las mutaciones de PSEN1 se utilizaron células PS^{-/-}, KO para ambos genes PSEN1 y PSEN2. Diversos autores han utilizado esta misma línea celular para el estudio de mutaciones en PSEN1 (Bentahir et al., 2006;

Cacquevel et al., 2012). El uso de neuronas como célula huésped hubiera sido una alternativa recomendable pero no se tuvo acceso a esta posibilidad al inicio del trabajo. Recientemente algunos autores han obtenido células neuronales con mutaciones de PSEN1 a partir de células madre pluripotenciales inducibles (iPSC) generadas con tejido de los pacientes de EA (Sproul et al., 2014).

Las dos metodologías usadas para generar las células estables son igual de viables y factibles en la práctica, de hecho muchas son las investigaciones que han empleado la primera técnica de manera exitosa (insertar biblios de carles). Hubiese sido muy interesante poder comparar las mutaciones en estudio con las mutaciones ya conocidas (p.M146L, p.C410Y, p.H163R, y p.ΔE9) (Saura et al., 2011) y poder relacionar si sus diferencias en la regulación del procesamiento de neurexina en la sinapsis tenían una relación específica con el fenotipo asociado a las mismas, como se ha comentado anteriormente. Sería interesante probar alguna metodología que permitiera hacer dicha comparación.

Para fines de esta investigación se comprobó que, a pesar de ser un poco más engorrosa en la práctica, la metodología de transfección retroviral resulta mucho más efectiva que la transfección por lipofección.

La titulación de partículas adenovirales permitió también estipular las bases para determinar los MOI y transfectar una vez optimizado las MEF PSN +/- mutadas y poder evaluar el nivel de degradación de APP de estas mutaciones, tomando en cuenta que aquellas células transfectadas con polibrene pudiese ser una metodología más eficiente.

Este objetivo se llevó a cabo hasta la construcción de la línea celular MEF PS-/- que expresa la presenilina 1 humana. Pero debido a que no se obtuvo una expresión significativa de las mutaciones en estudio no se han podido evaluar los efectos funcionales de estas mutaciones dentro de esta tesis, como se tenía previsto.

El trabajo ha permitido el establecimiento de las condiciones experimentales para la construcción de líneas celulares con PSEN1 y el análisis de los efectos funcionales de las mutaciones de PSEN1.

Esta investigación está siendo continuada por miembros del equipo. Se han obtenido y están en fase de caracterización las líneas celulares expresando las mutaciones K239N y E120G, pero no pudo obtenerse la L286P.

DISCUSIÓN GENERAL

A lo largo de este último siglo desde que Alois Alzheimer identificó la Enfermedad de Alzheimer, mucho ha sido el camino recorrido, muchas han sido las investigaciones realizadas y distintas han sido las hipótesis generadas en relación a las causas desencadenantes de la EA.

Cuando hacemos una revisión exhaustiva encontramos siempre un patrón en común y ciertos detonantes que se mantienen constantes en todas las hipótesis, esos detonantes casi siempre son, por una parte, la vejez asociada al proceso de envejecimiento natural y por otra y muy estrechamente relacionada con la primera la producción de radicales libres, la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria.

También está ampliamente demostrado que un porcentaje muy reducido de pacientes con EA tienen una causa genética (mutaciones puntuales en genes asociados a EA), que conlleva una edad de inicio mas temprana , generalmente antes de los 65 años.

En consonancia con estas premisas, la intención de esta investigación fue contribuir al desarrollo y caracterización de modelos celulares para el estudio de mecanismos patológicos implicados en la EA y de terapias neuroprotectoras. La experimentación *in vitro* facilita el estudio de mecanismos moleculares tanto patológicos como protectores. Además, el uso de líneas celulares o cultivos primarios permite el uso de modelos experimentales alternativos al animal de laboratorio.

Numerosos son los estudios que se llevan a cabo en modelos animales *in vivo*, especialmente en ratones transgénicos para la EA (Webster et al., 2014). En la mayoría de los casos reproducen características de la EA inducidas por mutaciones familiares de *APP* y *PSEN1*. También se han modificado animales con mutaciones de *PSEN2* y con mutaciones en el gen *TAU* o *MAPT*. Los modelos animales han sido y son, muy útiles en estudios de mecanismos implicados en la EA y de

tratamientos preventivos y terapéuticos. Sin embargo, los ratones transgénicos precisan de un largo tiempo, meses o incluso hasta un año o más de edad, para que expresen las características neuropatológicas de la EA. Y aun así no llegan a presentar la atrofia cerebral de los enfermos de EA. Con lo cual son mucho más sensibles a terapias neuroprotectoras que los enfermos, llevando a falsos positivos en los tratamientos terapéuticos experimentales. Por ello el uso de modelos celulares sigue siendo una aproximación válida y complementaria a la experimentación animal en el estudio de mecanismos específicos como se discute a continuación.

Una alternativa experimental *in vitro* que se está desarrollando en la actualidad es el uso de células madre pluripotenciales y que por tanto podrían diferenciarse a neuronas o células gliales. Especialmente interesantes son las células madre pluripotenciales inducibles, conocidas por sus siglas iPSC (Wan et al., 2015). Las células iPSC se obtienen de células adultas somáticas reprogramadas a células madre embrionarias mediante un cóctel de factores de transcripción. Desafortunadamente se ha comprobado que en este proceso las células iPSC adquieren anormalidades genéticas y epigenéticas que pueden conducir a un fenotipo aberrante (Yamada et al., 2014). Esta tecnología por tanto está en sus inicios, pero permitirá en el futuro una investigación y una terapia personalizadas también en la EA. Por otra parte, la diferenciación *in vitro* de células madre embrionarias de ratón o humanas, de uso más difundido, tampoco está exenta de anormalidades fenotípicas (Bhartiya et al., 2013).

En esta tesis se propuso el desarrollo de modelos celulares para su aplicación al estudio de características fenotípicas y mecanismos patológicos de la enfermedad de Alzheimer. La finalidad última de los estudios fue definir modelos celulares de fácil uso y reproducibles, que puedan ser usados para el análisis de efectos de terapias experimentales en la enfermedad de Alzheimer.

En primer lugar se han usado cultivos primarios de células gliales, astrocitos y microglía, obtenidos del ratón de senescencia acelerada SAMP8. Como control se han empleado cultivos del ratón SAMR1 con el mismo fondo genético y sin características de envejecimiento patológico cerebral. El ratón SAMP8, como se ha comentado, presenta rasgos patológicos de la EA y se considera un modelo animal útil para el estudio de mecanismos asociados a la edad que contribuyan al desencadenamiento de la EA (Pallas et al., 2008). Los cultivos celulares reproducen, en general, las características fenotípicas de las células de los animales de los cuales se han obtenido. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo demostraron una fragilidad exacerbada contra lesiones oxidativas de los cultivos primarios de neuronas SAMP8 que está parcialmente causada por alteraciones mitocondriales (Cristòfol et al., 2012). Desde los primeros trabajos de caracterización *in vivo*, la disfunción mitocondrial se considera una alteración temprana característica en este modelo de ratón (Nishikawa et al., 1998). El siguiente paso previo a los estudios de esta tesis fue demostrar que las células gliales también reproducían esta patología. En efecto, los astrocitos de SAMP8 *in vitro* presentan alteraciones mitocondriales, estrés oxidativo y deficiente neuroprotección (García-Matas et al., 2008). En un estudio proteómico, ambos tipos celulares, neuronas y astrocitos, presentaban marcadores de EA (Díez-Vives et al., 2009).

Se procedió a caracterizar el modelo celular de astrocitos SAMP8, específicamente evaluando la producción de radicales libres en el mismo y probando la restricción calórica como posible protector cerebral, así como la respuesta inflamatoria del mismo. Como se ha citado en la descripción del modelo celular, se han utilizado cultivos primarios enriquecidos en astrocitos que contienen aproximadamente un 90% de astrocitos. El 10% de células gliales restante son en su mayoría células de microglía, mientras que las células de oligodendroglía presentes son muy escasas. Estos cultivos de SAMP8 y SAMR1 se establecieron previamente en el laboratorio (García-Matas et al., 2008). La microglía presente consideramos que no contribuye esencialmente a los cambios de estrés oxidativo. Sin embargo, la

microglía desempeña un papel crucial en los mecanismos de desencadenamiento de la inflamación, con lo cual para caracterizar los mecanismos inflamatorios se analizaron cultivos de astrocitos y cultivos puros de microglía.

En segundo lugar se ha usado una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón. Los fibroblastos son un tipo celular muy abundante en el organismo, que mantiene la integridad estructural de los tejidos conectivos y sintetiza componentes de la matriz extracelular y factores tróficos. Tienen un uso muy difundido para el análisis de mecanismos celulares y moleculares, tanto en cultivo primario como en línea celular. Son también posibles células de elección para obtener iPSC de pacientes (Luján y Wernig, 2012; Mahairaki et al., 2014), estudios que como hemos citado están todavía en fases iniciales. Las líneas celulares obtenidas por inmortalización de fibroblastos embrionarios de ratón son células ampliamente usadas para estudios de manipulación genética. En este estudio se ha usado la línea MEF KO, deficiente en los genes *PSENI* y *PSEN2*, diseñada y proporcionada por el grupo de Bart De Strooper. Estos autores demostraron la validez de esta línea celular para el estudio funcional de mutaciones de *PSENI* relacionadas con la EA (Bentahir et al., 2006). Otros autores también han usado líneas celulares de fibroblastos inmortalizados para estudios de mecanismos funcionales de PSEN1 (Saura et al., 2000; García-Matas et al., 2015; García-Mesa et al., 2011; López-Ramos, Jurado-Parras, Sanfeliu, Acuña-Castroviejo, & Delgado-García, 2012) Ma et al., 2014).

Se procedió al uso de la línea MEF KO como línea celular huésped para expresar de forma estable mutaciones de *PSENI* causantes de EA familiar. Este modelo celular permitiría el estudio de mecanismos celulares directamente inducidos por estos genes y que podrían estar implicados en la EA causantes. Se inició la ardua labor de crear líneas celulares con mutaciones *PSENI* asociadas a la EA de especial interés clínico y que pudiesen ser empleadas en investigaciones futuras.

Para abordar el primer objetivo de esta investigación se han empleado cultivos primarios de astrocitos de ratón SAMR1 y SAMP8. Los astrocitos SAMP8 mostraron un aumento de la generación de ROS y la oxidación de proteínas en comparación con los astrocitos resistentes al envejecimiento de SAMR1, los cuales son signos de envejecimiento acelerado y están relacionados con el desencadenamiento de enfermedades neurodegenerativas. Alteraciones de estrés oxidativo están presentes en el cerebro de los enfermos de EA (Chaulan y Chaulan, 2006; Nunomura et al., 2006). Asimismo, en tejido postmortem de EA se han descrito marcadas deficiencias del complejo mitocondrial III y también de los complejos I, II y IV (Hroudová et al., 2014). Alteraciones de estrés oxidativo y deficiencias de complejos mitocondriales están también presentes en los modelos de animales transgénicos de EA (García-Mesa et al., 2011; 2012; 2015). En modelos de EA *in vitro* se ha demostrado la contribución de los astrocitos al estrés oxidativo (García-Matas et al., 2010).

Se ha postulado que el estrés oxidativo es un evento primario en el desarrollo de la EA y puede ser debido a la presencia de mitocondrias disfuncionales que potenciarían la generación de ROS (LaFerla et al., 2007). Además, las mitocondrias son al mismo tiempo un objetivo de ROS provocando la oxidación de componentes mitocondriales como el ADNmt, lípidos, y proteínas que conllevan a un mayor deterioro mitocondrial (García-Escudero et al., 2013). A este respecto, en los cultivos de astrocitos SAMP8 hemos caracterizado las alteraciones de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial presentes. Hemos demostrado una elevada generación de ROS y presencia de lesiones oxidativas en las proteínas. El análisis de los diversos complejos mitocondriales induce a considerar el complejo III como el más dañado tanto a nivel funcional como estructural. La disfunción del complejo III se había demostrado previamente en tejido cerebral de SAMP8 (Fujibayashi et al., 1998), confirmándose una vez más la fidelidad de los modelos celulares respecto al animal *in vivo* en cuanto a mecanismos celulares.

Se evaluó el tratamiento con CR para determinar si existía algún efecto protector en la cascada oxidativa, encontrando que el CR disminuyó la lesión oxidativa de proteínas de los astrocitos SAMP8 e indujo un incremento de la defensa antioxidante mitocondrial y la restauración de los niveles del complejo mitocondrial III. El tratamiento con CR indujo efectos rejuvenecedores en las mitocondrias SAMP8 y en otras funciones celulares ya que se anuló la senescencia replicativa de estos cultivos. CR se utilizó como tratamiento que induce un ajuste del gasto energético y metabólico celular que lleva al desencadenamiento de vías señaladoras de neuroprotección y longevidad (Pani 2015). Los cultivos primarios de astrocitos SAMP8 con características de envejecimiento cerebral patológico demostraron ser sensibles a tratamientos protectores como el suero CR.

El segundo objetivo consistió en la caracterización de los cultivos primarios de astrocitos y de microglía de ratón SAMP8, como modelos para el estudio de la inflamación cerebral patológica en envejecimiento y EA. Los astrocitos SAMP8 han mostrado pocos cambios inflamatorios respecto a los SAMR1 en condiciones basales. Sin embargo las células microgliales SAMP8 mostraron un fenotipo inflamatorio activado. Los cultivos tratados con LPS+IFN α para analizar su respuesta a un estímulo inflamatorio agudo demostraron una respuesta exacerbada respecto a los SAMR1. Aunque no es fácil discernir la contribución de la microglía presente en los cultivos de astrocitos, la respuesta desregulada parece presentarse en mayor grado en microglía. La exacerbación de los mecanismos gliales de respuesta inflamatoria, principalmente en la microglía, podría ser el inductor de un estado crónico de inflamación cerebral en SAMP8.

Como se ha comentado en la introducción, la inflamación crónica sin resolver durante el envejecimiento puede actuar como el enlace fisiopatológico que impulsa cambios funcionales normales para convertirse en muchas de las enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (Chung et al., 2002). Por otro lado la activación microglial se ha demostrado que se correlaciona con la progresión

clínica a la etapa de demencia, estado neuropatológico, y con la etapa de progresión de la formación de placas de A β (Hoozemans et al., 2006). En efecto, inflamación y activación microglial están presentes en el cerebro de pacientes de EA (Rosén et al., 2014; Wang et al., 2015).

Paralelamente a los estudios en cultivos gliales, la caracterización realizada del estado inflamatorio del tejido cerebral de SAMP8 ha permitido comprobar la validez de nuestra aproximación *in vitro*. Efectivamente, los ratones SAMP8 a edad adulta presentaban un nivel elevado de citoquinas proinflamatorias respecto a SAMR1, como también había sido descrito por otros autores (Tha et al., 2010; Liu et al., 2013). La respuesta inflamatoria cerebral a LPS *in vivo* no había sido caracterizada previamente en estos ratones. Nuestro estudio ha demostrado que existe una exacerbación de la respuesta inflamatoria en corteza cerebral de SAMP8 respecto a SAMR1, de la misma forma que observamos *in vitro*. Sin embargo esta respuesta se reduce en edades de senescencia avanzada de 12 meses de edad en SAMP8, mientras se mantiene constante en SAMR1. En suero sanguíneo de los mismos ratones analizados, se observó una exacerbación de la respuesta inflamatoria sistémica a LPS a la edad más tardía de 12 meses de edad. En conjunto podemos concluir que los ratones SAMP8 presentan una alteración de los mecanismos de respuesta inflamatoria que contribuyen al fenotipo senescente y al desarrollo de patología cerebral cercana a EA. Este fenotipo inflamatorio cerebral ha podido ser reproducido en los cultivos de astrocitos y microglía.

Por otro lado como ya se mencionó, el tercer objetivo de esta investigación fue generar un modelo celular a partir de 3 mutaciones puntuales en el gen de la *PSENI* reportadas por los investigadores de la Unidad de Alzheimer y otros trastornos cognitivos del Hospital Clínico de Barcelona. Una de ellas (K239N) presenta una penetrancia genética incompleta a la edad de 65 años (Lladó et al., 2010), mientras que las otras dos (L286P y E120G) presentan una edad de inicio temprana de la patología (Sánchez-Valle et al., 2007). La edad media de aparición de los primeros síntomas de EA en pacientes portadores de mutaciones de *PSENI*,

se ha descrito alrededor de los 46 años (Ryman et al., 2014), si bien existe una gran variabilidad, y se desconoce la base biológica de la aparición de las manifestaciones clínicas en edades más tardías en algunos casos. Por ello el interés de desarrollar este modelo celular para su estudio.

La proteína PSEN1 forma parte del complejo γ -secretasa y por tanto, mutaciones en el gen correspondiente darán alteraciones en el clivaje de la APP y en la correspondiente generación de A β . Las mutaciones clínicas conocidas de *PSEN1* pueden inducir una multiplicidad de efectos en la estructura y la funcionalidad del complejo de γ -secretasa, aunque comúnmente se trata de un incremento de la relación A β 42/A β 40 (Bentahir et al., 2006). Además, PSEN1 está implicado en otros procesos, ya sea el procesamiento de sustratos de γ -secretasa alternativos al APP o efectos independientes de γ -secretasa. En cuanto a estos últimos, se ha descrito que las proteínas de sinaptosomas y el tejido cerebral de ratones transgénicos que llevan la mutación de EA familiar M146V o M146L en PSEN1, respectivamente, mostraron niveles aumentados de estrés oxidativo (LaFontaine 2002; Schuessel et al., 2006). El envejecimiento podría potenciar la generación de ROS en portadores de mutaciones de *PSEN1*, como se ha demostrado en los ratones transgénicos para la mutación M146L (Schuessel et al., 2006). De acuerdo con estos resultados se ha demostrado que los fibroblastos de pacientes con EA producen un aumento significativo de ROS endógeno (Naderi et al., 2006).

El estudio de mecanismos celulares y moleculares inducidos por mutaciones de *PSEN1* en un modelo celular puede contribuir en gran medida al conocimiento de la enfermedad y a su interacción con factores relacionados con el envejecimiento cerebral. El modelo celular que se ha diseñado en el presente trabajo de tesis puede facilitar el estudio de estos mecanismos. Como se expuso anteriormente, después de superar diversos problemas técnicos se han obtenido los genes de *PSEN1* humana con la proteína normal y las variantes con las mutaciones en estudio en plásmidos de clonación retroviral. Como hito significativo se ha obtenido la línea

celular que expresa la proteína PSEN1 WT en células huésped MEF KO, línea de fibroblastos deficientes en *PSEN1* y *PSEN2*. Paralelamente también se han definido las condiciones de infección con adenovirus expresando *APP* para la caracterización del metabolismo de este sustrato por las diversas variantes de PSEN1. Estos resultados demuestran la validez de las aproximaciones de ingeniería genética usadas finalmente y abre el camino para la obtención de las líneas celulares que expresen el gen de *PSEN1* con mutaciones causantes de EA y a las experimentaciones previstas.

En resumen, en esta tesis se han establecido modelos experimentales celulares para el estudio de mecanismos cerebrales de estrés oxidativo, inflamación y de mutaciones de *PSEN1*, implicados en la EA. Los estudios experimentales siguen siendo esenciales en la lucha contra esta enfermedad y para el desarrollo de terapias que puedan ser efectivas. En la actualidad se están realizando grandes avances para detectar la EA en estadios iniciales y especialmente en la fase preclínica, ya sea con la búsqueda de biomarcadores biológicos (Balasa et al., 2014; Toledo et al., 2015), refinamiento de pruebas neurocognitivas (Valech et al., 2015) o métodos de neuroimagen (Molinuevo et al., 2014; Gispert et al., 2015). Una detección precoz facilitará el ensayo de nuevas terapias y el establecimiento de programas de prevención. Para ello es de gran interés la disponibilidad de sistemas experimentales celulares que permitan el estudio de mecanismos celulares y moleculares de la EA y de nuevos agentes terapéuticos.

CONCLUSIONES

1. Los cultivos gliales enriquecidos en astrocitos SAMP8 presentan estrés oxidativo y alteraciones mitocondriales compatibles con procesos de neurodegeneración asociada al envejecimiento y EA. Estos cultivos son sensible a tratamientos protectores.

1.1.- Los astrocitos SAMP8 tienen deficiencias del complejo mitocondrial III, generan más radicales hidropéroxidos y presentan mayor carbonilación de proteínas que los astrocitos SAMR1.

1.2.- El tratamiento con suero de CR indujo una recuperación de las proteínas de los complejos mitocondriales, disminuyó la generación de ROS, aumentó la defensa antioxidante y disminuyó las lesiones oxidativas en astrocitos SAMP8.

1.3.- El suero de CR protegió a los astrocitos SAMP8 de la senescencia replicativa, revirtiendo una de las características del envejecimiento *in vitro*, efecto indicativo de rejuvenecimiento de los astrocitos senescentes.

2. Los cultivos gliales enriquecidos en astrocitos y los cultivos puros de microglía SAMP8 presentan una desregulación de los mecanismos de respuesta inflamatoria, que puede inducir procesos de neuroinflamación crónica, compatibles con procesos de neurodegeneración asociada al envejecimiento y EA. Alteraciones similares se detectan *in vivo*.

2.1.- Los cultivos de astrocitos SAMP8 presentan niveles de liberación de NO similar a los SAMR1 mientras que los cultivos de microglía SAMP8 demuestran una tendencia a mayor liberación. Morfológicamente, la microglía SAMP8 presenta un fenotipo reactivo.

2.2.- El tratamiento con LPS+IFN γ potenció la producción de NO en astrocitos y microglía SAMP8, por otro lado el tratamiento con TNF α activó y potenció la liberación de IL-6 en cultivos de microglía SAMP8

2.3.- En la corteza cerebral de ratones de 6 y 12 meses de edad no se detectan diferencias en las citoquinas proinflamatorias entre SAMP8 y SAMR1 pero el tratamiento con LPS potenció la liberación de IL-1 β y TNF α en la corteza cerebral de SAMP8 de 6 meses de edad, e indujo cambios morfológicos en la microglía. El tratamiento con LPS potenció la liberación de IL-6 en suero sanguíneo en SAMP8 de 12 meses de edad.

3. El sistema *in vitro* de células de ratón MEF, KO para *PSEN1* y *PSEN2*, permite expresar el gen humano de *PSEN1* y es de utilidad para el estudio de mutaciones de *PSEN1* de interés clínico.

3.1.- La mutagénesis dirigida permitió generar los plásmidos con 3 mutaciones puntuales de *PSEN1* de EA familiar: p.L286P, p.K239N y p.E120G, en el plásmido p.PSEN1 WT.

3.2. La técnica de transfección de los plásmidos en MEF PS $^{-/-}$ por lipofección no permitió una recuperación adecuada de los niveles proteicos de PSEN1 en las MEF transfectadas, mientras que la clonación de los mismos en un plásmido retroviral MSVC 2.2-IRES-GFP con posterior transfección en MEF PS $^{-/-}$ fue la más exitosa.

3.3.- Se establecieron las bases para la línea celular mediante la creación del constructo con el gen PSEN1 WT con una expresión del 100% en las células transfectadas y se consiguió también que con un MOI de 50 se obtiene un 50% de células positivas en cultivos quiescentes en 1% de FBS para infectar las células con los adenovirus que expresan APP^{swe}, APP^{wt} y el marcador β -galactosidasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Albert, M. S., DeKosky, S. T., Dickson, D., Dubois, B., Feldman, H. H., Fox, N. C., ... Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging and Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimer's and Dementia*, 7, 270-9.
- Ali, A. K., Banks, W. a, Kumar, V. B., Shah, G. N., Lynch, J. L., Farr, S. a, ... Morley, J. E. (2009). Nitric oxide activity and isoenzyme expression in the senescence-accelerated mouse p8 model of Alzheimer's disease: effects of anti-amyloid antibody and antisense treatments. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 64(10), 1025-30.
- Alves, L., Correia, A. S. A., Miguel, R., Alegria, P., & Bugalho, P. (2012). Alzheimer's Disease: A Clinical Practice-Oriented Review. *Frontiers in Neurology*, 3, 63.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift Fur Psychiatrie Und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146-8.
- Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in Neurosciences*, 22(5), 208-15.
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-95.
- Balasa M, Sánchez-Valle R, Antonell A, Bosch B, Olives J, Rami L, Castellví M, Molinuevo JL, Lladó A (2014). Usefulness of biomarkers in the diagnosis and prognosis of early-onset cognitive impairment. *Journal of Alzheimer's Disease* 40(4):919-27.
- Banks, W. a., & Robinson, S. M. (2010). Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(1), 102-9.
- Behl, C. (1997). Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell and Tissue Research*, 290, 471-80.
- Benson, D. F., Davis, R. J., & Snyder, B. D. (1988). Posterior cortical atrophy. *Archives of Neurology*, 45(7), 789-93.
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horr , K., Wiltfang, J., ... De Strooper, B. (2006). Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 96(3), 732-42.
- Berrios, G. E. (1990). Feelings of fatigue and psychopathology: A conceptual history. *Comprehensive Psychiatry*, 31(2), 140-51.

- Berrios, G. E. (1999). Classifications in psychiatry: a conceptual history. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 33, 145-60.
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2004). Alzheimer's disease: one disorder, too many genes? *Human Molecular Genetics*, 13 Spec No(1), R135-41.
- Bhartiya D, Nagvenkar P, Sriraman K, Shaikh A. An Overview of Pluripotent Stem Cells. In: Pluripotent Stem Cells, Bhartiya and Nibedita eds. InTechOpen 2013. ISBN 978-953-51-1192-4.
- Blasko, I., Humpel, C., & Grubeck-Loebenstien, B. (2010). Glial cells: Astrocytes and oligodendrocytes during normal brain aging. In *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 743-747).
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239-59.
- Butterfield, D. A., Bader Lange, M. L., & Sultana, R. (2010). Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(8), 924-9.
- Cacquevel, M., Aeschbach, L., Houacine, J., & Fraering, P. C. (2012). Alzheimer's disease-linked mutations in presenilin-1 result in a drastic loss of activity in purified γ -secretase complexes. *PloS One*, 7(4), e35133.
- Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., ... Frebourg, T. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *American Journal of Human Genetics*, 65(3), 664-70.
- Chauhan V, Chauhan A. (2006) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13(3):195-208.
- Chung, H. Y., Cesari, M., Anton, S., Marzetti, E., Giovannini, S., Seo, A. Y., ... Leeuwenburgh, C. (2009). Molecular inflammation: Underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, 8(1), 18-30.
- Chung, H. Y., Kim, H. J., Kim, J. W., & Yu, B. P. (2001). The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 327-35.
- Chung, H. Y., Kim, H. J., Kim, K. W., Choi, J. S., & Yu, B. P. (2002). Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microscopy Research and Technique*, 59, 264-72.

- Chung, H. Y., Lee, E. K., Choi, Y. J., Kim, J. M., Kim, D. H., Zou, Y., ... Yu, B. P. (2011). Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *Journal of Dental Research*, *90*, 830-40.
- Civitarese, A. E., Carling, S., Heilbronn, L. K., Hulver, M. H., Ukropcova, B., Deutsch, W. A., ... Ravussin, E. (2007). Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Medicine*, *4*(3), 485-94.
- Cristòfol, R., Porquet, D., Corpas, R., Coto-Montes, A., Serret, J., Camins, A., ... Sanfeliu, C. (2012). Neurons from senescence-accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. *Journal of Pineal Research*, *52*(3), 271-81.
- Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (1998). Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Annals of Medicine*, *30*, 560-5.
- Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2003). Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, *9*(4), 169-76.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, *329*(1-2), 23-38.
- Damani, M. R., Zhao, L., Fontainhas, A. M., Amaral, J., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2011). Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell*, *10*, 263-276.
- Deng, X., Li, M., Ai, W., He, L., Lu, D., Patrylo, P. R., ... Yan, X. (2014). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation Is Associated with Alzheimer-Like Amyloidogenic Axonal Pathology and Dendritic Degeneration in Rats. *Advances in Alzheimer's Disease*, *3*(2), 78-93.
- Díez-Vives, C., Gay, M., García-Matas, S., Comellas, F., Carrascal, M., Abian, J., ... Sanfeliu, C. (2009). Proteomic study of neuron and astrocyte cultures from senescence-accelerated mouse SAMP8 reveals degenerative changes. *Journal of Neurochemistry*, *111*(4), 945-55.
- Donato, R. (2001). S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *33*(7), 637-68.
- Doyle, D. (1978). The Fine Structure of the Nervous System: The Neurons and Supporting Cells. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *41*, 191-2.

- Drachman, D. A. (2006). Aging of the brain, entropy, and Alzheimer disease. *Neurology*, *67*, 1340-52.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., ... Scheltens, P. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: A new lexicon. *The Lancet Neurology*, *9*(11), 1118-27.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., DeKosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., ... Scheltens, P. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurology*, *6*(8), 734-46.
- Dudal, S., Krzywkowski, P., Paquette, J., Morissette, C., Lacombe, D., Tremblay, P., & Gervais, F. (2004). Inflammation occurs early during the A β deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiology of Aging*, *25*, 861-871.
- Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience*, *158*(3), 1021-9.
- Eng, L. F. (1985). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, *8*, 203-14.
- Engelhart, M. J., Geerlings, M. I., Meijer, J., Kiliaan, A., Ruitenber, A., van Swieten, J. C., ... Breteler, M. M. B. (2004). Inflammatory proteins in plasma and the risk of dementia: the rotterdam study. *Archives of Neurology*, *61*, 668-72.
- Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Hall, K., ... Disease, A. (2010). Global prevalence of dementia : a Delphi consensus study, *366*(9503), 2112-7.
- Fields, R. D., Araque, A., Johansen-Berg, H., Lim, S.-S., Lynch, G., Nave, K.-A., ... Wake, H. (2013). Glial Biology in Learning and Cognition. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, *20*(5), 426-31.
- Forabosco, P., Ramasamy, A., Trabzuni, D., Walker, R., Smith, C., Bras, J., ... Ryten, M. (2013). Insights into TREM2 biology by network analysis of human brain gene expression data. *Neurobiology of Aging*, *34*, 2699-714.
- Fortea, J., Lladó, A., Clarimón, J., Lleó, A., Oliva, R., Peri, J., ... Sánchez-Valle, R. (2011). PICOGEN: Five years experience with a genetic counselling program for dementia. *Neurología (English Edition)*, *26*(3), 143-9.
- Frank-Cannon, T. C., Alto, L. T., McAlpine, F. E., & Tansey, M. G. (2009). Does

- neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? *Molecular Neurodegeneration*, 4, 47.
- Freeman, M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 330, 774-8.
- Fujibayashi, Y., Yamamoto, S., Waki, A., Konishi, J., & Yonekura, Y. (1998). Increased mitochondrial DNA deletion in the brain of SAMP8, a mouse model for spontaneous oxidative stress brain. *Neurosci Lett*, 254(2), 109-112.
- Gabbita, S. P., Lovell, M. A., & Markesbery, W. R. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 71, 2034-40.
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., ... Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373, 523-527.
- García-Escudero, V., Martín-maestro, P., Perry, G., & Avila, J. (2013). Deconstructing Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013:162152.
- García-Matas, S., Gutierrez-Cuesta, J., Coto-Montes, A., Rubio-Acero, R., Díez-Vives, C., Camins, A., ... Cristòfol, R. (2008). Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell*, 7(5), 630-40.
- García-Matas, S., Paul, R. K., Molina-Martínez, P., Palacios, H., Gutierrez, V. M., Corpas, R., ... Sanfeliu, C. (2015). In vitro caloric restriction induces protective genes and functional rejuvenation in senescent SAMP8 astrocytes. *Aging Cell*, 14(3), 334-44.
- García-Mesa, Y., López-Ramos, J. C., Giménez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., ... Sanfeliu, C. (2011). Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 24, 421-54.
- Gella, A., & Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease, 3(1), 88-93.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 45.
- Gispert JD, Rami L, Sánchez-Benavides G, Falcon C, Tucholka A, Rojas S, Molinuevo JL (2015). Nonlinear cerebral atrophy patterns across the Alzheimer's disease continuum: impact of APOE4 genotype. *Neurobiology of Aging*, 36(10):2687-701.

- Glenner, G. G. (1979). Congophilic microangiopathy in the pathogenesis of Alzheimer's syndrome (presenile dementia). *Medical Hypotheses*, *5*, 1231-6.
- Goldgaber, D., Harris, H. W., Hla, T., Maciag, T., Donnelly, R. J., Jacobsen, J. S., ... Gajdusek, D. C. (1989). Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*, 7606-10.
- Gonçalves, C. A., Concli Leite, M., & Nardin, P. (2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical Biochemistry*, *41*(10-11), 755-63
- Gordon, M. N., Holcomb, L. A., Jantzen, P. T., DiCarlo, G., Wilcock, D., Boyett, K. W., ... Morgan, D. (2002). Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse. *Experimental Neurology*, *173*, 183-95.
- Gorno-Tempini, M. L., Hillis, a E., Weintraub, S., Kertesz, a, Mendez, M., Cappa, S. F., ... Grossman, M. (2011). Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*, *76*, 1-10.
- Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*, 89-105.
- Gray, E. G. (1971). The Fine Structure of the Nervous System. *Journal of Anatomy*, *108*, 198.
- Gsell, W., Strein, I., & Riederer, P. (1996). The neurochemistry of Alzheimer type, vascular type and mixed type dementias compared. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, *47*, 73-101.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, *297*, 353-6.
- Harrington, C. R., & Colaco, C. A. (1994). Alzheimer's disease. A glycation connection. *Nature*, *370*(6487), 247-8.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. El, Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *14*(4), 388-405.
- Henriksen, T., & Endresen, M. (1994). Oxidative stress and antioxidants. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Raekke*,

114, 328-30.

- Herreman, a, Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., ... De Strooper, B. (1999). Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(21), 11872-7.
- Herrup, K. (2010). Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*, 16755-62.
- Hol, E. M., Roelofs, R. F., Moraal, E., Sonnemans, M. A. F., Sluijs, J. A., Proper, E. A., ... van Leeuwen, F. W. (2003). Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Molecular Psychiatry*, *8*, 786-96.
- Hoozemans, J. J. M., Veerhuis, R., Rozemuller, J. M., & Eikelenboom, P. (2006). Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *24*, 157-65.
- Hroudová J, Singh N, Fišar Z. (2014). Mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases: relevance to Alzheimer's disease. *Biomedical Research International*, 2014:175062.
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., ... Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, *274*, 99-102.
- Hyun, D. H., Hernandez, J. O., Mattson, M. P., & de Cabo, R. (2006). The plasma membrane redox system in aging. *Ageing Research Reviews*, *5*(2), 209-20.
- Jørgensen, M. B., Finsen, B. R., Jensen, M. B., Castellano, B., Diemer, N. H., & Zimmer, J. (1993). Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus. *Experimental Neurology*, *120*, 70-88.
- Kasuga, K., Shimohata, T., Nishimura, A., Shiga, A., Mizuguchi, T., Tokunaga, J., ... Ikeuchi, T. (2009) Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *80*(9), 1050-2.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, *91*, 461-553.

- Kong, Q., & Lin, C.-L. G. (2010). Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, *67*, 1817-29.
- Konsman, J. P., Parnet, P., & Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences*, *25*(3), 154-9.
- Krstic, D., & Knuesel, I. (2013). Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, *9*, 25-34.
- Kumar-Singh, S., Theuns, A. J., Broeck, B. Van, Pirici, D., Vennekens, K., Corsmit, E., ... Broeckhoven, C. Van. (2006). Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Human Mutations*, *27*(7), 686-95.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*, 499-509.
- LaFontaine MA1, Mattson MP, Butterfield DA (2002). Oxidative stress in synaptosomal proteins from mutant presenilin-1 knock-in mice: implications for familial Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, *27*(5):417-21.
- Lemere, C. A., Blusztajn, J. K., Yamaguchi, H., Wisniewski, T., Saido, T. C., & Selkoe, D. J. (1996). Sequence of deposition of heterogeneous amyloid beta-peptides and APO E in Down syndrome: implications for initial events in amyloid plaque formation. *Neurobiology of Disease*, *3*, 16-32.
- Lewis, J., McGowan, E., Rockwood, J., Melrose, H., Nacharaju, P., Van Slegtenhorst, M., ... Hutton, M. (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics*, *25*, 402-5.
- Li, H., Wetten, S., Li, L., St Jean, P. L., Upmanyu, R., Surh, L., ... Roses, A. D. (2008). Candidate single-nucleotide polymorphisms from a genomewide association study of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *65*(1), 45-53.
- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, *443*, 787-95.
- Liu J , Hu G, Xu R, Qiao Y, Wu HP, Ding X, Duan P, Tu P, Lin YJ. (2013) Rhein lysinate decreases the generation of β -amyloid in the brain tissues of Alzheimer's disease model mice by inhibiting inflammatory response and oxidative stress. *J Asian Natural Products Research*, *15*(7):75663.
- Lladó, A., Fortea, J., Ojea, T., Bosch, B., Sanz, P., Valls-Solé, J., ... Sánchez-Valle,

- R. (2010). A novel PSEN1 mutation (K239N) associated with Alzheimer's disease with wide range age of onset and slow progression. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 17(7), 994-6.
- López-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., ... de Cabo, R. (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1768-73.
- López-Ramos, J. C., Jurado-Parras, M. T., Sanfeliu, C., Acuña-Castroviejo, D., & Delgado-García, J. M. (2012). Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 627.e13-26.
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., & Yankner, B. A. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429, 883-91.
- Mann, D. M. A., Jones, D., Snowden, J. S., Neary, D., & Hardy, J. (1992). Pathological changes in the brain of a patient with familial Alzheimer's disease having a missense mutation at codon 717 in the amyloid precursor protein gene. *Neuroscience Letters*, 137, 225-8.
- Marques, F., Sousa, J. C., Sousa, N., & Palha, J. A. (2013). Blood-brain-barriers in aging and in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 8, 38.
- Masoro, E. J. (1993). Dietary restriction and aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 41, 994-999.
- Mattison, J. A., Roth, G. S., Beasley, T. M., Tilmont, E. M., Handy, A. M., Herbert, R. L., ... de Cabo, R. (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*, 489(7415), 318-21.
- Mattson, M. P. (2005). Energy intake, meal frequency, and health: a neurobiological perspective. *Annual Review of Nutrition*, 25, 237-60.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 21, 195-218.
- McKhann, G. M., Drachman, D., Folstein, M. F., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health

- and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, *34*, 939-44.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., ... Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, *7*(3), 263-9.
- Melov, S., Adlard, P. A., Morten, K., Johnson, F., Golden, T. R., Hinerfeld, D., ... Bush, A. I. (2007). Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS ONE*, *2*(6), e536.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, *7*(9), 405-10.
- Molinuevo JL, Ripolles P, Simó M, Lladó A, Olives J, Balasa M, Antonell A, Rodriguez-Fornells A, Rami L. (2014). White matter changes in preclinical Alzheimer's disease: a magnetic resonance imaging-diffusion tensor imaging study on cognitively normal older people with positive amyloid β protein 42 levels. *Neurobiology of Aging*, *35*(12):2671-80
- Mosher, K. I., & Wyss-Coray, T. (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, *88*(4), 594-604.
- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2001). The role of activated astrocytes and of the neurotrophic cytokine S100B in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *22*, 915-22.
- Munch, G., Thome, J., Foley, P., Schinzel, R., & Riederer, P. (1997). Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, *23*, 134-13.
- Naderi J, Lopez C, Pandey S. (2006). Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mechanisms of Ageing and Development*, *127*(1):25-35.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., & Noguchi, N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*(1), 668-76.
- Nishikawa, T., Takahashi, J. A., Fujibayashi, Y., Fujisawa, H., Zhu, B., Nishimura, Y., ... Hosokawa, M. (1998). An early stage mechanism of the age-associated mitochondrial dysfunction in the brain of SAMP8 mice; an age-associated

- neurodegeneration animal model. *Neuroscience Letters*, 254(2), 69-72.
- Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M. A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., & Smith, M. A. (1999). RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19, 1959-64.
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., ... Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26, 10129-40.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39, 409-21.
- Overk, C. R., & Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 508-16.
- Pallas, M., Camins, A., Smith, M., Perry, G., Lee, H., & Casadesus, G. (2008). From aging to Alzheimer's disease: unveiling "the switch" with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 15, 615-24.
- Pasinetti, G. M., Wang, J., Porter, S., & Ho, L. (2011). Caloric intake, dietary lifestyles, macronutrient composition, and alzheimer' disease dementia. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011, 806293.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*, 32(8), 421-31.
- Perea, G., Sur, M., & Araque, A. (2014). Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 378.
- Pérez, V. I., Bokov, A., Remmen, H. Van, Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(10), 1005-14.
- Perrig, W. J., Perrig, P., & Stähelin, H. B. (1997). The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45, 718-24.

- Pertusa, M., García-Matas, S., Rodríguez-Farré, E., Sanfeliu, C., & Cristòfol, R. (2007). Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*, *101*, 794-805.
- Peters, A. (2007). Golgi, Cajal, and the fine structure of the nervous system. *Brain Research Reviews*, *55*(2), 256-63.
- Podtelezchnikov, A. a, Tanis, K. Q., Nebozhyn, M., Ray, W. J., Stone, D. J., & Loboda, A. P. (2011). Molecular insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease and its relationship to normal aging. *PloS One*, *6*(12), e29610.
- Poulsen, H. E., Specht, E., Broedbaek, K., Henriksen, T., Ellervik, C., Mandrup-Poulsen, T., ... Weimann, A. (2012). RNA modifications by oxidation: A novel disease mechanism? *Free Radical Biology and Medicine*, *52*(8), 1353-61.
- Pro, J. D., Smith, C. H., & Sumi, S. M. (1980). Presenile Alzheimer disease: amyloid plaques in the cerebellum. *Neurology*, *30*, 820-5.
- Redman, L. M., & Ravussin, E. (2011). Caloric restriction in humans: impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(2), 275-87.
- Reitz, C., Brayne, C., & Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nature Reviews. Neurology*, *7*, 137-52.
- Rezaie, P., & Male, D. (2002). Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *Journal of the History of the Neurosciences*, *11*, 325-74.
- Ribeiro, L. C., Rodrigues, L., Quincozes-Santos, A., Tramontina, A. C., Bambini-Junior, V., Zanotto, C., ... Gottfried, C. (2012). Caloric restriction improves basal redox parameters in hippocampus and cerebral cortex of Wistar rats. *Brain Research*, *1472*, 11-9.
- Rossi, D., & Volterra, A. (2009). Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, *80*(4-5), 224-32.
- Roth, M., Tomlinson, B. E., & Blessed, G. (1967). The relationship between quantitative measures of dementia and of degenerative changes in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *60*, 254-60.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Le Meur, N., Laquerrière, A., Vital, A., ... Campion, D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics*, *38*, 24-6.

- Ryman DC, Acosta-Baena N, Aisen PS, Bird T, Danek A, Fox NC, Goate A, Frommelt P, Ghetti B, Langbaum JB, Lopera F, Martins R, Masters CL, Mayeux RP, McDade E, Moreno S, Reiman EM, Ringman JM, Salloway S, Schofield PR, Sperling R, Tariot PN, Xiong C, Morris JC, Bateman RJ; Dominantly Inherited Alzheimer Network. (2014). Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, *83*(3):253-60.
- Salminen, A., Ojala, J., Kaarniranta, K., Haapasalo, A., Hiltunen, M., & Soininen, H. (2011). Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *The European Journal of Neuroscience*, *34*, 3-11.
- Sánchez-Valle, R., Lladó, a, Ezquerra, M., Rey, M. J., Rami, L., & Molinuevo, J. L. (2007). A novel mutation in the PSEN1 gene (L286P) associated with familial early-onset dementia of Alzheimer type and lobar haematomas. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, *14*(12), 1409-12.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-7.
- Saura, C. a, Choi, S.-Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B. S., ... Shen, J. (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, *42*(1), 23-36.
- Saura, C. A., Servián-Morilla, E., & Scholl, F. G. (2011). Presenilin/ γ -secretase regulates neurexin processing at synapses. *PLoS ONE*, *6*(4), 1435-9.
- Sayre, L. M., Perry, G., & Smith, M. A. (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *21*, 172-88.
- Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Stürenburg, H. J., Mann, U., ... Beisiegel, U. (2000). Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *28*, 351-60.
- Schmidt, R., Schmidt, H., Curb, J. D., Masaki, K., White, L. R., & Launer, L. J. (2002). Early inflammation and dementia: a 25-year follow-up of the Honolulu-Asia Aging Study. *Annals of Neurology*, *52*, 168-74.
- Schuessel K1, Frey C, Jourdan C, Keil U, Weber CC, Müller-Spahn F, Müller WE, Eckert A. 82006). Aging sensitizes toward ROS formation and lipid peroxidation in PS1M146L transgenic mice. *Free Radical Biology and Medicine*, *40*(5), 850-

62.

- Selkoe, D. J. (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*, 18295-18298.
- Selkoe, D. J. (2006). Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism: a reprise. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *9*, 163-8.
- Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., Joachim, C. L., Vickers, E. A., Lee, G., Fritz, L. C., & Oltersdorf, T. (1988). Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*, 7341-5.
- Seltzer Ben. (2014). Efficacy of Donepezil in Early-Stage Alzheimer Disease, *61*, 1852-6.
- Slegers, K., Brouwers, N., Gijssels, I., Theuns, J., Goossens, D., Wauters, J., ... Van Broeckhoven, C. (2006). APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*, *129*, 2977-83.
- Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., & Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1502*(1), 139-44.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*, 7-35.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7-35.
- Sperling, R. a., Aisen, P. S., Beckett, L. a., Bennett, D. a., Craft, S., Fagan, A. M., ... Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimer's and Dementia*, *7*, 280-92.
- Sprott, R. L., & Austad, S. N. (2006). Historical Development of Animal Models of Aging. In *Handbook of Models for Human Aging*, editor Conn M., Elsevier, pp. 1-8.
- Sproul, A. a, Jacob, S., Pre, D., Kim, S. H., Nestor, M. W., Navarro-Sobrinho, M., ... Noggle, S. a. (2014). Characterization and molecular profiling of PSEN1 familial Alzheimer's disease iPSC-derived neural progenitors. *PloS One*, *9*(1), e84547.
- Srikanth, V., Maczurek, A., Phan, T., Steele, M., Westcott, B., Juskiw, D., &

- Münch, G. (2011). Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, *32*(5), 763-77.
- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, *40*, 1250-8.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., ... Sommer, B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, 13287-92.
- Sultana, R., & Butterfield, D. A. (2011). Brain Protein Oxidation and Modification for Good or for Bad in Alzheimer's Disease. *Neurochemical Mechanisms in Disease*, editores Butterfield and Blass, Springer, pp 585-605.
- Takeda, T. (2009). Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochemical Research*, *34*, 639-59.
- Takeda, T., Hosokawa, M., & Higuchi, K. (1997). Senescence-Accelerated Mouse (SAM): A novel murine model of senescence. *Experimental Gerontology*, *32*, 105-9.
- Taylor, K. I., Probst, A., Miserez, A. R., Monsch, A. U., & Tolnay, M. (2008). Clinical course of neuropathologically confirmed frontal-variant Alzheimer's disease. *Nature Clinical Practice. Neurology*, *4*(4), 226-32.
- Teismann, P., & Schulz, J. B. (2004). Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell and Tissue Research*, *318*, 149-61.
- Tha, K. K., Okuma, Y., Miyazaki, H., Murayama, T., Uehara, T., Hatakeyama, R., ... Nomura, Y. (2000). Changes in expressions of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the brain of senescence accelerated mouse (SAM) P8. *Brain Research*, *885*(1), 25-31.
- Theuns, J. (2003). Alzheimer-associated C allele of the promoter polymorphism -22C>T causes a critical neuron-specific decrease of presenilin 1 expression. *Human Molecular Genetics*, *12*(8), 869-77.
- Toledo JB, Zetterberg H, van Harten AC, Glodzik L, Martinez-Lage P, Bocchio-Chiavetto L, Rami L, Hansson O, Sperling R, Engelborghs S, Osorio RS, Vanderstichele H, Vandijck M, Hampel H, Tepl S, Moghekar A, Albert M, Hu WT, Monge Argilés JA, Gorostidi A, Teunissen CE, De Deyn PP, Hyman BT,

- Molinuevo JL, Frisoni GB, Linzasoro G, de Leon MJ, van der Flier WM, Scheltens P, Blennow K, Shaw LM, Trojanowski JQ; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2015). Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarker in cognitively normal subjects. *Brain*, 138:2701-15.
- Uchida, K. (1999). Current status of acrolein as a lipid peroxidation product. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(5), 109-13.
- Valech N, Mollica MA, Olives J, Tort A, Fortea J, Lleo A, Belén SS, Molinuevo JL, Rami L. (2015). Informants' Perception of Subjective Cognitive Decline Helps to Discriminate Preclinical Alzheimer's Disease from Normal Aging. *Journal of Alzheimer's Disease*, 48, Suppl 1:S87-98.
- Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C. Y., & Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 7, 399-412.
- Wan W, Cao L, Kalionis B, Xia S, Tai X. (2015). Applications of Induced Pluripotent Stem Cells in Studying the Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells International*, 2015, 382530.
- Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Translational Medicine*, 3(10):136.
- Wang, X., Puerta, E., Cedazo-Minguez, A., Hjorth, E., & Schultzberg, M. (2014). Insufficient Resolution Response in the Hippocampus of a Senescence-Accelerated Mouse Model - SAMP8. *Journal of Molecular Neuroscience*, 55(2), 396-405.
- Webster, S. J., Bachstetter, A. D., Nelson, P. T., Schmitt, F. a., & Van Eldik, L. J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: An overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*, 5(APR), 1-23.
- Weindruch, R., Walford, R. L., Fligiel, S., & Guthrie, D. (1986). The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *The Journal of Nutrition*, 116, 641-54.
- Wenk, G. L. (2003). Neuropathologic changes in Alzheimer's disease. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 64 Suppl 9, 7-10.
- Wollen, K. A. (2010). Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 15, 223-44.

- Wong, A., Lüth, H. J., & Deuther-Conrad, W. (2001). Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease. *Brain Research*, *920*, 32-40.
- Wu, Y., Zhang, A. Q., & Yew, D. T. (2005). Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochemistry International*, *46*, 565-74.
- Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*, *12*, 1005-5.
- Xu, J., Shi, C., Li, Q., Wu, J., Forster, E. L., & Yew, D. T. (2007). Mitochondrial dysfunction in platelets and hippocampi of senescence-accelerated mice. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *39*(2), 195-202.
- Yamada Y, Haga H, Yamada Y. Concise review: dedifferentiation meets cancer development: proof of concept for epigenetic cancer. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3(10):1182-7.
- Yu, B. P., & Chung, H. Y. (2006). Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, *127*, 436-43.