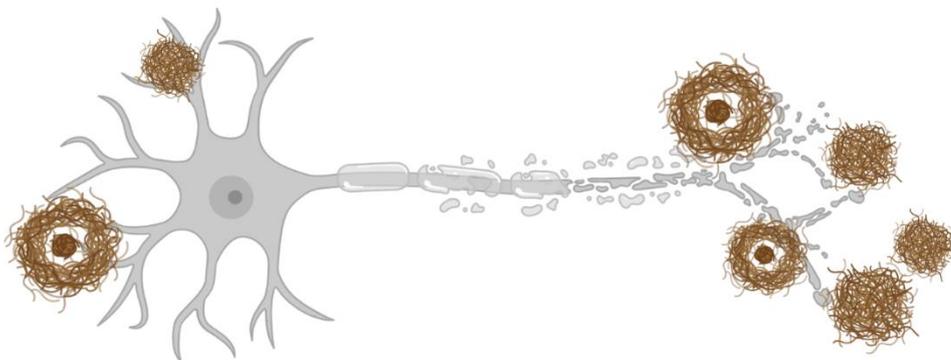




Universidad de Valladolid

Trabajo de Fin de Grado:

Estudio de la función de Apolipoproteína D en
la peroxidación lipídica por
péptido amiloide



Curso 2022-2023

Autora: Cecilia Tejero García

Tutores: Diego Sánchez Romero y Jorge Mondéjar Durán

ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 Enfermedad de Alzheimer	4
2.2 Apolipoproteína D	7
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Revisión bibliográfica	8
4.2 Modelo celular SH-SY5Y APP _{swe}	9
4.3 Caracterización de la línea celular SH-SY5Y APP _{swe}	9
4.3.1 Curva de proliferación.....	9
4.3.2 Diseño de oligonucleótidos del gen APP _{swe}	10
4.3.4 Extracción de RNA y obtención de DNA complementario	10
4.3.5 RT-PCR para validación del plásmido Swedish en línea celular SH-SY5Y APP _{swe}	10
4.3.6 qRT-PCR para cuantificación de la expresión de ApoD en SH-SY5Y APP _{swe}	10
4.5 Técnica de ELISA para cuantificación de ApoD secretada por células HeLa	11
4.6 Ensayo TBARS para medir la peroxidación lipídica de la línea celular SH-SY5Y APP _{swe}	11
5. RESULTADOS	12
5. 1 Caracterización de la línea celular SH-SY5Y APP _{swe}	12
5.1.1 Curva de proliferación.....	12
5.1.2 Pureza y cuantificación de la extracción del RNA.....	13
5.1.3 Validación del plásmido <i>Swedish</i> mediante RT-PCR	14
5.1.4 Cuantificación de la expresión de ApoD en SH-SY5Y APP _{swe} mediante qRT-PCR	14
5.3 Cuantificación de ApoD en suero de células HeLa mediante técnica de ELISA.....	16
5.4 Efecto de ApoD sobre la peroxidación lipídica de las células SH-SY5Y APP _{swe} mediante ensayo TBARS.....	16
6. DISCUSIÓN	17
7. CONCLUSIONES	19

8. BIBLIOGRAFÍA	19
9. AGRADECIMIENTOS	21
10. ANEXOS	21
ANEXO 1: MÉTODOS Y MATERIALES.....	21

1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la primera causa de demencia en el mundo afectando a entre un 60-70% de los 55 millones de personas que la padecen [1]. En el tejido cerebral de estos pacientes se encuentran acúmulos de placas β -amiloide y ovillos neurofibrilares de proteína tau fosforilada que condicionan un aumento del estrés oxidativo que sufren las células. La Apolipoproteína D (ApoD), un estudiado agente neuroprotector por su efecto reductor sobre los lípidos peroxidados de membrana, podría tener un efecto potenciador de la respuesta celular ante el estrés oxidativo que se da la enfermedad de Alzheimer. Para comprobar esta hipótesis se ha caracterizado un modelo neuronal de Alzheimer hereditario sobreproductor del péptido A β , pudiendo discriminar la variante mutante generadora de enfermedad y comprobando la expresión de ApoD. Se ha probado mediante TBARS el estado oxidativo de las membranas en el modelo tras la adición de ApoD procedente de la línea celular HeLa para ver su efecto. No se ha conseguido dilucidar el efecto de ApoD por problemas en la técnica, lo que abre el abanico experimental para intentar observar su efecto de otra manera.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer constituye la primera causa de demencia en el mundo [1] y afecta a unos 35 millones de personas (800.000 en España [2]). En 2020, la demencia fue la segunda causa de muerte en países de altos ingresos, tan solo por detrás de la cardiopatía isquémica [3].

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa por acúmulo de placas de β -amiloide (A β) extracelulares y de ovillos neurofibrilares intracelulares (ONF) en lóbulos temporales y parietales predominantemente, que genera un deterioro cognitivo progresivo hasta ocasionar una demencia con pérdida de autonomía. Clínicamente, se habla de un continuo o *continuum* de Enfermedad de Alzheimer, conformado por una fase asintomática en la que ya hay depósitos de A β y ONF [4] que una vez causan suficiente daño neuronal, condicionan un estado prodrómico con deterioro cognitivo leve que, con los años, progresa a una demencia [5]. La duración completa de todo el proceso varía en función de características como la edad, el sexo o la genética. Un estudio promedió en 20 años la duración completa del *continuum* para pacientes de 70 años, abarcando diez años la fase preclínica [6]. Es por ello, que se están desarrollando marcadores para el diagnóstico precoz (péptido A β 1-42, proteína tau total y tau fosforilada 181 en líquido cefalorraquídeo, PET de amiloide y tau cerebral [7]) ya que resulta prometedor el poder frenar la toxicidad de A β y tau en la fase aún asintomática de la enfermedad.

Le enfermedad de Alzheimer aparece de media a partir de los 65 años de manera esporádica

y su prevalencia aumenta progresivamente con la edad, siendo un 5% entre los 65 y 75 años, y alcanzando un 33% en mayores de 85 años [8]. Dentro del Alzheimer esporádico, también existen alelos familiares que confieren un riesgo aumentado de padecer la enfermedad, concretamente el que presenta mayor fuerza de asociación es el alelo $\epsilon 4$ de la Apolipoproteína E. No obstante, existen también casos de Alzheimer hereditario familiar originado por mutaciones en genes (PSEN 1, PSEN 2, TREM 2, APP) que condicionan una mayor síntesis de A β por procesamiento alterado de la proteína precursora de amiloide (APP) y producen manifestaciones precoces de la enfermedad a los 30-50 años [7].

La patogenia del Alzheimer continúa sin haber sido esclarecida completamente a pesar de los más de cien años acontecidos ya desde su descubrimiento en 1906 por el doctor Alois Alzheimer. Ya en aquel momento, este neurólogo observó agregados de β -amiloide y ovillos neurofibrilares en el cerebro de una paciente fallecida con pérdidas de memoria y deterioro general de las funciones cognitivas [9]. Estos dos hallazgos histológicos son considerados aun hoy en día los pilares de la patogenia de la enfermedad.

El péptido A β proviene de la proteólisis de la proteína precursora de amiloide ubicada en el cromosoma 21. APP está relacionada con el crecimiento y la adhesión celular, con la migración y maduración de los precursores neuronales y con la sinaptogénesis durante el desarrollo embrionario, aunque se desconocen los mecanismos concretos por los que desempeñaría estas funciones [10]. Es una proteína transmembrana con un dominio extracelular N-terminal, otro transmembrana y un último dominio intracelular C-terminal. Esta proteína puede ser procesada por tres enzimas diferentes: las α , β y γ secretasas. En función del procesamiento que sufra el dominio N-terminal donde se ubica el fragmento A β , se generará péptido β -amiloide o no.

La α -secretasa que corta a APP por su dominio extracelular rompiendo la secuencia del péptido A β e impidiendo su formación. Es, por tanto, la vía de procesamiento de APP no amiloidogénica y la que tiene lugar mayoritariamente de forma fisiológica en el organismo. Con el procesamiento posterior de la γ -secretasa se libera el fragmento P3 al medio extracelular y otro fragmento denominado AICD (dominio intracelular de APP) al citosol. En cambio, la vía de la β -secretasa corta por el dominio extracelular en el sitio del extremo C-terminal del péptido A β , que queda íntegro unido al resto de APP. Secuencialmente, la γ -secretasa (complejo enzimático formado por cuatro subunidades Presenilina 1 o 2, nicastrina, APH-1 y PEN2), corta a APP en su porción transmembrana generando el dominio C-terminal del péptido A β que ya se desprende de la membrana. La γ -secretasa puede cortar en varios sitios del dominio transmembrana generando péptidos A β de distinta longitud: A β -40 (de 40 residuos) que es el más abundante (90%), A β -42 (<10%) y A β -37/38 (minoritario). A mayores, en el extremo C terminal de APP la γ -secretasa libera el fragmento AICD al citosol.

De forma constitutiva, la proteína APP tras su maduración migra a la membrana, donde es procesada mayoritariamente por la α -secretasa. No obstante, en torno al 90% del APP es rápidamente internalizado de nuevo por interacción del dominio YENPTY del extremo C-terminal de APP. Una fracción de esa proteína se degradará en los lisosomas y otra se reciclará de vuelta a la membrana mediante tráfico endosomal que involucra al aparato de Golgi. Diversos estudios han demostrado que la vía amiloidogénica de procesamiento de APP ocurre en este segundo procesamiento más que en la membrana plasmática, concretamente en balsas o *rafts* lipídicos de las membranas de los orgánulos intracelulares [10]. Esta hipótesis concuerda con la menor cantidad de A β que se genera por mutaciones que impiden la internalización del APP ya secretado [10].

En el Alzheimer, se ha observado que se produce un desequilibrio entre la formación y el aclaramiento de péptido A β que termina generando agregados extracelulares insolubles en forma de placas que condicionan una respuesta inflamatoria de la microglía y un aumento del estrés oxidativo [2]. De forma correlativa, la mayor parte de las mutaciones de Alzheimer familiar, afectan al procesamiento de APP, aumentando la amiloidogénesis. En este estudio, se trabaja con la mutación de Alzheimer hereditario *Swedish*, descrita en 1992 en una familia sueca, de ahí el nombre de la mutación [11]. Esta mutación afecta al gen de APP en dos cambios de aminoácido en el sitio de reconocimiento por la β -secretasa, la cual aumenta su afinidad por la proteína generando una producción de A β entre 6-8 veces mayor respecto a la variante nativa [11].

Neurodegeneración

La clínica del Alzheimer se corresponde con una degeneración neuronal. Este proceso parece ser secundario a la inflamación que produce la microglía activada por las placas de A β y los ONF. Ni el nexo entre estos dos componentes ni su orden de aparición han sido esclarecidos por completo. No obstante, las mutaciones relacionadas con el aumento de A β apoyan el papel primordial de este, al causar clínica de Alzheimer en individuos de forma precoz mientras que mutaciones aisladas en la proteína tau no generan la enfermedad. En tejido de pacientes de Alzheimer ya fallecidos, se ha observado que la microglía se localiza en las placas de A β [12]. Las placas de agregados pueden constituir un mecanismo de defensa y aislamiento del agente neurotóxico para que la microglía lo elimine, hasta que se sobrepasa un punto de saturación que hace que funcione de reservorio de oligómeros de A β solubles [13], la forma más tóxica de A β , y que generan mayor inestabilidad genera en las membranas [14]. Se ha observado que la adición de oligómeros solubles de A β humano a cultivos neuronales produce daño en las dendritas, disfunción sináptica y muerte neuronal [15], así como hiperfosforilación de tau y distrofia neuronal [16]. Por otro lado, la tau hiperfosforilada impide el correcto transporte mitocondrial y aumenta el estrés oxidativo, altera

las sinapsis y concentra proteína APP en el soma celular [17].

En conclusión, ambos mecanismos, los agregados A β y los ONF, desencadenan una respuesta inflamatoria de la microglía, un aumento del estrés oxidativo y una disfunción sináptica en las cortezas límbicas y de asociación de lóbulos temporal y parietal. Finalmente hay muerte neuronal con depleción colinérgica e hiperactivación glutamatérgica, que produce la clínica de la enfermedad y la atrofia cortical cerebral.

2.2 Apolipoproteína D

La apolipoproteína D es una lipoproteína de 25-30 kDa que pertenece a la familia de las lipocalinas. Su gen se encuentra en el cromosoma 3 humano y la proteína está altamente conservada en mamíferos, aunque su origen filogenético se remonta al reino de las bacterias. Las moléculas de tipo lipocalina comparten una misma estructura de 8 láminas β plegadas para formar un barril que permite la unión de pequeños ligandos en su interior. De manera particular, en ApoD existen una serie de residuos hidrofóbicos que salvaguardan la entrada al bolsillo de láminas β y facilitan la unión de ligandos hidrofóbicos o la interacción con lípidos de membrana.

La distribución tisular de ApoD es amplia, hallándose en plasma (asociada a lipoproteínas de alta densidad HDL), sistema nervioso central (SNC), fluido cístico mamario, testículos y otros tejidos. Sin embargo, la mayor expresión de ApoD se ha localizado en fibroblastos perivasculares, en astrocitos y oligodendrocitos del SNC y en células de Schwann y fibroblastos de nervios periféricos. No obstante, apenas se expresa en intestino e hígado como el resto de las lipoproteínas, y por ello se le considera atípica dentro de este grupo.

ApoD es una proteína multiligando y multifunción, pues se ha observado que tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, interviene en el transporte de pequeñas moléculas y en el metabolismo lipídico. Su principal ligando de interés de acuerdo a sus atribuidas funciones antiinflamatorias, es el ácido araquidónico (AA), y respecto a sus propiedades antioxidantes, es su unión a compuestos hidrófobos o lipídicos de las membranas, como esteroides y esfingolípidos.

La función antioxidante se atribuye al residuo de Met-93 de la proteína. Se ha demostrado que ApoD a través de este residuo reduce lípidos hidroxidados a hidroxidados mediante el paso de sulfidrilmetionina (MetSH) a metionin sulfóxido (MetSO)[8]. La oxidación de Met-93 desestabiliza la estructura de la proteína, que en consecuencia dimeriza hasta que MetSO reductasa regenera el residuo Met-93. Este efecto se ha podido comprobar en ratones *knockout* para ApoD que mostraron un aumento de peroxidación lipídica cerebral mientras que en otra cepa que sobreexpresaba la proteína, se halló mayor resistencia al estrés oxidativo y menor peroxidación [18].

Por otra parte, la función antiinflamatoria se puede explicar por la unión de ApoD al ácido

araquidónico, precursor de prostanoïdes y leucotrienos, moléculas proinflamatorias. Un estudio evidenció que ApoD podría estabilizar el AA asociado a membranas y atenuar su liberación y transformación en productos proinflamatorios. También se observó que mediante este secuestro podría disminuir la peroxidación lipídica y su consiguiente efecto tóxico [19]. Por tanto, se puede concluir que ApoD es una proteína que se une a lípidos de membrana y moléculas hidrófobas que tiene un papel antioxidante gracias a su residuo Met93 y antiinflamatorio derivado de su unión al AA. Por su mayor expresión en el SNC también, se le atribuyen funciones de neuroprotección. La dimerización se ha visto incrementada en situación de estrés en el hipocampo en la Enfermedad de Alzheimer avanzada, y se propone como mecanismo antioxidante [20]. El gen de ApoD aumenta su expresión en el cerebro con el envejecimiento y los niveles de esta proteína se han visto incrementados en otras patologías del sistema nervioso como la esquizofrenia, esclerosis múltiple, enfermedad de Niemann–Pick o el ictus [8].

Por todo ello, el Alzheimer, una enfermedad que aparece con el envejecimiento y en la que el estrés oxidativo juega un rol importante en su patogenia y progresión, planteo estudiar en este TFG los posibles efectos beneficiosos de la ApoD respecto al estrés oxidativo potencialmente causado por los agregados A β característicos de la enfermedad.

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este TFG son:

1. Caracterizar la línea celular SH-SY5Y APP_{Swe} en términos de proliferación, expresión de ApoD y verificación del plásmido mutante APP_{Swe}.
2. Estudiar el efecto de la ApoD en las células SH-SY5Y APP_{Swe} sobre la peroxidación lipídica mediante ensayo TBARS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los protocolos de esta sección se encuentran detallados en el apartado de “Anexos”. A continuación, se explica resumidamente la metodología aplicada para cada proceso experimental.

4.1 Revisión bibliográfica

Para conocer el estado actual de la temática del TFG realicé una búsqueda bibliográfica en PubMed mediante búsqueda avanzada con filtros y operadores booleanos que relacionaban los conceptos clave de este trabajo: “Alzheimer”, “Apolipoproteína D”, “estrés oxidativo”, “ β -amiloide” y “APP *Swedish*”. Tras la lectura de sus resúmenes, se seleccionaron 30 artículos para su lectura.

Consulta	Filtros	Resultados
(Alzheimer [Title])	Review, Systematic Review, in the last 10 years	9.362
(Apolipoprotein D [Title/Abstract])	Review, Systematic Review	28
(Alzheimer[Title/Abstract]) AND (Apolipoprotein D[Title/Abstract])	-	46
(Alzheimer[Title/Abstract]) AND (oxidative stress[Title])	Review, Systematic Review, in the last 10 years	275
(β amyloid[Title/Abstract]) AND (oxidative stress[Title/Abstract])	Review, Systematic Review	388
(APP Swedish[Title]) OR (APP Swe[Title])	In the last 10 years	45
	Review, in the last 10 years	1

Tabla 1. Búsquedas realizadas en PubMed con las claves, los filtros utilizados y el número de resultados obtenidos, del que se seleccionaron artículos para su lectura.

Según nuevas inquietudes surgidas de estos artículos, se amplió la lectura a algunos textos de la bibliografía de los mismos y se realizó una segunda búsqueda de bibliografía dirigida a preguntas concretas. Por otra parte, a lo largo de la realización de los experimentos se realizaron búsquedas específicas relativas a los experimentos a realizar y al modelo celular SH-SY5Y APP_{Swe}.

4.2 Modelo celular SH-SY5Y APP_{swe}

Se ha empleado la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y WT y APP_{swe}. Las células fueron cedidas por cortesía de la Dra. Martín-Aragón (UCM, Madrid) [21] que a su vez provenían del laboratorio del Dr. Song (Universidad de Columbia Británica, Canadá) [22]. Las células SH-SY5Y controles (WT) se obtuvieron de la misma fuente. Las células mantenidas en nitrógeno líquido en FBS:DMSO (1:9) se descongelaron y mantuvieron en medio OptiMem (Gibco 51985-026), FBS 10% (Gibco 10270-106), NEAA (HyClone SH30228.01) e Hygromicina B (0,6%) (Thermo Fisher Scientific 10687010).

4.3 Caracterización de la línea celular SH-SY5Y APP_{swe}

4.3.1 Curva de proliferación

Se sembraron 6 cultivos de 300.000 células/ pocillo de SH-SY5Y APP_{swe}. Se hicieron fotografías por triplicado de cada pocillo durante 4 días (24h, 48h, 72h y 96h) en microscopio óptico invertido a magnificación 10x. Se escaló la imagen y la densidad se cuantificó usando el *Plugin Cell Counter* de Fiji (ImageJ).

4.3.2 Diseño de oligonucleótidos del gen APP_{Swe}

Partimos de la secuencia exónica nativa de la proteína APP albergada en la base de datos "NCBI Nucleotide" (*NM_000484.4*). La secuencia aminoacídica se obtuvo de "NCBI Open Reading Frame Finder (ORF)". Se localizó la zona donde se encuentra la mutación usando la herramienta "Uniprot" y se modificó tanto la secuencia exónica como la secuencia de aminoácidos mutante APP_{Swe}. Usando la herramienta *Primer-Blast* partimos de la secuencia de 20 nucleótidos donde se encuentra la mutación haciendo que coincida esta con los últimos nucleótidos del cebador 5'-3' o Forward (5'-AGGAGATCTCTGAAGTGAATC). Obtuvimos la secuencia 3'-5' o Reverse de un amplicón de aproximadamente 200 pares de bases (pb) (5'-ACCACACCATGAATGGA). Usamos como cebador *forward* de la proteína nativa la misma zona del exón que para la mutante (5'-AGGAGATCTCTGAAGTGAAGA).

4.3.4 Extracción de RNA y obtención de DNA complementario

Se sembraron 75.000 células/pocillo de SH-SY5Y WT y APP_{Swe} en placas de 1.9 cm². Se llevó a cabo la extracción de RNA mediante el protocolo de QIAzol (QIAGEN) hasta obtener la muestra de RNA purificado, que se resuspendió e 50 µl de H₂O. Se cuantificó la cantidad de material por Nanodrop ND1000 (ThermoScientific) y se comprobó la calidad del RNA extraído corriendo el material en un gel de agarosa 2%. Se usaron 500 ng de muestra para la transcripción inversa con el kit Prime Script RT Enzyme Mix I (Takara), previa incubación con DNase I (Takara) para obtener el DNA complementario (cDNA). Tras este paso se usaron las mismas muestras tanto para la validación de la línea celular por PCR como para la expresión de ApoD por qPCR.

4.3.5 RT-PCR para validación del plásmido Swedish en línea celular SH-SY5Y APP_{Swe}

Se utilizó el protocolo habitual del laboratorio usando el kit de polimerasa *Dream Taq Master Mix* 1X (Thermo Fisher Scientific) usando los cebadores diseñados para discriminar ambas variantes de APP. Se usaron ambos cebadores para las muestras SH-SY5Y WT y APP_{Swe} (50 ng) amplificando 35 ciclos. El resultado de la PCR se corrió en un gel de agarosa 2% cargando la muestra completa (10µl).

4.3.6 qRT-PCR para cuantificación de la expresión de ApoD en SH-SY5Y APP_{Swe}

Con el cDNA de SH-SY5Y APP_{Swe} se realizó la qPCR con TB Green 2x (Takara Bio, Japan) en el termociclador Rotor-Gene 3000. Con TB Green se prepararon dos alícuotas en

paralelo, una con los cebadores Fw y Rv de hApoD y otra con los cebadores Fw y Rev de L18 (*housekeeping*) al que se relativizará la expresión de ApoD. Se utilizaron cebadores ya diseñados por el laboratorio: hApoD-ATP-For (5'-CCACCCCAGTTAACCTCACA), hApoD-TVD-Rev (5'-CCACTGTTTCTGGAGGGAGA), L18 For (5'-GTCCCTTTCCCGGATGAT) y L18 Rev (5'-GACAGTGCCACAGCCCTTAG). Se utilizaron 50 ng μ L de muestra de cDNA de SH-SY5Y APP_{swe} usando como control positivo de expresión de ApoD una RT de astrocitos 1321N1 (obtenidas de ECACC (86030402)) de experimentos anteriores del laboratorio. El resultado se analizó mediante el cálculo de ciclo umbral (Ct) con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [23] relativizando a la expresión del gen *housekeeping* y a la situación control (1321N1).

4.4. Tinción inmunocitoquímica de células HeLa transfectadas con plásmido productor de ApoD

Se sembraron sobre cubrecristales 75.000 células HeLa hApoD-HisTag en medio DEMEM (Gibco), Glutamina 1%, Geneticina G418 45 mg/ml, FBS 10%. Tras 24h se fijaron las células con Paraformaldehído 4%, se bloqueó la muestra con suero de cabra y se marcaron las células con *Mouse*-anti Polihistidina (Sigma) 1:1000 PBS-Tween20 0.1%; *Goat Anti-Mouse Alexa488* (Jackson ImmunoResearch) 1:2000 PBS-Tween20 0.1%. Los núcleos celulares se marcaron con medio de montaje DAPI-*VectaShield* durante el montaje de los cristales en el portacristales.

4.5 Técnica de ELISA para cuantificación de ApoD secretada por células HeLa

Se sembraron $3.9 \cdot 10^6$ células HeLa en medio DEMEM (Gibco), Glutamina 1%, Geneticina G418 45 mg/ml, FBS 10% en Flask T25. Pasadas 48h, se cambió a un medio sin antibiótico, sin FBS y sin rojo fenol. Tras 24h de incubación, se recogió este medio enriquecido en ApoD y se cuantificó la cantidad de ApoD mediante Human Apolipoprotein D ELISAPRO (Mabtech, Suecia) y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas (SOFTmax Pro; Molecular Devices) sustrayendo el fondo a 650 nm.

4.6 Ensayo TBARS para medir la peroxidación lipídica de la línea celular SH-SY5Y APP_{Swe}

Se prepararon 9 Flasks T25 con $1.5 \cdot 10^6$ células para hacer triplicados de cada una de las condiciones. Se añadieron por triplicado los medios de tratamiento (Paraquat 0,5 mM y Medio enriquecido ApoD de HeLa) y se dejó incubar 24 horas. Al día siguiente se extrajo el material celular y se midió mediante TBARS la concentración de lípidos peroxidados respecto a una curva patrón de MDA y se leyó la absorbancia a 532 nm mediante el lector de placa. Se

midió la cantidad de proteína por micro-BCA kit (ThermoFisher) y se leyó la placa a 562 nm.

5. RESULTADOS

5. 1 Caracterización de la línea celular SH-SY5Y APP_{swe}

5.1.1 Curva de proliferación

Se realizó el conteo de las células fotografiadas a las 24h, 48h, 72h y 96h de la siembra. Se tomó, no obstante, como tiempo 0 las células fijadas a la placa pasadas las primeras 24h desde la siembra. Por lo tanto, las densidades celulares se han analizado desde ese punto de partida obteniéndose la tabla 2.

Horas	MEDIA (cel/100um2)	SEM	CV %
0h	0,050	0,009	17,584
24h	0,220	0,024	11,117
48h	0,471	0,087	18,462
72h	0,626	0,073	11,712

Tabla 2. Resultados del conteo de células. SEM: error estándar de la media. CV%: porcentaje de coeficiente de variación.

A partir de estos datos, se elaboró una curva de proliferación (Figura 1A) cuya correlación en imágenes se puede observar también en la Figura 1B. Se realizó un ajuste de regresión lineal para construir la siguiente ecuación: $y = 0,0083x + 0,0447$, siendo “x” el tiempo en horas e “y” la densidad celular, con un R^2 de 0.99. También se calculó el tiempo de duplicación celular mediante la ecuación $N_f = N_o \times 2^n$ [24] siendo n el número de divisiones celulares, N_o el número inicial de células contadas a las 0h, a las N_f el número final de células a las 72h. El n obtenido fue de 3,656 células y con él se calculó el tiempo de duplicación g mediante la fórmula $g = \frac{\text{tiempo (h)}}{n}$ obteniéndose un resultado de 19,69 h.

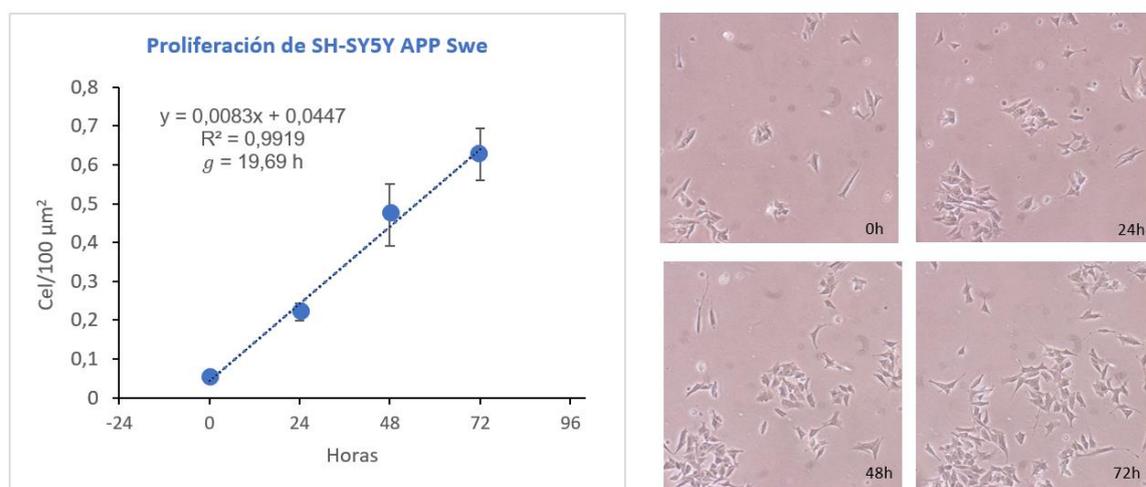


Figura 1. A) Curva de proliferación de SH-SY5Y APP_{swe}. B). Imágenes secuenciales de un mismo campo tomadas cada 24h en las que se observa la creciente proliferación celular.

5.1.2 Pureza y cuantificación de la extracción del RNA

De la extracción de RNA realizada mediante el protocolo de QIAzol, se obtuvieron 1975,7 ng/ μ L de RNA de la muestra *wildtype* y 1315,2 ng/ μ L de la muestra mutante Swedish. Los ratios 260/230 y 260/280 obtenidos fueron satisfactorios. En la Figura 2 se muestra un ejemplo representativo de las cuantificaciones por Nanodrop.

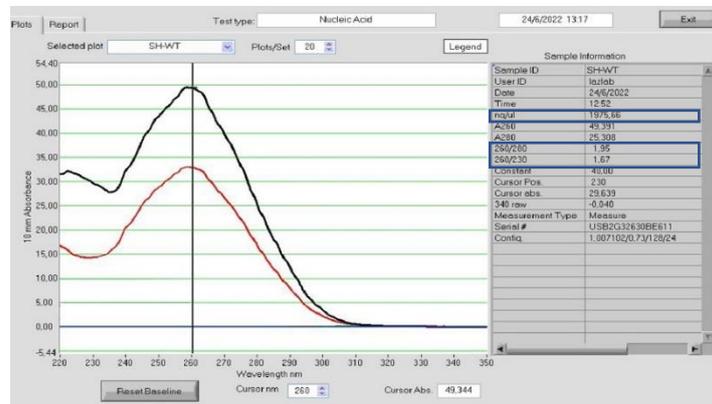


Figura 2. Análisis espectrofotométrico de las muestras de SH-SY5Y APP WT (curva negra) y APP Swe (curva roja). La señal a 230 nm muestra algún resto de guanidinio mientras que no hay señal a 280 nm correspondiente a las proteínas. El mayor pico está a 260 nm, longitud de onda correspondiente al RNA. Señalados por recuadros azules, se observa la cuantificación de la muestra seleccionada (APP WT, en este caso) y sus ratios de calidad,

Para comprobar que el RNA no se hubiera degradado durante el proceso de la extracción, se evaluó su integridad corriendo un gel de agarosa con 2 μ L de muestra. Se observaron dos bandas correspondientes al RNA ribosómico (rRNA) confirmándose que el RNA de las muestras no había sufrido degradación (Figura 3).

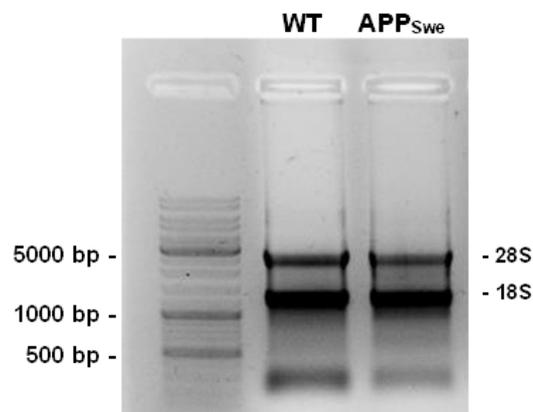


Figura 3. Gel de agarosa 2% del RNA extraído con el protocolo del QIAzol de las células SH-SY5Y APP_{Swe} en el que se observan las bandas de rRNA 18S y 28S.

5.1.3 Validación del plásmido *Swedish* mediante RT-PCR

En las células SHSY5Y APP Swe se demostró la presencia de la secuencia mutante del gen APP Swedish al objetivarse una banda de DNA de unos 200 pares de bases (pb) (muestra 2 de la figura 4), tamaño del amplicón de los cebadores. Mientras que la PCR con cebadores para la variante mutante en las células SH-SY5Y *wildtype* fue negativa (muestra 4 de la figura 4). Se verificó por tanto, la persistencia del plásmido que vehiculaba la mutación Swedish en las células de interés. Por otra parte, ambas líneas celulares hibridaron con los cebadores *wildtype* de APP y amplificaron el gen, como puede observarse en las bandas gruesas de las muestras 1 y 3 de figura 4. Por tanto, los resultados fueron los esperados, obteniéndose una expresión de APP WT basal en ambas líneas celulares, pero tan solo de APP Swe en las células con el plásmido.

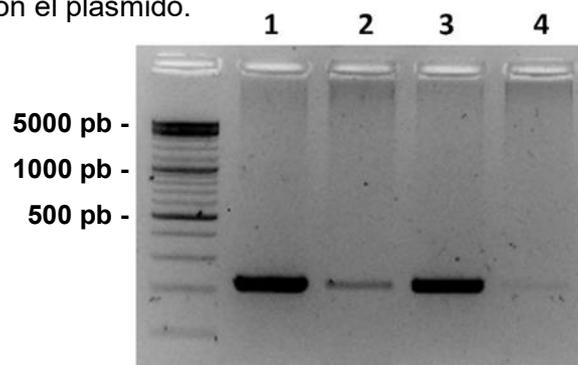


Figura 4. PCR de SH-SY5Y APP_{Swe} con cebadores APP WT positiva (1) y positiva también con los cebadores APP_{Swe} (2); SH-SY5Y WT con cebadores APP WT positiva (3) y negativa para cebadores APP_{Swe} (4). T^a de apareamiento 56,7°C; 35 ciclos. La banda de 200 pb observada corresponde al tamaño del amplicón esperado.

5.1.4 Cuantificación de la expresión de ApoD en SH-SY5Y APP_{swe} mediante qRT-PCR

Al comparar la expresión de ApoD en células SH-SY5Y APP_{swe}, SH-SY5Y WT y astrocitos 1321N1, se observó que las SH-SY5Y WT y las APP_{swe} tienen tasa de expresión subliminales respecto a la de los astrocitos. (Tabla 3, Figura 5). Se concluye así que las SH-SY5Y APP_{swe} no expresaron Apolipoproteína D de forma constitutiva en el experimento realizado. Las razones por las que la producción es mucho menor en esta línea que en la APP WT no han podido ser esclarecidas en este trabajo, no obstante, podría tener relación con la presencia del plásmido que induce una producción masiva de proteína APP y podría desplazar la producción de otras proteínas de la neurona.

Muestra	Expresión relativa de ApoD	Err+	Err-
1321N1	1,00	0,46	0,46
APP WT	-151,87	23,29	20,19
APP _{Swe}	-1592,97	437,24	343,07

Tabla 3. Tabla con la expresión relativa de hApoD en SH-SY5Y APP WT y APP_{Swe} normalizada respecto a la expresión en astrocitos 1321N1, que sí expresan constitutivamente la proteína.

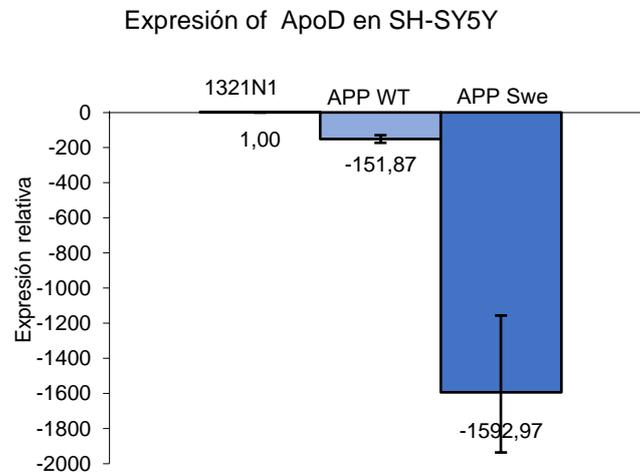


Figura 5. Gráfica que muestra la expresión relativa negativa del ApoD en las células APP WT y Swe con respecto a los astrocitos 1321 que sí la expresan

5.2 Inmunocitoquímica de células HeLa transfectadas con plásmido productor de ApoD

Las células HeLa inmunoteñidas se visualizaron con microscopía de fluorescencia. Se observa en las imágenes la presencia de ApoD de fluorescencia verde por el fluoróforo Alexa488 y en las imágenes inferiores la fluorescencia del colorante DAPI adherido a los ADN de los núcleos. La última fila de imágenes refleja la fluorescencia intrínseca de las células (Figura 6).

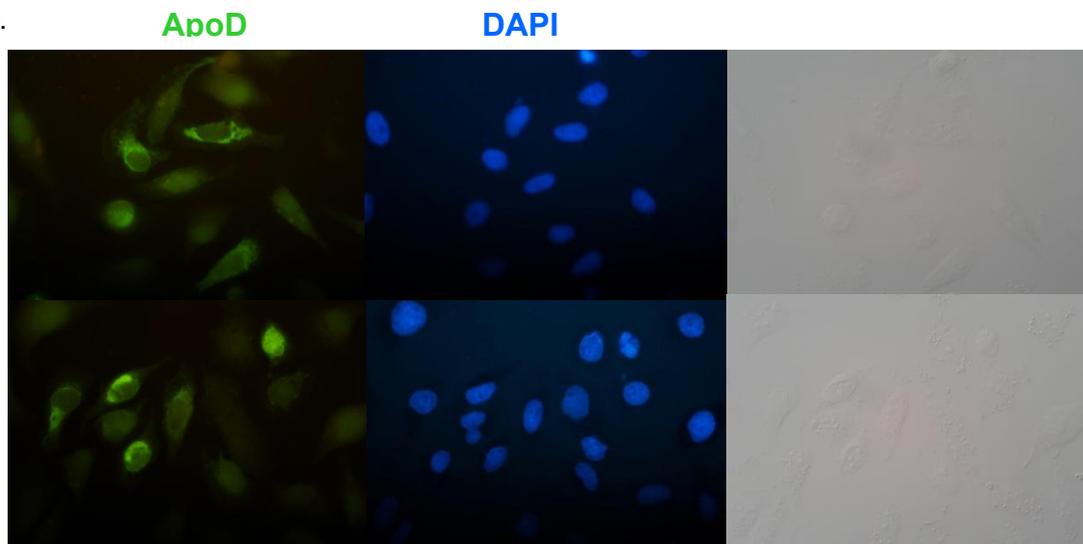


Figura 6. De izquierda a derecha se observan las distintas fluorescencias para el mismo grupo celular de HeLa. Se observa marcaje de ApoD en algunas células.

5.3 Cuantificación de ApoD en suero de células HeLa mediante técnica de ELISA

La siguiente comprobación respecto a la producción de ApoD de las HeLa necesaria es el ELISA. Mediante esta prueba se obtuvo la concentración de ApoD del medio condicionado (CM) de las HeLa que se añadió a las SH-SY5Y APP_{swe} en el ensayo de TBARS. Del triplicado medido se obtuvieron las concentraciones que figuran en la Tabla 4 y una concentración media de 1,013 nM de hApoD (Figura 7).

Mediciones CM Hela ApoD	nM	Media (nM)	SD	CV%
1	0,92	1,013	0,158	15,646
2	0,923			
3	1,196			

Tabla 4. Mediciones de las concentraciones de hApoD en el medio de las células HeLa transfectadas.



5.4 Efecto de ApoD sobre la peroxidación lipídica de las células SH-SY5Y APP_{swe} mediante ensayo TBARS.

En primer lugar, se obtuvieron las concentraciones de proteína de las muestras del ensayo BCA calculándose las medias de los triplicados 1:200 y 1:400 de cada muestra (Figura 8). Después, se estandarizó la concentración de MDA resultante del TBARS de cada muestra según su cantidad de proteínas (Tabla 5). El MDA medido fue el siguientes: 1,160 $\mu\text{M} / \mu\text{g}$ prot para el control; 2,673 $\mu\text{M} / \mu\text{g}$ prot para las células en Pq 0,5 mM; y 3,832 $\mu\text{M} / \mu\text{g}$ prot. para la situación de PQ 0,5 Mm y ApoD 1,013 nM. Las células condicionadas con PQ 0.5 mM generaron más compuesto peroxidado que el control, y las incubadas con PQ 0,5 mM y medio condicionado con ApoD, aún más (Figura 9). Los resultados de este TBARS son contradictorios con lo expuesto en la literatura acerca de las propiedades antioxidantes de ApoD y se comentarán en la “Discusión” posibles explicaciones de este resultado y vías de experimentación futuras.

PROT		Mean	SD	CV%
SH-SY5Y APP _{swe}	Ctrl	5,43	0,06	1,11
	PQ 0,5 mM	4,13	0,49	11,76
	PQ 0,5 mM + ApoD 1,01 nM	3,62	0,31	8,57

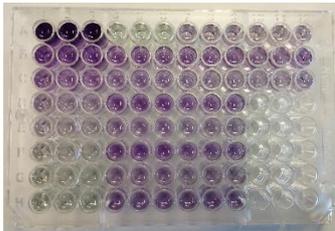


Figura 8. A) Tabla con la concentración proteica media obtenida de cada muestra del BCA y sus parámetros estadísticos. B) Fotografía de la placa de BCA tras la reacción.

TBARS SH – SY5Y APP _{swe}	[MDA] μM / μg prot.	Std.Dev.
Ctrl	1,160	0,014
PQ 0,5 mM	2,673	0,030
PQ 0,5 mM + ApoD CM	3,832	0,059

Tabla 5. Tabla con los valores de [MDA] μM / μg prot. obtenidos tras el ensayo TBARS.

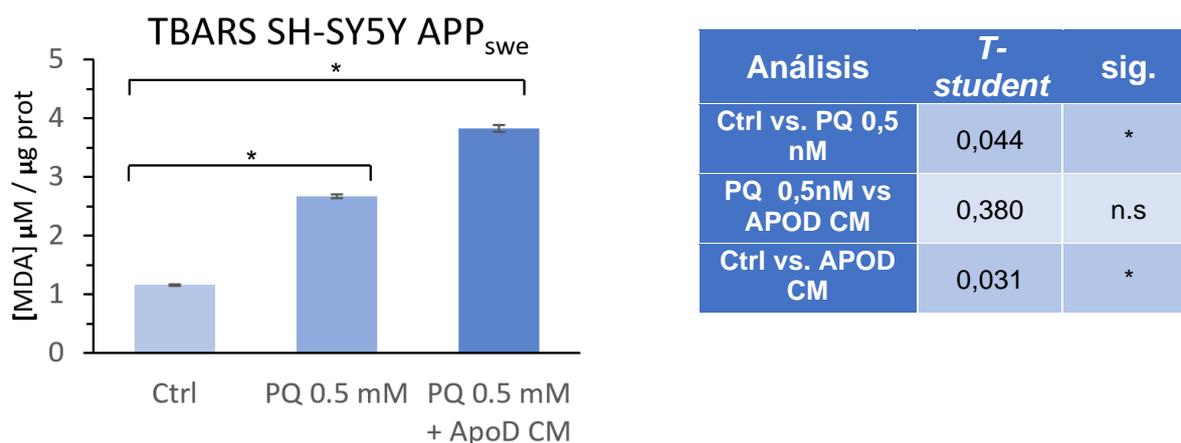


Figura 9. A) Gráfica que muestra la peroxidación lipídica normalizada por cantidad de proteína en las distintas condiciones estudiadas en las células SH-SY5Y APP_{swe}. B) Tabla con la significación estadística analizada por *T*-*student*.

6. DISCUSIÓN

A la vista de los resultados del TBARS, el medio condicionado de las HeLa con ApoD no disminuiría la peroxidación lipídica por péptido A β en las neuronas SH-SY5Y APP_{swe}. Este hallazgo, contradice a una amplia literatura que sostiene el efecto antioxidante de ApoD por lo que invita a plantearse por qué no ha habido efecto antioxidante en este experimento. ¿Era la concentración de ApoD suficiente para poder surtir efecto? ¿El medio condicionado recogido de las HeLa puede contener productos no deseados que aumenten el estrés oxidativo de las células? ¿Qué más moléculas hay en el medio de las HeLa? ¿El ApoD secretado por las HeLa mantiene su conformación proteica funcional? ¿ApoD es internalizado por las células SH-SY5Y APP_{swe}?

En primer lugar, se sopesa si la concentración de ApoD (1,01 nM) administrada a las células SH-SY5Y APP_{swe} fue suficiente para que se produjera el efecto antioxidante. Además, en el

medio condicionado de las HeLa pueden estar afectando otras moléculas desconocidas a la función de ApoD o a la oxidación lipídica que sufren las SH-SY5Y APP_{swe}, por lo que no es el condicionamiento ideal para medir el efecto potencial de ApoD. Habría factores de confusión no controlados que impedirían una asociación entre ApoD y la variación de la peroxidación lipídica aunque podría tener solución si se refina el método de purificación de la proteína. En esa línea de actuación, en el laboratorio en el que desarrollo este TFG se han realizado nuevos experimentos posteriores a los expuestos en este trabajo en los que se ha añadido ApoD purificado mediante columna HisPur Ni-NTA Resin a una concentración de 10 nM. Sin embargo, los resultados han sido similares, no demostrándose el efecto reductor de ApoD a mayores concentraciones y a pesar de la purificación realizada. Por tanto, se plantean otras hipótesis.

Por una parte, habría que comprobar si el extracto purificado contiene ApoD soluble y con plegamiento nativo. En el laboratorio, se han continuado con estos experimentos *a posteriori* de la parte experimental de este trabajo, observándose en una electroforesis del extracto purificado que no había una única banda correspondiente a la proteína esperada, sino que aparecían varias bandas sugerentes de, bien la presencia de otras proteínas en el medio de las HeLa, o bien de la formación de agregados de ApoD una vez liberados al medio extracelular. En el protocolo de purificación se usan anticuerpos anti-poli-histidina, que reconocen la cola de histidinas añadida a la proteína ApoD que produce el plásmido de las HeLa. Aunque la presencia de 7 histidinas seguidas se espera que confiera suficiente especificidad, puede que en el medio condicionado de las HeLa existan proteínas con poli-histidinas que se unan inespecíficamente a los anticuerpos de selección de ApoD. La otra alternativa, es que todas las bandas sí sean ApoD pero que se encuentre formando agregados de distintas unidades y por ello se separe a distintas alturas en el gel de electroforesis al tener pesos moleculares dispares. En caso de confirmarse esta hipótesis, el escenario cambia y se ensombrecerían las posibilidades de continuar con esta línea experimental. Si la proteína al ser secretada por las HeLa forma agregados, esta pierde su conformación funcional y no es capaz de unirse a los lípidos de las membranas, ni de internalizarse en la célula ni de, en definitiva, ejercer sus funciones.

Existe un antecedente en la literatura [25], en el que la proteína ApoD humana producida por un plásmido inoculado a otra línea celular similar a las HeLa (las células HEK293T, en aquella ocasión), no era secretada al medio, y además formaba agregados hidrófobos intracelulares. Aunque en nuestro caso, sí que se ha confirmado mediante ELISA la presencia de ApoD en el medio extracelular de las HeLa, se desconoce si se encuentra formando agregados. En el caso descrito de las células HEK se probó a introducir en vez del gen humano, el gen de ratón

de ApoD y este sí dio los resultados esperados en cuanto a secreción al medio y a funcionalidad de la proteína. Por ello, este cambio de especie es una vía a explorar de cara al futuro de esta investigación.

Para identificar si hay proteínas en las bandas de la electroforesis que no correspondientes a ApoD también se debería realizar un marcaje con Inmunoblot utilizando anticuerpos anti-ApoD y anticuerpos anti-Histidinas. Si dan marcaje los primeros, sería más sólida la hipótesis de los agregados proteicos afuncionales y se plantearía el salto de especie del gen humano de ApoD al de ratón. Mientras que si dan positivo los anticuerpos anti-polihistidinas, habría que revisar la técnica de purificación. Pueden sustituirse en ese caso los anticuerpos anti-polihistidinas por los específicos anti-ApoD para obtener un extracto correctamente purificado y repetir el experimento TBARS con vistas a realizar una curva dosis-respuesta si hubiera un efecto antioxidante. Si persistiera la ausencia de efecto, se podría estudiar mediante inmunohistoquímica para observar bajo microscopía de fluorescencia si ApoD es internalizado por las SH-SY5Y APP_{swe}, si se localiza en las membranas plasmática o si no interacciona con las células de la forma esperada.

7. CONCLUSIONES

1. Las células SH-SY5Y APP_{swe} no expresa ApoD de forma constitutiva.
2. Las células SH-SY5Y APP_{swe} contienen el plásmido portador de la mutación *Swedish* del gen APP que puede identificarse mediante los cebadores diseñados.
3. La proteína ApoD obtenida del medio condicionado de células HeLa no reduce la peroxidación lipídica en las células SH-SY5Y APP_{swe} con producción de péptido A β aumentada.
4. Es preciso continuar el estudio mediante la investigación de la funcionalidad de ApoD secretada por las células HeLa transfectadas con plásmido ApoD, en términos de conformación, agregación y purificación.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2023;19:1598-695.
2. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *The Lancet* 2021;397:1577-90.
3. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* 2018;25:59-70.

4. Sperling RA, Donohue MC, Raman R, Sun CK, Yaari R, Holdridge K, et al. Association of Factors With Elevated Amyloid Burden in Clinically Normal Older Individuals. *JAMA Neurol* 2020;77:1-11.
5. The complexity of Alzheimer's disease: an evolving puzzle [Internet]. [citado 2023 may 23];Available from: <https://journals.physiology.org/doi/epdf/10.1152/physrev.00015.2020>
6. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of Preclinical, Prodromal and Dementia Alzheimer Disease Stages in Relation to Age, Sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement* 2019;15:888-98.
7. Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, et al. Alzheimer's disease. *Lancet* 2021;397:1577-90.
8. Dassati S, Waldner A, Schweigreiter R. Apolipoprotein D takes center stage in the stress response of the aging and degenerative brain. *Neurobiol Aging* 2014;35:1632-42.
9. Šerý O, Povová J, Míšek I, Pešák L, Janout V. Review paper
Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol* 2013;51:1-9.
10. Thinakaran G, Koo EH. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *J Biol Chem* 2008;283:29615-9.
11. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 1992;360:672-4.
12. Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia* 2016;12:719-32.
13. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years | EMBO Molecular Medicine [Internet]. [citado 2023 may 23];Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/emmm.201606210>
14. Beta Secretase 2 - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citado 2023 may 5];Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/beta-secretase-2>
15. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 2008;14:837-42.
16. Soluble amyloid β -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration | PNAS [Internet]. [citado 2023 may 23];Available from: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1017033108>
17. Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses. *Neurobiol Aging* 2003;24:1079-85.
18. Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 2008;7:506-15.
19. Thomas EA, George RC, Sutcliffe JG. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2003;69:421-7.
20. Bhatia S, Knoch B, Wong J, Kim WS, Else PL, Oakley AJ, et al. Selective reduction of hydroperoxyeicosatetraenoic acids to their hydroxy derivatives by apolipoprotein D: implications for lipid antioxidant activity and Alzheimer's disease. *Biochem J* 2012;442:713-21.
21. Jiménez-Aliaga K, Bermejo-Bescós P, Benedí J, Martín-Aragón S. Quercetin and rutin exhibit anti-amyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in

APP_{swe} cells. Life Sciences 2011;89:939-45.

22. Sun X, He G, Qing H, Zhou W, Dobie F, Cai F, et al. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences 2006;103:18727-32.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25:402-8.
24. Corraliza Gómez M. The insulin-degrading enzyme: from molecular evolution and subcellular localization to new roles in microglial physiology [Internet]. 2021 [citado 2023 may 24];Available from: <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/51889>
25. TFM_Pascua_Maestro_Raquel.pdf [Internet]. [citado 2023 may 24];Available from: https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/3763/TFM_Pascua_Maestro_Raquel.pdf?sequence=1&isAllowed=y
26. rs281865161 RefSNP Report - dbSNP - NCBI [Internet]. [citado 2023 may 7];Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs281865161#publications>
27. Anexo 2: Cámara de Neubauer – Blog del Manual del Laboratorio [Internet]. [citado 2023 may 23];Available from: <https://blogceta.zaragoza.unam.mx/manualbct2/anexo-2-camara-de-neubauer/>
28. Homo sapiens amyloid beta precursor protein (APP), transcript variant 1, mRNA [Internet]. 2023 [citado 2023 may 23];Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000484.4
29. APP - Amyloid-beta precursor protein - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [citado 2023 may 23];Available from: https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05067/entry#disease_variants

9. AGRADECIMIENTOS

A Jorge por su generosidad, su presencia constante y su paciencia infinita. A Diego por la invitación a hacer este trabajo y por compartir siempre su espíritu curioso, científico. A Lola, por su entusiasmo contagioso y su devoción por ayudar. A Teresa por su compañerismo tan genuino y a Miriam la acogida como alumna interna en mis inicios en el laboratorio.

10. ANEXOS

ANEXO 1: MÉTODOS Y MATERIALES

1. Modelo celular SH-SY5Y APP_{swe}

No es posible realizar experimentos con neuronas *in vivo* de pacientes con Alzheimer por motivos éticos, por lo que en la actualidad se utilizan modelos celulares con mutaciones que reproducen algunas de características biomoleculares de la enfermedad. En este caso, se ha empleado la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y APP Swedish que contiene una doble mutación (Chr21:25897626-25897627, GA<TC [26]) que se encontró en familias suecas con Alzheimer familiar. Estas mutaciones hacen que se produzca entre 6-8 veces más péptido

A β que con el gen normal. [11]

2. Caracterización de la línea celular SH-SY5Y APP_{swe}

2.1 Descongelación y cultivo

Se descongeló un vial de SH-SY5Y APP_{swe} y otro de SH-SY5Y WT conservados en DMSO 10% en nitrógeno líquido (-170°C). Se prepararon los reactivos previamente para disminuir tiempo de las células en contacto con el DMSO lo máximo posible una vez retiradas del congelador. Se añadió medio a los tubos, se centrifugó a 1000 rpm 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se añadió suero FBS 15%. Tras resuspender el contenido se sembraron dos Flasks T25. El mantenimiento posterior de las células se realizó con OptiMem (Gibco 51985-026), FBS 10% (Rf 10270-106), NEAA (HyClone SH30228.01) y Invitrogen-Hygromicina B (0,6%) (Thermo Fisher Scientific 10687010).

2.2 Curva de proliferación

Para caracterizar el patrón de crecimiento de las células SH-SY5Y APP_{swe} se quiso realizar una curva de proliferación. Se sembraron 6 pocillos de una placa con las células SH-SY5Y APP_{swe} (300.000 células/pocillo). Para la siembra de la placa, se siguió el protocolo previamente estandarizado por el laboratorio. Consistió primero en contar las células que había en el stock de SH-SY5Y APP_{swe} (Figura 1A). Para ello, se lavó el Flask del stock de la línea celular con PBS para eliminar el suero y se levantaron las células con 1 mL de tripsina. Se inactivó la tripsina con 4mL de medio y se centrifugó para eliminar el sobrenadante y mantener solo las células. Se resuspendió el sedimento resultante en 1mL de medio y se preparó una dilución 1:50 en PBS para pipetear 10 μ L a la cámara de Neubauer y realizar el conteo. Se cogió la media de las células sumadas en cada cuadrante y se multiplica por el factor de dilución de la cámara (10^4) y por el factor de dilución empleado (50, en este caso). Se obtuvieron $8 \times 50 \times 10^4 = 4 \times 10^6$ células por mL.

La densidad buscada para los pocillos era de 30.000 células/cm², midiendo cada pocillo un área de 9,61 cm² se calculó que se debían sembrar 288.300 células por pocillo, aproximadas a 300.000 células por las limitaciones técnicas. De la dilución del stock de SH-SY5Y APP_{swe} por tanto, se requerían 75 μ L por pocillo al que se le añadieron 2 mL de medio por pocillo.

Se fotografiaron por triplicado los pocillos cada 24 horas durante cuatro días (24h, 48h, 72h y 96h) con el objetivo de 10x del microscopio óptico. Con estas imágenes se realizó un conteo de células con el programa de análisis de imágenes científicas Fiji. Previamente, se fijó la escala de las imágenes utilizando de referencia la medida de la cuadrícula de la Cámara de Neubauer para poder relacionar el número de células por unidad de superficie. Sabiendo que la longitud de una arista de las cuadrículas pequeñas laterales de la cámara mide 250 μ m, se

asoció a los píxeles que ocupaba la arista en la imagen tomada de la cámara en el microscopio. Se estableció la correspondencia de 1.504 píxeles por μm (Figura 1B).

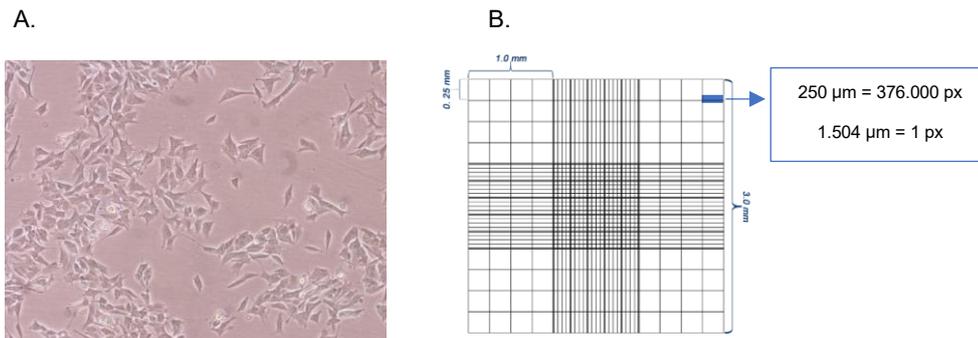


Figura 1. A) Células SH-SY5Y APP_{Swe} del stock de mantenimiento. B) Correlación métrica establecida en el programa Fiji mediante la cámara de Neubauer fotografiada con microscopio óptico a 10x. Imagen [27].

Después se utilizó la herramienta de *Cell Counter* del programa (*Plugins > Analyze > Cell counter*) para realizar el conteo y se normalizó por superficie (células/100 μm^2) (Figura 2). Para cada intervalo de 24h se obtuvieron 18 densidades celulares (al haber triplicados de los seis pocillos), de los cuales se calcularon la media por pocillo y la media global de proliferación de las SH-SY5Y APP_{Swe} tras intervalo además de las desviaciones típicas de las medias.

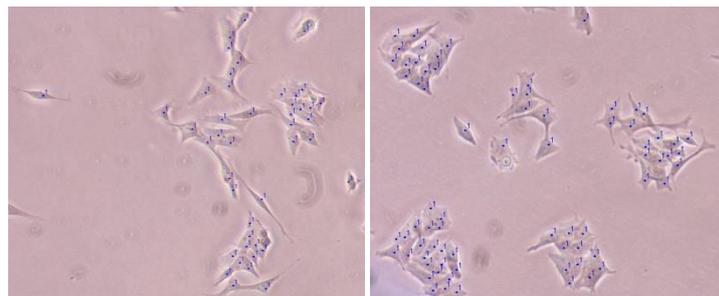


Figura 2. Ejemplo del conteo realizado con la herramienta de “Cell counter” del programa Fiji en células SH-SY5Y APP_{Swe} a las 24h (imagen izquierda) y 48h (imagen derecha) de la siembra.

2.3 Diseño de cebadores para gen APP_{Swe}

Se diseñaron cebadores o *primers* (pequeños oligonucleótidos que reconocen específicamente una secuencia de un gen diana) para el gen mutado APP *Swedish* de manera que se pudiera confirmar la presencia del plásmido mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se utilizó la base de datos de genes “NCBI Nucleotide” (“*human APP reference sequence transcript variant 1: NM_000484.4*” [28]) para obtener la secuencia del DNA complementario (cDNA) del gen APP nativo. Usar la secuencia de DNA ya procesado sin intrones hace que los cebadores sean válidos para RT-PCR también. Se obtuvo la correspondencia del cDNA con la secuencia de aminoácidos con la herramienta de NCBI

“Open Reading Frame Finder (ORF)”. Por otro lado, se utilizó el banco de información sobre proteínas “Uniprot” para conocer las mutaciones concretas que conforman la variante Swedish (“APP VAR_000015” [29]). Esta consiste en una doble sustitución de nucleótidos GA<TC (Chr21:25897626-25897627) que condiciona la sustitución de los residuos lisina por asparagina (K<N) en la posición 670 y de metionina por leucina (M<L) en la 671 [29]. Se modificó la secuencia de cDNA WT obtenida de “NCBI nucleotide” con las dos mutaciones Swedish y se seleccionó un fragmento de 21 nucleótidos como cebador 5`-3` o *Forward (Fw)* de manera que las dos bases mutadas quedaran en el extremo 3` y la especificidad del cebador fuera mayor. Ese es el lugar donde se une la polimerasa de forma si no hibridan bien los dos nucleótidos de la mutación, el enzima no sintetizará la hebra complementaria. Para elegir el cebador 5`- 3` o *reverse (Rev)* se utilizó la herramienta bioinformática “Primer blast” que contiene algoritmos que optimizan el diseño de cebadores buscando que la pareja de cebadores *Forward* y *Reverse* tengan temperaturas de hibridación similares, la máxima especificidad posible (capacidad de que el cebador se una exclusivamente a la secuencia diana y no erróneamente a otras) y baja afinidad entre ellos o con sus propios extremos 3` . Se introdujo la secuencia del cebador Fw ya elegida, se restringió el tamaño del amplicón a 180-220 pares de bases y la temperatura de anillamiento para los dos cebadores a 57°-63°C, siendo óptima en 60°C. La complementariedad propia del cebador y con el cebador complementario máxima aceptada fue de 10 puntos. El cebador Fw elegido fue AGGAGATCTCTGAAGTGAATC y el Rev, de las opciones dadas por *Primer-Blast*, fue ACCACACCATGAATGGA (Figura 3). Se repitió el proceso para el cebador Fw del gen APP WT y se seleccionó: AGGAGATCTCTGAAGTGAAGA, utilizando de molde la secuencia nativa de APP.

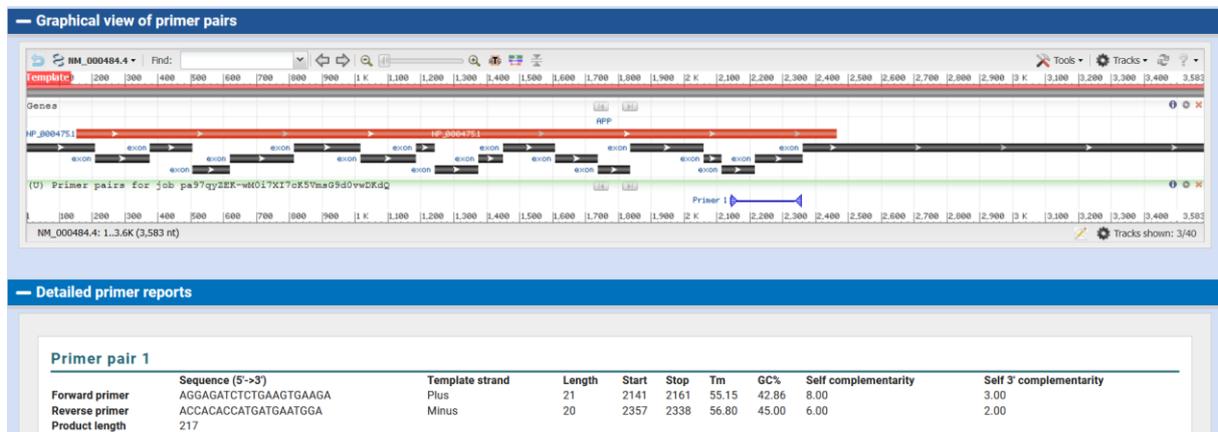


Figura 3. Resultado del diseño de cebadores para la mutación *Swedish* realizado con *PrimerBlast* .

2.4 Extracción de RNA y obtención de DNA complementario

2.4.1 Extracción del RNA mediante reactivo de lisis QIAzol

Las muestras se obtuvieron de cultivos en placas de 1,9cm² en los que sembraron 75.000 células SH-SY5Y APP_{swe}. Al día siguiente, se levantaron con tripsina 0,25% (Gibco) y se centrifugaron a 200G 5 minutos para obtener un sedimento o *pellet* de células. Al *pellet* se le añadió el reactivo de lisis QIAzol (QIAGEN) que contiene Guanidinio entre otras sustancias para desnaturalizar las proteínas. Se homogeneizó la solución de QIAzol con las células lisadas y se mezcló con cloroformo (1:5) agitando con fuerza manualmente para que se produjera la separación del RNA del resto de componentes orgánicos celulares. Luego, las muestras se centrifugaron (12000 G, 15 minutos, 4°C) y se obtuvieron dos fases de diferente densidad: una fase orgánica de tono rosado, correspondiente a proteínas desnaturalizadas, y una fase acuosa superior que corresponde al ARN, ambas separadas por una interfase blanquecina de DNA. La fase acuosa se recogió meticulosamente, se transfirió a un tubo nuevo y se mezcló 1:1 con isopropanol para hacer precipitar el ARN. Se dejó incubando 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron las muestras a 12000 G otros 10 minutos para sedimentar el ARN. Se descartó el sobrenadante y se lavó el ARN sedimentado blanquecino con etanol al 70 % dos veces, dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente entre una y otra. Tras el último secado, se puede observar el cambio de opacidad del pellet de RNA que pasa de ser blanco nacarado a traslúcido. Por último, se añadieron 50 µL de H₂O purificada con DEPC (dietil pro carbonato para eliminar RNAsas).

2.4.2. Cuantificación del RNA

La concentración y la pureza del ARN se midieron con un espectrofotómetro NanoDrop. Se colocaron 2µL de la muestra en el soporte y se lavó con dH₂O entre muestra y muestra. El espectrofotómetro mide a 230 nm, longitud de onda emitida por el guanidinio empleado en la extracción del RNA; a 260 nm, longitud de onda emitida por el RNA, el producto de interés; y a 280nm que se corresponde a la absorbancia de las proteínas. Por tanto, se espera una señal elevada de absorbancia a 260 nm mientras que baja a 230 nm y 280 nm como prueba de que se ha realizado bien el protocolo eliminando todos los reactivos utilizados y los productos orgánicos celulares no deseados. Como marcadores de calidad de la extracción, se calcula el ratio 260/240, que debe aproximarse a 2 si se han eliminado bien las proteínas. El lavado del QIAzol se habrá realizado correctamente, si el ratio 260/230 es >1.

2.4.3 Comprobación de la integridad del RNA extraído

Para evaluar la calidad del RNA extraído y verificar la ausencia de ADN genómico, se realizó una electroforesis con 2µL de cada muestra en un gel de agarosa al 1% a 120 V durante 15 minutos. Se visualizó el resultado del gel mediante rayos ultravioleta (GelDoc XR, BioRad). Para realizar las RT-PCR del gen APP_{Swe} y la qRT-PCR del gen ApoD de las células SH-SY5Y APP_{Swe} se obtuvo primero el extracto de RNA. Las muestras se obtuvieron de cultivos en placas de 1,9cm² en los que sembraron 75.000 células SH-SY5Y APP_{Swe}.

2.4.4. Retrotranscripción del RNA

Posteriormente, se utilizaron 500 ng de la muestra para obtener el cDNA mediante el protocolo de retrotranscripción (Anexo 2). Se realizó para ello un tratamiento con Dnase I (0,1 U/µl) para eliminar posibles resto de DNA genómico (gDNA) incubando a 37°C (temperatura óptima para la Dnasa I) durante 30m minutos y otros 5 minutos a 90°C para inactivar el enzima.

Tras este tratamiento, el ARN total se transcribió inversamente (RT-PCR) con Prime Script RT Enzyme Mix I, cebadores Oligo-dT 5uM y hexámeros aleatorios 10Um (Takara Bio, Japan). La retrotranscripción tiene lugar a 42°C durante 60 minutos (temperatura óptima de la retrotranscriptasa del fabricante) seguida de otros 5 minutos a 85°C, para inactivar el enzima (Figura 4). Posteriormente, las muestras se conservan a -20°C.



Figura 4. Programa del termociclador empleado para la RT.

2.5 RT-PCR para validación del plásmido *Swedish* en la línea celular SH-SY5Y APP_{Swe}

Se realizó una reacción de polimerasa en cadena para el gen APP *wildtype* y para APP Swedish en la línea SH-SY5Y APP_{Swe} a partir del cDNA extraído en pasos anteriores. Se realizó también en las SH-SY5Y WT para tener un control negativo de la expresión de APP Swe y positivo de la de APP WT. El objetivo de esta prueba era confirmar la expresión del plásmido con la mutación Swedish en las células cedidas por el laboratorio de la UCM y probar la especificidad de los cebadores diseñados.

Se siguió el protocolo de RT-PCR ya estandarizado por el laboratorio. Los reactivos empleados fueron *Dream Taq Master Mix 1X* (Thermo Fisher Scientific), *Primer APP WT Fw* 1 µM, *Primer APP Swe Fw* 1 µM y *Primer APP Rev* 1 µM. Las muestras de cDNA obtenidas

de la RT realizada previamente fueron diluidas 1:100 en H₂O libre de nucleasas. Se prepararon dos alícuotas en paralelo, una para amplificar el gen plasmídico APP Swe y otra para amplificar el gen APP nativo, cada una con sus cebadores correspondientes. 1 µL de cada muestra se mezcló en tubos separado con 9 µL de las dos alícuotas y se corrió el programa de PCR esquematizado en la Figura 5. Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa 2% (TAE 0,5X, agarosa 2% y SybrSafe 10.000X) y visualizaron mediante transiluminación ultravioleta (GelDoc XR, BioRad).



Figura 5. Esquema de la reacción de PCR realizada.

2.6 qRT-PCR para cuantificación de la expresión de ApoD en SH-SY5Y APP_{swe}

Con el cDNA de SH-SY5Y APP_{swe} que se obtuvo en experimentos anteriores, se realizó la qPCR con TB Green 2x (Takara Bio, Japan) en el termociclador Rotor-Gene 3000. Con TB Green se preparan dos alícuotas en paralelo, una con los cebadores Fw y Rv de ApoD y otra con los cebadores Fw y Rev de L18, el gen constitutivo o *housekeeping* al que se relativizará la expresión de ApoD. Se utilizaron cebadores ya diseñados por el laboratorio: HapoD-ATP-For (5'-CCACCCCAGTTAACCTCACA), hApoD-TVD-Rev (5'-CCACTGTTTCTGGAGGGAGA), L18 For (5'-GTCCCTTTCCCGGATGAT) y L18 Rev (5'-GACAGTGCCACAGCCCTTAG). A esta mezcla se le añade 1 µL de la muestra de cDNA de SH-SY5Y APP_{swe} diluida 1:10 y como control positivo de expresión de ApoD se usó una RT de astrocitos 1321N1 (obtenidas de ECACC (86030402)) de experimentos anteriores del laboratorio. Se colocaron los tubos (20 µL) en el termociclador equipado con sensores de fluorescencia. Se realizaron 45 ciclos de desnaturalización, apareamiento y extensión según el esquema de la Figura 6. Durante esta amplificación, a medida que se sintetizan nuevas cadenas de ADN, la molécula TB Green que se intercala entre el DNA amplificado y emite fluorescencia, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de producto amplificado en cada ciclo. El termociclador registra la señal de fluorescencia en cada ciclo, generando una curva de amplificación en tiempo real.

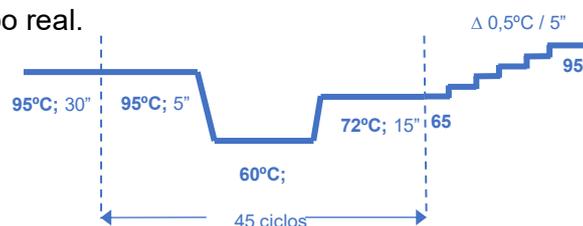


Figura 6. Esquema de la reacción de q-PCR realizada.

Por último, los datos obtenidos durante la amplificación se analizaron utilizando software especializado. Se calculó el ciclo umbral (Ct), que es el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia alcance un umbral predefinido. El Ct se utilizó para determinar la cantidad inicial de material genético en la muestra, ya que se considera inversamente proporcional a la concentración inicial. El análisis de datos se realizó utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [23], un método de cuantificación relativa de la expresión génica basado en la comparación de los valores de Ct del gen diana normalizado a los del control endógeno (gen *housekeeping*), en este caso L18 (rRNA 18S) y, mediante una segunda derivada, relaciona el nivel de expresión del gen diana en las condiciones experimentales y de control. En este caso, la expresión de ApoD en neuronas SH-SY5Y respecto a su expresión constitutiva de los astrocitos 1321N1.

3. Tinción inmunocitoquímica de células HeLa transfectadas con plásmido productor de ApoD

El ApoD que se añadió a las SH-SY5Y APP_{swe} se obtuvo de células HeLa sometidas a una transfección con plásmido portador del gen de ApoD humano con resistencia antibiótica para Geneticina. El gen vehiculado por el plásmido se había modificado para que el ApoD resultante tuviera una cola añadida de 7 histidinas que permitiera identificarlo mejor y diferenciarlo del ApoD WT ya presente en las células HeLa de forma natural. La transfección del plásmido a las células HeLa se realizó mediante Lipofectamina según el protocolo habitual del laboratorio. La transfección se realizó con las células HeLa en medio con suero sin ATB primero. Se prepara por una parte la Lipofectamina, un medio catiónico que se une al DNA por tener carga negativa y hace que precipite y se pegue a la membrana de las células Hella; y por otra, el DNA con medio y un reactante "Plus" que facilita la transfección. Se deja que reaccionen los productos por separado 5 minutos y luego se pasa la solución que contiene DNA a la de la lipofectamina y se incuba 2-3 horas. Posteriormente, se añade el antibiótico Gentamicina para seleccionar solo a las células HeLa que han adquirido el plásmido.

Con las células trasfectadas (Figura 7), se realizó una tinción inmunohistoquímica para observar la expresión de ApoD fruto de la inoculación del plásmido. Consiste en una técnica que permite detectar un antígeno concreto gracias a su unión específica a anticuerpos que emiten fluorescencia. Se suelen utilizar anticuerpos monoclonales primarios, que se unen al antígeno diana y anticuerpos secundarios de sueros policlonales que se unen a la fracción constante del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios suelen asociar una molécula fluorófora que permitirá observar el marcaje final en un microscopio óptico de fluorescencia. En esta tinción se utilizó un anticuerpo primario anti-polihistidinas de ratón (mAB-anti

polihistidina (Sigma)) para su unión específica a la cola de histidinas de ApoD, y un anticuerpo secundario de suero cabra inmunogenizada frente ratón (GaM-Alexa488 (Jackson InmunoResearch)).

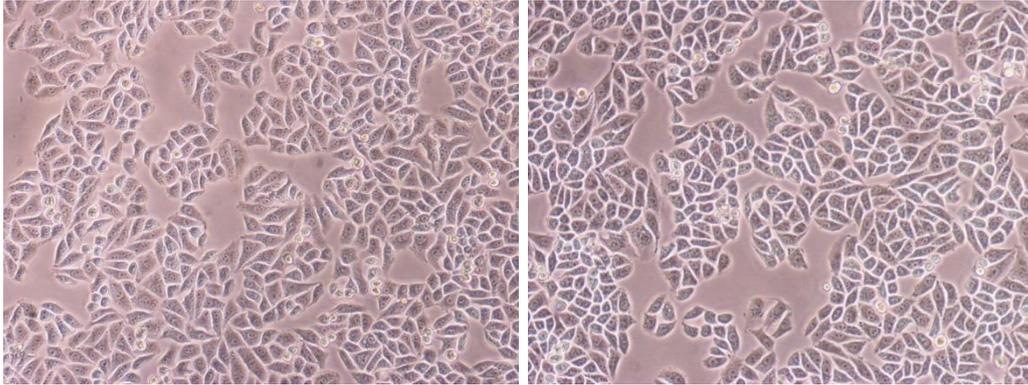


Figura 7. Imagen de microscopio óptico 4x de las células HeLa trasfectadas.

En una placa de porta se colocó la muestra de HeLa trasfectadas y se añadió por pocillo 800 μL de tampón PBS y 300 μL del detergente Tw20 al 0.1% para permeabilizar las membranas y permitir el paso de los anticuerpos al interior. También se añadieron 3 μL de suero de cabra no inmunogenizada frente a ratón para bloquear posibles antígenos a los que se podría unir el anticuerpo secundario de forma inespecífica en pasos posteriores. Se incubó 15 minutos con la solución de bloqueo antes de añadir 0.2 μL / pocillo del anticuerpo primario monoclonal para Histidinas (1:1000). Se incubó durante 2h, se lavaron los pocillos y se añadieron 250 μL / pocillo de anticuerpo secundario (1:2000). Este anticuerpo emite una fluorescencia verde que permitirá localizar ApoD en las células mediante microscopio de fluorescencia. Se incubó 1 hora y se hizo un triple lavado de los pocillos con PBS. Por último, se realizó un marcaje de los núcleos con DAPI-VectaShield, un colorante fluorescente para ADN, añadiendo 250 μL 1:5000 a cada pocillo. Se incubó 10 minutos y se lavó para proceder a observar las células con microscopía de fluorescencia.

4. Técnica de ELISA para cuantificación de ApoD secretada por células HeLa

Se sembraron $3.9 \cdot 10^6$ células HeLa en medio de mantenimiento durante 48h, dejando actuar a la Geneticina como antibiótico de selección de las HeLa que contienen el plásmido de ApoD. Pasadas 48h, se cambió a un medio sin antibiótico (las células SH-SY5Y APP_{swe} a las que se les va a añadir el medio condicionado no son resistentes a Geneticina) y sin rojo fenol (indicador de pH con propiedades antioxidante que puede interferir con el efecto de ApoD). Tras 24h de incubación, se recogió este medio denominado “condicionado” enriquecido en ApoD producido por las HeLa. Este, se añadió a las SH-SY5Y APP_{swe} más adelante para medir su efecto sobre la peroxidación lipídica en un TBARS.

Previamente, se halló la concentración del hApoD en el medio condicionado de las HeLa mediante un ensayo de inmunoadsorción (ELISA). Este es una técnica que permite detectar y cuantificar una proteína concreta mediante su unión a anticuerpos específicos que desencadenan una reacción enzimática colorimétrica. De la medida de la absorbancia resultante de dicha reacción a 450nm se obtiene la concentración de la proteína medida, en relación a concentraciones conocidas de una curva patrón. El kit empleado (Human Apolipoprotein D ELISAPRO, Mabtech, Suecia) tiene un anticuerpo anti-ApoD en fondo de los pocillos. Al ApoD fijado al anticuerpo primario, se unirá un segundo anticuerpo conjugado con Biotina. Esta molécula tiene afinidad por la estreptavidina, que se conjuga al enzima HRP que producirá la reacción colorimétrica cuando se le añada el sustrato TMB, para su posterior medición de absorbancia y cuantificación respecto a la curva patrón. El funcionamiento se detalla en la Figura 8.

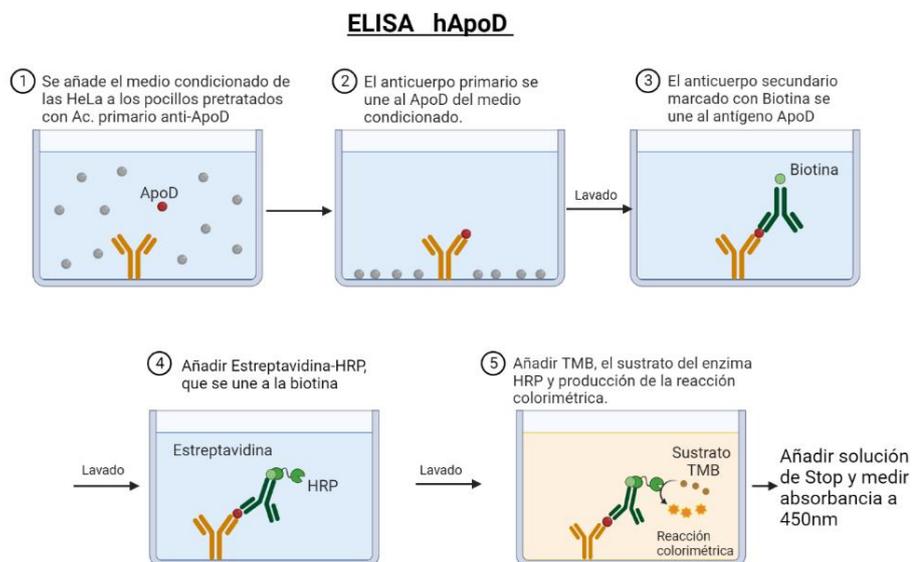


Figura 8. Representación gráfica de la técnica ELISA realizada de hApoD.

Para realizar el ELISA hay que preparar los medios buffer pertinentes (ApoD ELISA, *Washing* y *Standard Reconstitution buffer*), preparar las diluciones de las muestras en ApoD ELISA buffer a 1:10 y la dilución seriada de hApoD purificado Standard para la curva patrón (32-16-8-4-2-1-0,5-0 ng/mL) en ApoD ELISA buffer también. Con los estándares y las muestras preparadas, se comenzó con cinco lavados de la placa con 300 μ L /pocillo de washing buffer con pipeta multicanal para reconstituir los anticuerpos liofilizados en el fondo de los pocillos. Se pipetearon 100 μ L de los estándares diluidos para realizar la curva patrón y 100 μ L del medio condicionado (1:10) por triplicado. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente para después repetir 5 lavados con *Washing buffer* antes de añadir 100 μ L /pocillo de anticuerpo secundario (1:1000). Se incubó durante una hora en oscuridad antes de volver a lavar 5 veces los pocillos. Se añadieron entonces 100 μ L /pocillo de Estreptavidina-HRP

(1:1000) y se incubó durante otra hora en oscuridad. Tras otros cinco lavados, se añadió el sustrato de HRP (mantenido a 4°C previamente) y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. TMB es el sustrato del enzima HRP cuya reacción generará una coloración azul en los pocillos. Por último, se paró la reacción con 100 µL por pocillo de “Stop solution”, que produce un cambio de color a amarillo, y se midió la absorbancia a 450 nm en el lector de placas (SOFTmax Pro; Molecular Devices) sustrayendo el fondo a 650 nm.

5. TBARS para medir la peroxidación lipídica de la línea celular SH-SY5Y APP_{swe}

El ensayo de TBARS (*Thiobarbituric acid reactive species*) es un experimento para medir la peroxidación lipídica celular a través de especies reactivas del ácido tiobarbitúrico. El malondialdehído (MDA) es el principal producto celular del metabolismo lipídico en condiciones de estrés oxidativo. A altas temperaturas y en ambiente ácido, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando el compuesto MDA-TBA, que tiene una pigmentación rosácea que se puede detectar por colorimetría. Las concentraciones halladas se normalizan por cantidad de proteína hallada en la muestra mediante un ensayo de BCA.

Por tanto, vamos a medir indirectamente el MDA producido por las células SH-SY5Y APP_{swe} mediante la reacción de TBARS bajo tres condiciones: normalidad (control negativo), estrés oxidativo (Paraquat 0,5mM sin ApoD) y, estrés oxidativo con agente oxidorreductor (Paraquat 0,5mM con ApoD). Se prepararon 9 Flasks T25 con $1,5 \cdot 10^6$ células para hacer triplicados de cada una de las condiciones. Se añadieron los medios de tratamiento siguientes y se dejó incubar 24 horas.

- Control: 4ml de medio de tratamiento utilizado en las HeLa (Glutamina 1%, Penicilina-Estreptomicina 1% y DEMEM (Gibco ref. 31053-028))
- Situación de estrés oxidativo: tratamiento con Paraquat 0,5 mM (50 µL obtenidos de un stock de Paraquat 40 mM) + 4 mL de medio de tratamiento de las Hella (Glutamina 1%, Penicilina-Estreptomicina 1% y DEMEM)
- Situación de estrés oxidativo con proteína neuroprotectora: tratamiento con Paraquat 0,5 mM (50 µL obtenidos de un stock de Paraquat 40 mM) + 4 mL del medio condicionado de las HeLa, recogido tras la incubación de 24h que contiene ApoD.

Tras las 24 horas, se recogió el medio de cada Flask en un tubo verde por separado. Ya que también interesa medir la peroxidación de las células ya muertas o levantadas del Flask. Se levantaron las células con 1 mL de tripsina. Se añadieron 4 mL de suero (DMEM; FBS 10%) y se llevó el volumen al tubo verde. Se realizó una centrifugación de 7 minutos a 1000rpm y se retiró el sobrenadante. Después, se dio un spin de 15 segundos a máxima potencia para retirar cualquier resto de medio con una pipeta porque hay que evitar que la muestra quede

diluida. Se congeló la muestra a -80°C durante 24 horas.

Tras ese periodo se prepararon los reactivos de TBA (0,5% TBA (Sigma), 0,5% SDS en Mili-Q- H_2O), Glicina-HCl (0,75 g glicina, 104 μL HCl 5M, Mili-Q- H_2O) y el estándar de MDA 80 μM (MDA 10 mM (Sigma), TRIS 50 mM (Acros Organics) para elaborar la curva patrón con seis concentraciones diferentes (80-40-20-13,3-10-0 μM MDA). El reactivo de TBA se prepara agitando la solución mediante vórtex y dejándola en baño de 40°C que facilita su disolución. El SDS no se añade hasta que se vaya a utilizar. Por otro lado, el reactivo de glicina-HCl se prepara con ayuda de un pH-metro añadiendo HCl paulatinamente hasta alcanzar un pH de 3,6, el necesario para que se produzca la reacción del TBA con el MDA.

El siguiente paso es la descongelación de las células, con las que se genera una suspensión de 15 μL en PBS de la que se separan 12 μL para el TBARS y 5 μL para el ensayo de cuantificación proteica BCA. En cada muestra de 12 μL del TBARS y a los estándares previamente preparados (también de 12 μL) se añadieron los reactivos del ensayo: 390 μL del tampón de Glicina-HCl y 250 μL de TBA-SDS. Se incubó en el termociclador a 90°C durante 45 minutos con las tapas de los tubos reforzadas para que no salten por la evaporación. Después, se enfriaron los tubos en hielo y se cargaron 200 μL / pocillo de cada muestra por triplicado en una microplaca. Se leyó la absorbancia a 532 nm mediante el lector de placa y se interpoló con las concentraciones de la curva patrón para obtener las concentraciones de MDA de las células SH-SY5Y APP_{swe} en las distintas condiciones aplicadas (SOFTmax Pro; Molecular Devices).

Por último, la concentración de proteínas de cada muestra se estimó utilizando el kit de Micro BCA™ (ThermoFisher Scientific). Se preparó la curva patrón con BSA (albúmina de suero bovino) a 8 concentraciones diferentes para la lectura posterior en el lector de placas. Las muestras previamente reservadas (5 μL) se diluyeron a 1:200 y 1:400 (en PBS y SDS 2% (Acros Organics)) y se pipeteó en la placa por triplicado cada dilución de cada muestra, previamente mezcladas con el reactivo de la BCA (ácido bicinconínico), que también se aplicó a los estándares. Se incubó durante 2 horas a 37°C y se leyó la placa a 562 nm (longitud de onda resultante de la reacción colorimétrica) para obtener la concentración de proteína de cada muestra en función de la curva patrón.

Introducción

El Alzheimer es la primera causa de demencia en el mundo. Es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la presencia de placas de péptido Aβ y ovillos neurofibrilares de proteína tau fosforilada que condicionan progresivamente una atrofia cortical. El Aβ es producido a partir del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP). Cuando APP es procesada por la β-secretasa y la γ-secretasa, se libera péptido Aβ al medio, mientras que si es cortada por la α-secretasa no se produce amiloidogénesis.



La apolipoproteínaD es una proteína neuroprotectora producida por las células de la glía. Su conformación estructural y su residuo Met63 le permite catalizar la reducción de lípidos peroxidados. Su expresión aumenta en situaciones de estrés celular.



En este trabajo se ha empleado la línea neuronal SH-SY5Y APP Swe portadora de un plásmido con el gen APP Swedish mutado (670-671: KM<NL>) que condiciona una mayor afinidad por la β-secretasa produciéndose entre 6-8 veces más Aβ que la línea nativa o *wildtype*.

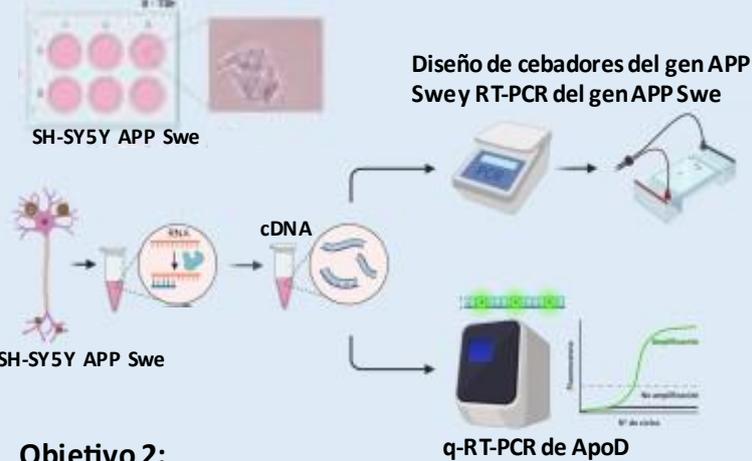
Objetivos

1. Caracterización del modelo celular SH-SY5Y APP Swe
2. Estudio de la peroxidación lipídica de SH-SY5Y APP Swe en presencia de ApoD obtenido de células HeLa portadoras de un plásmido productor de la proteína

Métodos

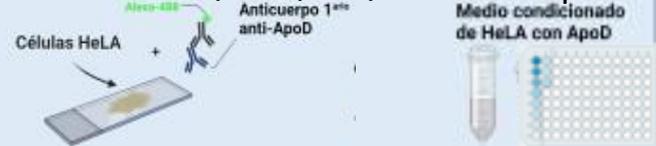
Objetivo 1:

Conteos celulares seriados

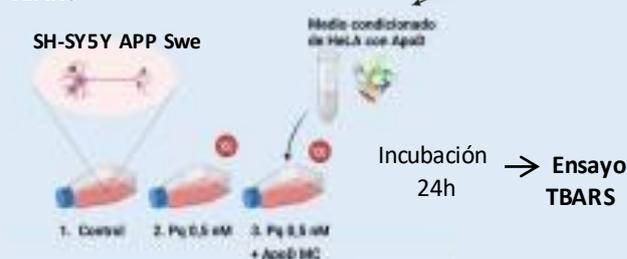


Objetivo 2:

Tinción Inmunocitoquímica para ApoD

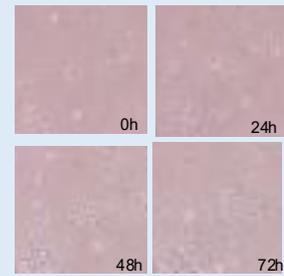
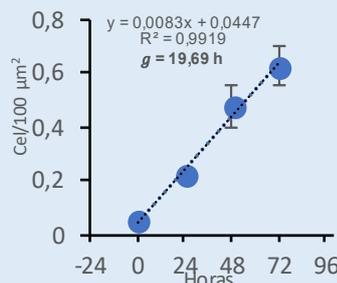


TBARS

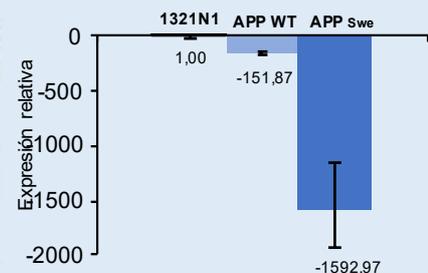


Resultados

Objetivo 1:



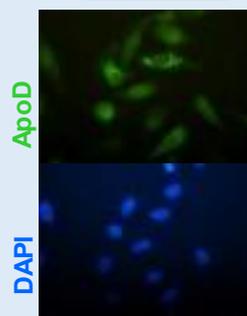
Curva de proliferación de SH-SY5Y APP Swe



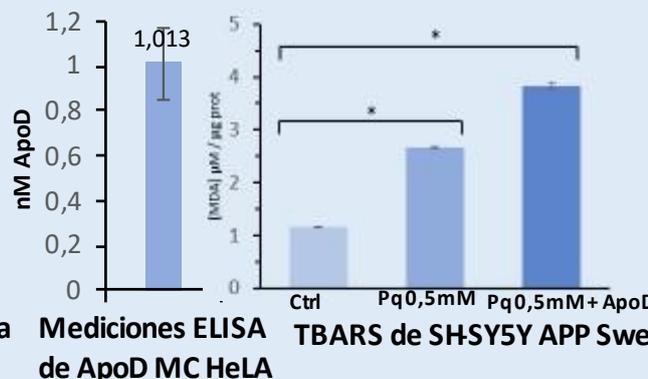
Gel de RT-PCR para gen APP Swe

Análisis de qPCR de ApoD

Objetivo 2:



Inmunocitoquímica de células HeLa



Mediciones ELISA de ApoD MC HeLa

TBARS de SH-SY5Y APP Swe

Discusión

Los resultados obtenidos del TBARS contradicen las propiedades neuroprotectoras de ApoD ampliamente avaladas por la literatura, y sugieren un problema en la técnica que se ha de investigar en términos de concentración y purificación de ApoD, contaminación del medio condicionado de las HeLa o pérdida de conformación funcional de la proteína.

Conclusiones

1. SH-SY5Y APP Swe contiene la mutación Swedish del gen APP que puede identificarse mediante los cebadores diseñados.
2. SH-SY5Y APP Swe no expresa ApoD de forma basal.
3. El ApoD obtenido del medio condicionado de las HeLa no reduce la peroxidación lipídica en las células SH-SY5Y APP Swe. Es preciso continuar el estudio mediante la investigación de la funcionalidad de este ApoD en términos de conformación, agregación y purificación.