Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

2001
2006

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BE, PIV, BCC, NANOS i BP

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA - REGISTRE GENERAL
ENTRADA
001 Nº. 200700048877
04/12/07 11:33:26

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria
BE

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior (BCC)
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya (BE)
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós (BP)
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies (NANOS)
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya (PIV)

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Accions no canoniques dels Inhibidors de l'Acetilcolinesterasa (IAChE): estudis in vivo i in vitro de les huprines i heterodímers huprina X i tacrina.

Dades de l'investigador

Nom
M VICTORIA

Cognoms
CLOS GUILLEN

Correu electrònic
victoria.clos@uab.es

Dades del centre d'origen

Det de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia
Universitat Autònoma de Barcelona
Campus Bellaterra

Número d'expedient
2006 BE-2 0006

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
ratolins triple transgenics, beta-amiloid, receptors nicotinics, anticolinesterasics, sinaptofisina

Data de presentació de la justificació
03.12.07

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)

Els anticolinesteràsics són els fàrmacs aprovats actualment per el tractament paliatiu d'aquesta malaltia. En l'intent de trobar fàrmacs capaços de modificar l'evolució de la malaltia s'han sintetitzat nous compostos que conserven l'activitat anticolinesteràsica però que a mes, són capaços d'interaccionar amb la cascada de formació de la proteïna beta-amiloid i la proteïna tau, principals agents patogènics d'aquesta malatia. L'objectiu fonamental del projecte era el d'analitzar el contingut de proteina beta-amiloid, de receptors nicotinics, de GPAF i sinaptofisina en mostres de cervell de ratolins triple transgenics (APPsew, tau, PS1; 3xTg) tractacs previament amb Huprina X (0.04 mg/Kg) i Huperzina A (0.2 mg/kg). El projecte es va iniciar amb l'anàlisi del contingut de proteïna beta-amiloid en l'escorça de ratolí. Durant el proces de determinació d'aquesta proteïna van sorgir difcultats ja que no vam poder detectar cap de les dues fraccions de proteïna beta-amiloid (40 i 42 soluble i insoluble) mitjançant el test d'ELISA específic per aquesta proteïna. Com contraprova per tal descartar problemes metodologics es va utilitzar un mètode histoquímic per tal de visualitzar la proteïna beta-amiloid, del que vam obtenir resultats negatius. Aquest proteïna és un marcador esencial per aquest tipus d'animals transgènics per tant es va decidir genotipar les mostres a fi i efecte d'assegurar-nos que no hi s'havia introduit cap error durant la manipulació dels animals. Per tant es va aturar l'estudi fins a coneixer el resultat de la genotipació. Durant aquest periode es van preparar totes les mostres per a les diferents determinacions: talls de cervell per a l'estudi dels receptors nicotinics i obtenció de les fraccions cel·lulars corresponents per a la determinació de la GFAP i la sinaptofisina. També es va aprofitar aquest període per a l'aprenetatge de les diferents tècniques que posteriorment s'havien de desenvolupar. El resultat de la genotipació es va obtenir al final del periode d'estancia en el laboratori, i és per això que a patir d'ara estarrem en constant contacta a fi i efecte de poder dur a terme totes les determinacions que s'havien inclos en el projecte. També durant aquest temps (de l'1 febrer al 30 de juny del 2007) vaig impartir un seminari i vaig assistir a diferents conferencies i reunions.

Resum en anglès(màxim 300 paraules)

Acetylcholinesterase inhibitors are the approved drugs for palliative treatment of Alzheimer disease. Different compounds are being synthesized to obtain new drugs able to interact in the amyloid cascade besides to inhibit the acetylcholinesterase activity. The main goal of the present project was to analyze the content of beta-amilod protein, nicotinic receptors, GFAP and sinaptophysin in the brain of triple transgenic mice (APPswe, tau and PS1; 3xTg) previously treated with huprine X (0.04 mg/kg) and huperzine A (0.2 mg/kg). Due to the presence of A-beta protein is the most important marker of this kind of transgenic mice, first of all, the content of A-beta1-40 and A-beta1-42 (soluble and insoluble) was analyzed using a specific ELISA test. Nevertheless, we were not able to detect such protein using this methodology. Consequently, to rule out any methodological problem samples were analyzed using a histochemical method. Negative results were also obtained. Therefore, to check if some handling mistake was introduced during mice treatment, we decided to genotype the samples. At the same time slices for autoradiographic analysis of nicotinic receptors and subcel·lular fractions for GFAP and synaptophysin were prepared. We obtained the results of genotyping at the end of my stay in the lab demonstrating that all samples belong to 3xTg mice, so we will be in continuously contact in order to determine all of parameters that we have included in the project. In addition, during that period (from 1rst of february to 30th of june of 2007) I presented a seminar and also I have attended different conferences and meetings.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

ANTECEDENTS

S'ha demostrat que la malaltia d'Alzheimer (MA) és una alteració relacionada amb importants dèficits colinèrgics cerebrals. Són fins ara els inhibidors de l'Acetilcolinesterasa (IAChE), els fàrmacs que han mostrat una major eficàcia en el tractament simptomàtic d'aquesta malaltia (1). A mes de la seva acció paliativa, degut a que restableixen els nivells d'acetilcolina, s'ha pogut demostrar que alguns d'aquests fàrmacs poden intervenir en el proces de desenvolupament de la malaltia i modificar-ne la seva evolució (2). Sembla ser que durant aquest proces patològic hi ha diferents factors colinèrgics afectats tals com els receptors nicotínics (3) també afectats en altres processos neurodegeneratius, observant-se, a mes, que alguns IAChE (amb poca capacitat per inhibir l'enzim) eren capaços d'activar alostericament aquests receptors (4) mentre que les seves accions inhibidores sobre l'AChE eren poc remarcar-les.

Altres dades també posen en evidència que els IAChE mostren capacitat per intervenir, directa o indirectament, en el proces evolutiu de la MA. Així doncs poden modificar el metabolisme de la propteina precursora d'amiloide (APP) i per tant el contingut de beta amiloide possiblement a través dels receptors muscarínics i també nicotínics. Poden intervenir, els IAChE, en el proces d'agregació de la proteina beta-amiloide a través de la inhibició del lloc perifèric de l'enzim (5), relacionat amb el proces d'agregació (6). Una altra propietat important que presenten molts d'aquests fàrmacs, és la seva capacitat neuroprotectora, que estaria relacionada amb els receptors nicotínics, fonamentalment (7-9).

Resultats previs obtinguts en el nostre laboratori han demostrat que les huprines, un grup de potents IAChE sintetitzats en el laboració del Dr P Camps (laboratori de Química farmacèutica de la UB) tenen capacitat per unirse i estimular els receptors muscarínics M1 i a més i molt important, es comporten com agonistes alostèrics sobre els receptors nicotínics (10,11,12).

En base als resultats tant interessants obtinguts en estudis in vitro amb aquests compostos, es va decidir estudiar l'efecte d'aquest compostos in vivo. En primer lloc es va analitzar la millora en la realització de diferents de tests de comportament (memòria i aprenentatge) en animals vells (treball de suficiencia investigadora presentat per Miriam Ratia el setembre del 2007). Els resultats obtinguts en aquest treball van demostrar que les huprines i especificament la huprina X era capaç de millorar significativament la resposta dels ratolins tractats amb aquest IAChE comparats amb el grup control. L'anàlisi de diferents paràmetres bioquímics també van confirmar el paper de les huprines en els processos de memòria i aprenentatge. Per aquest motiu es va disenyar un nou estudi in vivo però utilitzant un model de ratolí 3xTg que presenta que sobre-expresa la proteïna beta amiloid, la presenilina1 i la tau fosforilada. Els estudis de comportament realitzats en aquest model de ratolí (3xTg) han demostrat de nou el paper d'aquests compostos en millores en el comportament dels ratolins tractats en front als controls.

BIBLIOGRAFIA

1. Michaelis, M. L. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003,** *304*(3), 897-904.

2. Giacobini, E. *Neurochemical Research* **2003,** *28*(3-4), 515-522.

3. Hogg, R. C.; Bertrand, D. *Curr.Drug Targets.CNS.Neurol.Disord.* **2004,** *3*(2), 123-130.

4. Kihara, T.; Sawada, H.; Nakamizo, T.; Kanki, R.; Yamashita, H.; Maelicke, A.; Shimohama, S. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **2004,** *325*(3), 976-982.

5. Pera, M.; Roman, S.; Ratia, M.; Camps, P.; Munoz-Torrero, D.; Colombo, L.; Manzoni, C.; Salmona, M.; Badia, A.; Clos, M. V. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **2006,** *346*(1), 89-94.

6. Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Perez, C. A.; Moreno, R. D.; Vicente, M.; Linker, C.; Casanueva, O. I.; Soto, C.; Garrido, J. *Neuron* **1996,** *16*(4), 881-891.

7. Wang, L. S.; Zhou, J.; Shao, X. M.; Tang, X. C. *Brain Research* **2002,** *949*(1-2), 162-170.

8. Zhou, J.; Fu, Y.; Tang, X. C. *NueroReport* **2001,** *12*(10), 2073-2077.

9. Takada, Y.; Yonezawa, A.; Kume, T.; Katsuki, H.; Kaneko, S.; Sugimoto, H.; Akaike, A. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003,** *306*(2), 772-777.

10. Román, S.; Vivas, N. M.; Badia, A.; Clos, M. V. *Neuroscience Letters* **2002,** *325*(2), 103-106.

11. Alcala, M. M.; Maderuelo, A.; Vivas, N. M.; Camps, P.; Munoz-Torrero, D.; Clos, M. V.; Badia, A. *Neuroscience Letters* **2005,** *379*(2), 106-109.

12. Roman, S.; Badia, A.; Camps, P.; Munoz-Torrero, D.; Clos, M. V. *Brain Research* **2005,** *1061*(2), 73-79.

OBJECTIUS

Per tot lo exposat anterioment l'objectiu que finalment es va plantejar va ser el de analitzar en el cervell dels ratolins 3xTg tractats amb el IAChE possibles modificacions en alguns del paràmetres de major relevancia en la MA. Es per això i d'acord amb la Dra Agenta Nordberg es va plantejar com objectiu determinar el contingut de proteïna beta-amiloid 1-40 i 1-42 (soluble i insoluble), receptors nicotínics per una banda i determinació del contingut de sinaptofisina, de l'altra, com indicador de l'activitat sinàptica en aquests ratolins.

MÈTODES

Preparació del teixit per a l'anàlisi bioquímic de les mostres

La majoria de determinacions es van dur a terme en l'escorça cerebral. Així donc s es va organitzar el material en funció dels requeriments de cada determinació.

La meitat del cervell es va deixar congelat a –80ºC per a l'obtencio dels talls de teixit cerebral per a la determinació del contingut de receptors nicotínics.

De l'altra meitat es van separar l'escorça i el'hipocamp. Vam iniciar l'estudi amb la preparació de l'escorça donat que segons la bibliografia aquesta regió cerebral és la que presentaba un major contigut en proteïna beta amiloid. En aquest sentit, i en funció de les determinacions a realitzar l'escorça es va dividir en un 75% per a les determinacions de la proteïna beta amiloid i la sinaptofisina i el 25% per a la determinació de la GFAP.

El 75% de l'escorça es va homogenitzar en tampó Tris 20 mM i un cop homogenitzat el teixit, aquest es va dividir un altra cop en un 75% per a la determinació de la proteïna beta amiloid i un 25% per a la determinació de la sinaptofisina.

Determinació de la concentració de proteïna Beta amiloid

L'homogenat previament obtingut, es va centrifugar a 40.000 rpm 1h a 4ºC. El sobrenadant obtingut (S1) s'enmagatzema a – 20ºC. Aquest sobrenadant conté la proteïna beta-A soluble, mentre que la Abeta insoluble o sigui la que ja està formant part dels agregats i de les plaques es torba en el pelet d'aquesta centrifugació.Per poder solubilitzar la proteïna Beta-A insoluble, el pelet es resuspen en 10 volums (de guanidine 5M-cocktail de proteases) en relació al pes del teixit. Agitar-ho a temperatura ambient al menys durant 2 hores. Posteriorment cada mostra es dilueix 1:10 amb la solució PBS 1mM + 0,5% BSA + 0,05% Tween 20, això implica que la concentració de guanidina dins del tub és ara de 0,5 M. A continuació les mostres es centrifugen a 13.000 rpm 4ºC, 25 min i el sobrenadant així obtingut conté la Abeta insoluble (la soluble en guanidina). Es guarda a -20ºC.

Per a la determinació del contingut d'aquesta proteïna es va utilitzar un kit (ELISA) de la casa Biosoucer human beta-amyloid 1-42 i beta-amiloid 1-40. Per a la determinació de la Abeta insoluble és necessari que la concentració de guanidina, que en les mostres congelades és de 0,5 M, és dilueixi a 0,1M, per tant les mostres és diluiran amb PBS 1:5. Pel que fa a les mostres de l'Abeta soluble es van utilitzar les mostres directament o bé diluides, en funció de la concentració de proteïna en les mostres.

Determinació de receptors nicotínics

Per a la determinació del contingut de receptors nicotínics les mostres provinents de la meitat de cervell van ser seccionades mitjançant un criostat. Previament les mostres s'han d'aclimatar a la temperatura de –18ºC a la que està el criostat. Tot el proces es du a terme a aquesta temperatura. Es prepara el suport per el teixit mitjançant una matriu adhesiva a on s'enganxarà la meitat del cervell. Posteriorment s'afegirà una gota de la mateixa matriu per tal de fixar el teixit. Les mostres van ser seccionades a

16 micres i depositades en sèries de 3 a cada porta i posterioment congelats fins a la seva utilització per a la incubació amb el radiolligant corresponent. Aquesta determinació, al igual que les restants, no es va dur a terme donat que, tal com he comentat anteriorment, es va haver de realitzar la genotipació de totes les mostres per tal de verificar que eren provinents de ratolins triple transgènics.

Determinació de la sinaptofisina

Teixit preparat i pendent de determinació

Determinació del GFAP

Teixit preparat i pendent de determinació

RESULTATS

El experiments els vam iniciar amb la determinació del contingut de les dues formes de proteïna beta-amiloid (1-40 i 1-42), tant la fracció soluble com la fracció insoluble, donat que els animals trangènics que sobre-expressen aquesta proteïna es caracteritzen per presentar uns nivells elevats.

En primer lloc es van realitzar una sèrie d'experiments controls a fi i efecte provar d'establir les condicions pròpies per a les nostres mostres. Per sorpresa nostra no vam poder detectar cap de les dues proteïnes en cap de les dues fracccions, la soluble i la insoluble. No acompanyo cap gràfica ni cap taula ja que tots els resultats van ser negatius.

Degut això es van realitzar numeroses proves per tal d'eliminar qualsevol problema realcionat amb la tècnica , però en cap cas vam poder trobar una resposta al fet de no detectar la proteina beta-amiloid, tenint en compte que la bibliografia descriu que, a aquesta edat (7 mesos), els ratolins 3xTg presenten nivells detectables d'aquesta proteïna.

Donades les circunstàncies, es va decidir realitzar una comprovació de les característiques genètiques d'aquests ratolins per tal de descartar errors deguts a la manipulació dels animals.

Es van realitzar les genotipacions i els resultats van posar en evidència que les mostres dels ratolins 3xTg eren correctes i que per tant el problema havia de ser degut a altres motius. Com és fàcil d'entendre, la resta d'experiments que s'havien de realitzar amb aquestes mostres no es van dur a terme fins a tenir el resultats de la genotipació, la qual cosa no succeir fins a finals de juny, que coincidia amb el final de la meva beca.

De tota manera actualment estic en contacte amb el laboratori de la Dra Agenta Nordberg per tal de continuar amb el projecte. A més el meu departament, així com la meva Universitat em permeten absentar-me en certs períodes a fi i efecte de poder continuar amb aquest projecte.

Malgrat tots els entrebancs que vam tenir, durant aquest periode, vam preparar les mostres per a les determinacions programades en espera dels resultats de la genotipació. En conseqüència es van fer els corresponents talls de teixit per a la determinació del contingut de receptors nicotínics, i la preparació de les diferents fraccions subcellulars per a la determinació de la sinaptofisina i GFAP, metodologies totes elles descrites en l'apartat anterior.

ACTIVITATS COMPLEMENTARIES

La Divisió de Neurofarmacologia Molecular del Departament de Neurotec de l'Institut Karolinska, organitza de forma regular una sèrie de seminaris i reunións a les que he assistit durant la meva estància en aquest laboratori.

Pels estudiants de doctorat hi un seguit de conferències que formen part dels crèdits del programa teòric que han de realitzar a fi d'assolir el grau de doctor a mes, per suposat, del treball experimental. Durant el segón semestre el tema general d'aquestes conferencies va esser "La proteïna beta-amiloid". Dins d'aquest cicle de

conferències vaig participar-hi amb la conferència "Acetylcholinesterase as an enhancing factor in amyloidogenic processes: role of acetylcholinesterase inhibitors"

La organització de journals clubs va ser una bona experiència i representa un bon estímul per a la lectura i discussió d'articles recents i d'interés general pel grup de recerca.

Per últim, l'assitència a reunions de la Unitat, relacionades amb questions de funcionament em va oferir l'oportunitat de poder veura diferents sistemes d'organització, dels que sempre es poden extreure idees aplicables en el nostre entorn.