

Caracterización de la toxicidad por ácido okadaico en un modelo celular de hiperfosforilación de Tau

Ana Andrade Moreno. Lorena De Agustín Sierra.

Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
aandrade@estumail.ucm.es. lorendea@estumail.ucm.es

Tutoras

Paloma Bermejo Bescós. Sagrario Martín-Aragón Álvarez.

Facultad de Farmacia. Departamento de Farmacología. Universidad Complutense de Madrid.
bescos@ucm.es. smartina@ucm.es

Resumen: La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa que se caracteriza por depósitos de β -amiloide, ovillos neurofibrilares, y pérdida neuronal y sináptica. En la EA la proteína Tau sufre procesos de hiperfosforilación, desencadenando daño y apoptosis neuronal. El ácido okadaico (AO) es capaz de inhibir fosfatasas que defosforilan la proteína Tau. El objetivo de este estudio es contribuir a la caracterización de la toxicidad por AO en un modelo celular que sobreexpresa la proteína Tau. Se utilizó como modelo de Alzheimer experimental la línea celular HEK293 que sobreexpresa la proteína Tau humana, estudiándose el efecto del AO a 10 y 30 nM sobre las actividades de las caspasas 3, 8 y 9 y la actividad del proteasoma 20S y 26S. Se observó un incremento significativo de la actividad de caspasa 3, 8 y del proteasoma 20S con la concentración de AO de 30 nM, mientras que con la de 10 nM sólo se obtuvieron incrementos significativos en la actividad caspasa 3. El aumento de la actividad de caspasa 3 y 8 y la no modificación de la actividad caspasa 9 descarta la vía mitocondrial en la toxicidad por AO en las condiciones experimentales estudiadas. Además, la hiperfosforilación de Tau inducida por AO aumenta la actividad del proteasoma 20S.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer. Hiperfosforilación. Proteína Tau. Ácido okadaico.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia neurodegenerativa más frecuente en países desarrollados. Se ha demostrado que las primeras alteraciones biológicas de la enfermedad se inician décadas antes de la aparición de los primeros síntomas. La EA se caracteriza por depósitos de β -amiloide, ovillos neurofibrilares, y

pérdida neuronal y sináptica. Las zonas afectadas inicialmente son el hipocampo y el córtex entorrinal, y posteriormente áreas de asociación corticales. A medida que progresa la degeneración neurofibrilar y los depósitos de β -amiloide, se alcanza el umbral para que aparezcan los primeros síntomas clínicos. Cuando el deterioro cognitivo progresa e interfiere con el funcionamiento social y ocupacional, se alcanza la fase de demencia.

Por otra parte, la hiperfosforilación de la proteína Tau, asociada a la estabilidad de los microtúbulos celulares, da lugar a la formación de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas que son reflejo de la destrucción de microtúbulos y neurofilamentos, lo que finalmente ocasiona daño y muerte neuronal. La hiperfosforilación de la proteína Tau inducida por ácido okadaico *in vivo* es un modelo aceptado de muerte neuronal⁽³⁾.

El ácido okadaico es una toxina productora de intoxicaciones diarreicas características por la ingesta de moluscos. Se aísla principalmente de dinoflagelados como *Dinophysis acuta* y *Prorocentrum lima*. La capacidad de producir desórdenes en la memoria de sujetos intoxicados por la ingesta de pescados contaminados por dinoflagelados se ha asociado con el ácido okadaico⁽²⁾. Además, se ha demostrado que el ácido okadaico es un potente inhibidor de Serina/Treonina fosfatasas. Las proteínas Serina/Treonina fosfatasas (PP1 y PP2A) son capaces de defosforilar proteínas Tau *in vitro*. La acción inhibitoria sobre PP1 y PP2A producida por el ácido okadaico se aprovecha para el estudio de patologías en las que se alteran procesos celulares que comprenden la fosforilación de proteínas.

Las proteínas Tau son proteínas microtubulares que abundan en las neuronas y su principal función es la estabilización de los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina. En cerebros afectados por la enfermedad de Alzheimer, se ha observado una disminución de la actividad de las fosfatasas. Esta disminución de la actividad parece estar relacionada con una ralentización del proceso de defosforilación de Tau. La administración intracerebroventricular de ácido okadaico en ratas provoca disfunciones en la memoria, cambios neuropatológicos que incluyen: neurodegeneración del hipocampo, hiperfosforilación de Tau y formación de placas β -amiloide. Por lo que, el ácido okadaico podría ser una herramienta útil en la investigación de patologías que alteran procesos celulares regulados por fosforilaciones reversibles de proteínas, como la transducción de señales, división celular y memoria.

El objetivo de este estudio es contribuir a la caracterización de la toxicidad por ácido okadaico en un modelo celular que sobreexpresa la proteína Tau, mediante la evaluación de la actividad de caspasas y proteasoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular

Se utilizó como modelo de Alzheimer experimental la línea celular HEK293, la cual sobreexpresa la proteína Tau humana (4R1N). La línea celular fue donada por el Dr. Brian C. Kraemer (Division of Gerontology and Geriatric Medicine, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA 98104, USA)⁽¹⁾. Las células HEK/Tau fueron cultivadas en un medio completo DMEM, suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS) y 100 µg/ml de zeocina. El medio de tratamiento celular se compone de medio DMEM suplementado con 1% de FBS y 5 µg/ml de gentamicina.

Tratamiento de las células con ácido okadaico

Se procede con la siembra de 10^6 células/placa Petri de 6 cm de diámetro en medio completo, hasta el 80% de confluencia (aproximadamente a las 72 horas). Una vez alcanzada dicha confluencia, las células fueron tratadas con ácido okadaico a 10 y 30 nM en medio de tratamiento, incubándose durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Al finalizar el tratamiento, se elimina el medio de cultivo obteniéndose el pellet celular donde se procedió a la medida de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 y al estudio de la actividad del proteasoma 20S y 26S.

Medida de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9

La determinación de la actividad de las caspasas se realizó en el extracto citosólico. Para su obtención, el pellet celular se resuspendió en 120 µl de tampón A (10 mM HEPES (pH = 8), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM FNa, 1 nM NaVO₄, 10 mM Na₂MoO₄, 10 µg/ml leupeptina, 0,5 mM PMSF, 10 µg/ml pepstatina) y se mantuvo en hielo durante 15 min. Posteriormente, se añadieron 15 µL de NP-40 al 10%, se agitaron los tubos vigorosamente en Vortex durante 15 s y se centrifugaron a 8000 g durante 1 min a 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante (extracto citosólico). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. Se incubaron 20 µg de proteína con 20 µM de los sustratos fluorogénicos (caspasa 3, Ac-DECD-AMC; caspasa 8, Ac-LETD-AFC; caspasa 9, Ac-LEHD-AMC) en tampón de reacción (50 mM HEPES (pH = 7,4), 0,1% CHAPS, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 0,1 mM EDTA, 10 mM DTT). La mezcla de reacción se incubó durante 60 min a 37°C. La actividad de las caspasas se calculó a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida ($\lambda_{exc} = 380$ nm y $\lambda_{em} = 430-460$ nm para caspasas 3 y 9, y $\lambda_{exc} = 380$ y $\lambda_{em} = 505$ nm para caspasa 8), en un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescente reader BIOT-TEK, Programa KC junior). Los resultados se presentaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (URF).

Medida de actividad proteasoma 20S y 26S

Las células se resuspendieron en tampón de lisis frío (0,25 M sacarosa, 25 mM

HEPES (pH = 7,8), 20 mM Cl₂Mg, 1 mM EDTA, 1 mM DTT), y posteriormente se rompieron mediante 3 ciclos de congelación y descongelación. Finalmente se centrifugaron a 14000 g durante 30 min, separándose el sobrenadante y determinándose la concentración de proteínas por el método de Bradford. Se utilizaron 10 µg del extracto proteico, 50 µM del sustrato fluorogénico (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC), y tampón de reacción ATP-independiente (225 mM tampón Tris (pH = 7,8), 7,5 mM acetato de magnesio, 7,5 mM Cl₂Mg, 45 mM KCl, 1 mM DTT) y ATP-dependiente (225 mM tampón Tris (pH = 7,8), 7,5 mM acetato de magnesio, 12,5 mM Cl₂Mg, 45 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µM ATP), para evaluar la actividad del proteasoma 20S ó 26S, respectivamente. La actividad se determinó tras la incubación de la mezcla de reacción durante 60 min a 37°C. La fluorescencia se midió a $\lambda_{exc} = 360$ nm y $\lambda_{em} = 460$ nm en un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescente reader BIOT-TEK, Programa KC junior). Los resultados se representaron como porcentaje de actividad respecto a las células control (sin tratamiento).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm error estándar medio. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático SigmaPlot 11.0.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos a partir de la medida de la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 quedan reflejados con las siguientes gráficas (Fig. 1 A, B y C).

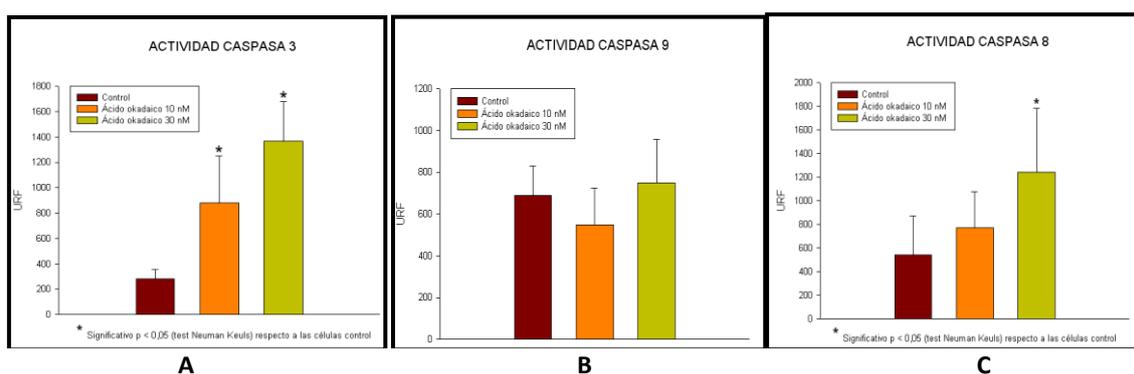


Figura 1.

En cuanto a la actividad de la caspasa 3, se observó un incremento significativo de las células tratadas, tanto con 10 como con 30 nM de ácido okadaico, respecto a las células control. En cuanto a la actividad de la caspasa 8, se apreció una actividad

significativa únicamente con la concentración de 30 nM de ácido okadaico respecto a las células control. Por último, en el caso de caspasa 9, no se obtuvieron modificaciones estadísticamente significativas tras el tratamiento con AO, respecto a las células control.

En relación a la medida de la actividad del proteasoma, los resultados obtenidos son los siguientes (Fig. 2 A y B).

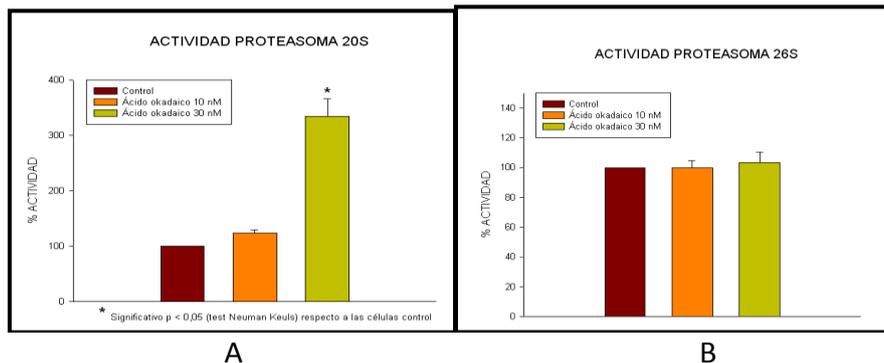


Figura 2.

El tratamiento con ácido okadaico produjo un incremento significativo de la actividad 20S tras el tratamiento con la concentración más alta (30 nM), mientras que en el caso de la subunidad 26S no se obtuvieron modificaciones significativas a ninguna de las concentraciones empleadas.

DISCUSIÓN

En las enfermedades neurodegenerativas crónicas, la apoptosis mediada por caspasas tienen un papel dominante en la mediación de la disfunción celular y la muerte celular. La vía extrínseca del proceso apoptótico, a través de receptores de muerte, está mediada por la activación de la caspasa 8, seguida de la activación de la caspasa 3, pudiendo ser amplificada dicha vía por la caspasa 9 (vía mitocondrial). Por lo tanto, las caspasas 3 y 9 son las principales caspasas iniciadoras que desempeñan un papel fundamental en la progresión de una variedad de trastornos neurológicos.

En este estudio, hemos investigado el efecto del ácido okadaico en la actividad de la caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9 en una línea celular que sobreexpresa la proteína Tau. El ácido okadaico aumentó significativamente la actividad de la caspasa 3. Con el fin de conocer la vía por la que se activó dicha caspasa, se determinó la actividad de las caspasas 8 y 9. A partir de dicha determinación se comprobó que sólo se activaba la caspasa 8 por lo que descartamos la implicación de la vía mitocondrial en la toxicidad por ácido okadaico. Sin embargo, se ha demostrado *in vivo* que la administración intracerebroventricular de ácido okadaico en ratas activa la caspasa 9,

viéndose involucrada la vía mitocondrial⁽⁴⁾.

Por otro lado, el proteasoma juega un papel fundamental en la eliminación de proteínas alteradas. Tanto *in vitro* como *in vivo* la proteína Tau hiperfosforilada es un sustrato del proteasoma. Estas proteínas, acumuladas en el Alzheimer, no sólo se encuentran hiperfosforiladas sino también ubiquitinadas, lo que sugiere que la disfunción del proteasoma podría contribuir a la formación de los ovillos neurofibrilares. En estudios previos en nuestro laboratorio se ha puesto de manifiesto que el ácido okadaico, en nuestras condiciones experimentales, produce hiperfosforilación de Tau. En el presente estudio, se ha investigado si la hiperfosforilación de Tau inducida por ácido okadaico afecta a la actividad del proteasoma. Nuestros resultados demuestran que el ácido okadaico a 30 nM aumenta la actividad del proteasoma 20S. Otros grupos de investigación⁽⁵⁾ también han puesto de manifiesto una modulación en la actividad del proteasoma 20S según el grado de fosforilación de Tau.

Este trabajo ha supuesto una aportación al grupo de investigación, en el establecimiento y la caracterización de un modelo celular que reproduce algunos caracteres moleculares de la enfermedad de Alzheimer. Este modelo de toxicidad por ácido okadaico servirá en estudios posteriores para el screening inicial de compuestos con potencial terapéutico en la enfermedad de Alzheimer.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guthrie CR, Kraemer BC. Proteasome Inhibition Drives HDAC6-Dependent Recruitment of Tau to Aggresomes. *J Mol Neurosci*. 2011;45(1):32–41.
2. Kamat PK, Rai S, Nath C. Okadaic acid induced neurotoxicity: An emerging tool to study Alzheimer's disease pathology *Neurotoxicology* 2013;37:163–172.
3. Tian Q, Lin ZQ, Wang XC, Chen J, Wang Q, Gong CX, Wang JZ. Injection of okadaic acid into the meynert nucleus basalis of rat brain induces decreased acetylcholine level and spatial memory deficit. *Neuroscience* 2004;126:277–284.
4. Kamat PK, Tota S, Shukla R, Ali S, Najmi AK, Nath C. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain. *FEBS Lett*. 2011;100(2):311–319.
5. Ren QG, Liao XM, Chen XQ, Liu GP, Wang JZ. Effects of tau phosphorylation on proteasome activity. *FEBS Lett*. 2007;581:1521–1528.

Recibido: 17 marzo 2014.

Aceptado: 26 abril 2014.