



Universitat Autònoma de Barcelona

**Contribució de l'Amino Oxidasa Sensible a
Semicarbazida en el dany vascular: implicació en la
malaltia d'Alzheimer i l'Angiopatia Cerebral Amiloide**

**Mar Hernández Guillamón
Bellaterra, Setembre 2005**



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica de Medicina

**Contribució de l'Amino Oxidasa Sensible a
Semicarbazida en el dany vascular: implicació en la
malaltia d'Alzheimer i l'Angiopatia Cerebral Amiloide**

Mar Hernández Guillamón

Memòria presentada per optar al grau de Doctora en Bioquímica.

Bellaterra, Setembre 2005.



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Unitat de Bioquímica de Medicina

Mercedes Unzeta López, Professora titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral **“Contribució de l’Amino Oxidasa Sensible a Semicarbazida en el dany vascular: implicació en la malaltia d’Alzheimer i l’Angiopatia Cerebral Amiloide”**, que presenta Mar Hernández Guillamón per optar al grau de Doctora ha estat realitzada sota la seva direcció al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona i es troba en condicions de ser llegida i defensada davant el Tribunal corresponent.

Bellaterra, 12 de Setembre del 2005.

Dra. Mercedes Unzeta López

AGRAÏMENTS

Em sembla increïble està escrivint, per fi, aquest apartat de la Tesi. Durant tots aquests anys, he pensat tant en aquest moment... El moment d'acabar una etapa de la meua vida, però especialment, el moment d'agrair-vos haver estat al meu costat tot aquest temps.

En primer lloc vull agrair a la Dra. Mercè Unzeta haver-me donat la oportunitat de realitzar aquesta Tesi Doctoral en el seu laboratori i haver confiat en mi per portar a terme aquest projecte. Li vull donar les gràcies pel seu optimisme, la seva vitalitat i intentar encomanar-nos sempre el seu entusiasme per la ciència.

També vull agrair a tot el grup de les Unzeta's, que des del principi m'han recolzat i ajudat en tot. A l'Esther i la Lydia, que em van ensenyar a treballar al laboratori, i sobretot, em van ensenyar a no rendir-me. A la Eli, gràcies per estar sempre al meu costat i ensenyar-me que les coses poden ser més senzilles. El dia a dia és molt millor a prop teu! I a la Montse, sense la qual no hagués pogut acabar mai aquesta Tesi. Ha estat un plaer compartir el mundillo SSAO amb tu. Us estic molt agraïda per la paciència que heu tingut amb mi, i sobretot en aquests últims mesos, en els que la vostra opinió i els vostres consells han fet possible que tot això tirés endavant. No em puc imaginar aquesta Tesi sense totes vosaltres!

Vull agrair molt especialment a aquesta gran família, que formem la gent del departament, l'ajuda incondicional que m'heu donat durant tots aquests anys. Gràcies pels vostres consells, el vostre interès i la vostra companyia.

A l'Alberto, que tot i separar-nos grans oceans, sempre m'has fet sentir que podia comptar amb tu. Gràcies per escoltar-me, entendre'm i ensenyar-me a mirar les coses des de l'altra banda. A la Imane, amb la que he compartit tantes penes i alegries. Gràcies per la teua confiança, els teus consells i la teua manera de riure. Al Xavito, per ser el meu mestre i el meu referent científic, per tots els cafès i tots els piropos que alegren la vida. A l'Álex, la Sandra, l'Alfredo, la Noe i la Cris, amb els que sento que vaig començar aquesta aventura i dels que he après tantes coses. I a tots aquells que han passat pel departament, el Williams, la Belén, la Maria (i el Simonet)... i els que encara us hi quedeu, la Bruna, la Vidi, el Nahuai, l'Anna, l'Albert, el Barneda i la Rut... Gràcies a tots per compartir els moments durillos que hem passat, però gràcies també, per tots els cafès, sopars i bailoteos.

Aquesta Tesi no hagués estat possible sense l'ajuda de moltes persones que han confiat en aquest projecte. Voldria agrair a la Dra. Mercè Boada, la Dra. Isabel Hernández, l'Óscar i la Fundació ACE, el subministrament de mostres de plasmes de pacients d'Alzheimer. Al Dr.

Isidre Ferrer, i l'ajuda de tot el seu laboratori, per la realització de les immunohistoquímiques de mostres humanes. Al Dr. José Lizcano, per les seves idees i opinions científiques. A l'Oriol de ciències, per la seva ajuda i el seu entusiasme en la realització dels cultius primaris d'HASMC. Al Salva, per ensenyar-me el funcionament del microscopi, per la seva paciència i el seu bon humor. A la Cris, per donar-me sempre un cop de mà en les meves aventures a cultius. També voldria agrair molt especialment al Melchor i a l'Óscar, per fer que les coses al departament siguin molt més fàcils, i sobretot, més divertides.

I would like to thank Professor K.F. Tipton and his lab, Jeff, Martha and Gavin, to introduce me to the amino oxidase world during my stage in Dublin. Thank you for giving us so many valuable advices and scientific opinions during all this period. I also would like to thank Professor W.E. Van Nostrand for giving me the opportunity to spend a great time in his lab in New York. Thanks, Bill & Judianne, for showing me another world but making me feel at home. I thank Galina and everybody who worked in that lab for their unconditional help in and out of it. And thanks to Johnny, for those unforgettable days in Long Island.

També vull agrair a tots aquells que heu viscut aquesta Tesi amb mi des de fora del laboratori. Gràcies per la vostra companyia, el vostre suport i les mil birres compartides. Gràcies a tots; a la Clàudia i la Laia, a l'Uri, al David i la Rosa, a la Merx i la Evita, a l'Esther, a la Barbrins i el Miqui, a l'Euge i el Kiko, a les nenes de químiques, als de Torrelles, als Nueva i a tots aquells a qui algun dia us he atabalat amb els meus experiments. I gràcies a tu, Nini, per cuidar-me tant i fer-me riure cada matí durant aquests últims mesos. També vull agrair molt especialment a l'Uriolo, qui m'ha ajudat fins l'últim moment en el disseny de les fotos i la portada.

A l'Artur i la Sònia... Gràcies per escoltar-me i donar-me la força i l'alegria per tirar endavant. Gràcies per suportar l'insuportable i entendre l'incomprensible.

Vull agrair als meus pares i a la meva família, a qui dedico aquesta Tesi, la seva confiança i infinita paciència.

Barcelona, 23 Setembre del 2005

ÍNDEX

ABREVIATURES.....	i
INTRODUCCIÓ.....	1
I. AMINO OXIDASA SENSIBLE A SEMICARBAZIDA	
1. Amino Oxidases.....	3
1.1. Classificació enzimàtica	3
1.2. Amino oxidases [EC 1.4.3.6.] de diferents espècies.....	5
2. Activitat catalítica SSAO.....	7
2.1. Especificitat de substrat.....	7
2.2. Inhibidors de la SSAO.....	8
3. SSAO lligada a membrana.....	9
3.1. Estructura.....	9
3.2. Localització.....	11
3.3. Funcions fisiològiques.....	12
3.3.1. SSAO i el metabolisme de la glucosa.....	13
3.3.2. Regulació de la diferenciació i el creixement cel·lular.....	15
3.3.3. SSAO/ VAP-1: amino oxidasa amb funció d'adhesió immunològica.....	17
3.3.4. Altres possibles funcions.....	20
4. Sobreexpressió de VAP-1/SSAO en models experimentals d'animals transgènics	20
5. SSAO plasmàtica.....	22
5.1. Origen de la SSAO plasmàtica.....	23
5.2. SSAO plasmàtica en situacions patològiques.....	25
5.3. Possibles funcions de la SSAO plasmàtica.....	26
5.4. Moduladors de la SSAO plasmàtica.....	27
6. SSAO i el catabolisme d'amines biògenes com a responsable del dany vascular	28
6.1. Productes generats per l'oxidació d'amines alifàtiques.....	28
6.2. El metabolisme de la SSAO com a possible font de dany vascular.....	30
II. MORT CEL·LULAR	
1. Mecanismes de mort cel·lular.....	34
2. Mort cel·lular programada: Apoptosi.....	34
2.1. Característiques de l'apoptosi.....	35
2.2. Caspases: executores principals de la mort apoptòtica.....	35

2.3.	Principals vies apoptòtiques.....	37
2.3.1.	Via extrínseca.....	37
2.3.2.	Via intrínseca.....	38
2.4.	Proteïnes reguladores de l'apoptosi.....	39
2.4.1.	Família Bcl-2.....	39
2.4.2.	Altres proteïnes reguladores de l'apoptosi.....	40
3.	Apoptosi en cèl·lules de múscul llis vascular	41
III.	LA MALALTIA D'ALZHEIMER	44
1.	Característiques principals de la malaltia d'Alzheimer	44
2.	Desordres vasculars associats a la malaltia d'AD	46
3.	Angiopatia Cerebral β-Amloide	49
3.1.	Característiques principals de CAA.....	49
3.2.	Mutacions i factors de risc genètic implicats en CAA.....	50
3.3.	Models <i>in vitro</i> de CAA.....	52
3.4.	Models animals de CAA.....	53
OBJECTIUS	57
MATERIALS I MÈTODES	63
1.	CULTIUS CEL·LULARS	65
1.1.	Tipus cel·lulars	65
1.1.1.	Línia cel·lular A7r5.....	65
1.1.2.	HASMC: Cèl·lules de musculatura llisa d'aorta humana.....	65
1.1.2.1.	Protocol d'obtenció del cultiu d'HASMC.....	66
1.1.3.	HLSCM: Cèl·lules vasculars humanes de musculatura llisa procedents de vasos leptomeningis.....	66
1.1.3.1.	Protocol d'obtenció del cultiu d'HLSCM.....	67
1.1.4.	Caracterització dels cultius primaris.....	67
1.2.	Manteniment del cultiu	68
1.3.	Subcultiu	68
1.3.1.	Contatge cel·lular.....	68
1.4.	Emmagatzematge de cèl·lules	69
1.4.1.	Congelació.....	69
1.4.2.	Descongelació.....	70
1.5.	Tractaments de les cèl·lules	71
1.5.1.	Tractaments amb Sèrum Boví (BS)/ substrats de la SSAO/ inhibidors de la SSAO.....	71

1.5.2.	Tractaments amb peròxid d'hidrogen/ formaldehid/ amoni.....	72
1.5.3.	Tractaments amb beta-amiloide (βA_{1-40} HCHWA-D).....	72
2.	PREPARACIÓ I OBTENCIÓ DE MOSTRES	73
2.1.	Preparació de microsomes	73
2.1.1.	Microsomes de pulmó boví.....	73
2.1.2.	Microsomes de pulmó humà.....	74
2.2.	Meninges i microvasos cerebrals humans	74
2.2.1.	Preparació de meninges cerebrals.....	75
2.2.2.	Preparació de microvasos cerebrals.....	75
2.2.2.1.	Preparació mitjançant centrifugació en gradient de sacarosa.....	75
2.2.2.2.	Preparació mitjançant filtració diferencial a través de malles de nylon.....	76
2.2.2.3.	Caracterització de la fracció de microvasos amb marcadors enzimàtics.....	77
2.2.2.3.1.	Assaig de l'activitat γ -Glutamil Transpeptidasa.....	77
2.2.2.3.2.	Assaig de la Fosfatasa Alcalina.....	78
2.3.	Plasma Humà	79
2.4.	Preparació de l·lisats cel·lulars	79
2.4.1.	LLisats cel·lulars per a la determinació de l'activitat SSAO.....	79
2.4.2.	LLisats cel·lulars per a Western-Blot.....	79
2.4.2.1.	Fraccionament subcel·lular per a la separació de la fracció mitocondrial i la citosòlica.....	80
3.	MÈTODES GENERALS	81
3.1.	Viabilitat Cel·lular	81
3.1.1.	Mètode de reducció de l'MTT.....	81
3.1.2.	LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity.....	81
3.2.	Determinació de proteïna pel mètode de Bradford	82
3.3.	Mètode de detecció de l'activitat SSAO	82
3.3.1.	Mètode radiomètric.....	82
3.3.1.1.	Procediment general.....	83
3.3.1.2.	Tractament amb inhibidors específics.....	84
3.3.1.3.	Assajos d'inhibició.....	84
3.3.1.4.	Càlcul de l'activitat enzimàtica.....	85
3.3.2.	Mètode espectrofotomètric.....	85
3.3.2.1.	Procediment general.....	86
3.3.2.2.	Càlcul de l'activitat enzimàtica.....	86
3.4.	Electroforesi	86
3.4.1.	Tinció de Commassie.....	87

3.5. Tècnica de Western-blot	87
3.5.1. Transferència de proteïnes a membrana de nitrocel·lulosa.....	87
3.5.2. Procediment general.....	87
3.5.3. <i>Stripping</i> de membranes.....	88
3.5.4. Anticossos utilitzats.....	88
3.6. Immunocitoquímica	89
3.6.1. Tinció de Hoetchst 33258.....	89
3.6.2. Procediment general per la immunocitoquímica i tinció de Hoechst 33258....	89
3.6.3. Anticossos utilitzats.....	91
3.7. Immunohistoquímica	91
3.7.1. Procediment general per a mostres parafinades.....	91
3.7.1.1. Anticossos utilitzats.....	92
3.7.2. Procediment general per a mostres congelades i fixades amb acetona	92
3.7.2.1. Anticossos utilitzats.....	93
4. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE LA LÍNIA CEL·LULAR A7r5	93
4.1. Plasmidis utilitzats	93
4.2. Amplificació de plasmidis	94
4.2.1. <i>E. Coli</i> : soca, medis i sistemes de cultiu.....	94
4.2.2. Transformació.....	94
4.2.3. Creixement i selecció de colònies.....	94
4.2.4. Extracció i purificació del material genètic.....	95
4.2.5. Quantificació de la concentració de DNA.....	95
4.3. Protocol de transfecció amb Fugene6	95
5. OBTENCIÓ DE LÍNIES ESTABLES VAP-1/SSAO EN CÈL·LULES A7r5	96
5.1. Construcció del vector recombinant	96
5.1.1. Digestió.....	96
5.1.2. Separació del material genètic per electroforesi en gels d'agarosa.....	96
5.1.3. Purificació de les bandes de DNA.....	97
5.1.4. Lligació.....	97
5.1.5. Amplificació i comprovació del vector obtingut.....	97
5.2. Procediment general per a l'obtenció de línies estables VAP-1/SSAO en cèl·lules A7r5	97
5.3. Caracterització i amplificació de les línies estables	98
6. EXPERIEMENTS D'ACTIVACIÓ DE LA SSAO	99
6.1. Activació per plasma humà	99
6.2. Component activador del plasma humà	99

6.3. Activació per Lisofosfatidilclina.....	99
6.4. Activació per un component del medi DMEM.....	100
7. PURIFICACIÓ D'ANTICÒS ANTI-SSAO AMB COLUMNA DE PROTEÏNA A.....	100
7.1. Utilització de la columna de proteïna A.....	100
7.2. Comprovació de l'eficiència i puresa dels anticossos obtinguts.....	101
8. TRACTAMENT DE DADES.....	101
RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	103
RESULTATS CAPÍTOL 1.....	105
1. LA SSAO EN EL SISTEMA CEREBROVASCULAR HUMÀ EN CONDICIONS FISIOLÒGIQUES I EN MALALTS D'ALZHEIMER AMB ANGIOPATIA CEREBRAL AMILOIDE.....	107
1.1. Caracterització bioquímica de microvasos d'origen humà en condicions fisiològiques.....	107
1.1.1. Determinació de la puresa dels microvasos cerebrals mitjançant l'ús de marcadors enzimàtics.....	108
1.1.2. Comparació dels dos mètodes de preparació de microvasos.....	108
1.2. Caracterització de la SSAO en microvasos i vasos leptomeningis de malalts d'Alzheimer amb Angiopatia Cerebral Amiloide.....	110
1.2.1. Constants cinètiques de la SSAO procedent de preparacions de microvasos i meninges de mostres control i pacients d'AD amb CAA.....	110
1.2.2. Anàlisi de l'expressió SSAO en preparacions de meninges i microvasos cerebrals de mostres control i pacients d'AD amb CAA.....	112
1.2.3. Anàlisi immunohistoquímic de l'expressió SSAO de mostres control i pacients d'AD amb CAA.....	113
DISCUSSIÓ CAPÍTOL 1.....	115
RESULTATS CAPÍTOL 2.....	121
2. LA SSAO SOLUBLE PRESENT EN PLASMA HUMÀ EN LA MALALTIA D'ALZHEIMER.....	123
2.1. Relació entre l'activitat SSAO plasmàtica i la severitat de la malaltia d'AD.....	124
2.2. Relació entre l'edat, l'activitat SSAO plasmàtica i la severitat de la malaltia d'AD.....	125
2.3. Relació entre els nivells de A β (40-42), activitat SSAO plasmàtica i severitat de la malaltia d'AD.....	126
DISCUSSIÓ CAPÍTOL 2.....	127

RESULTATS CAPÍTOL 3	131
3. L'ACCIÓ CATALÍTICA DE LA SSAO SOLUBLE INDUEIX CITOTOXICITAT EN CÈL·LULES DE MUSCULATURA LLISA EN CULTIU	133
3.1. Efecte de la SSAO soluble en cèl·lules A7r5.....	133
3.1.1. Característiques de la línia cel·lular A7r5.....	133
3.1.2. L'oxidació de la metilamina per la SSAO indueix citotoxicitat en cèl·lules A7r5.....	134
3.1.3. Efecte de l'oxidació de la benzilamina i la tiramina per la SSAO soluble en cèl·lules A7r5.....	137
3.1.4. L'oxidació de la MA per SSAO indueix apoptosi en cèl·lules A7r5.....	138
3.2. Efecte dels productes catalítics de la SSAO (H ₂ O ₂ , formaldehid i amoni) en cèl·lules A7r5	141
3.3. Efecte de la SSAO soluble en cèl·lules HASMC.....	144
3.3.1. Caracterització del cultiu primari d'HASMC.....	145
3.3.2. L'oxidació de la MA per la SSAO indueix citotoxicitat en cèl·lules HASMC.....	146
DISCUSSIÓ CAPÍTOL 3	148
RESULTATS CAPÍTOL 4	155
4. L'ACCIÓ CATALÍTICA DE LA SSAO LLIGADA A MEMBRANA INDUEIX CITOTOXICITAT EN CÈL·LULES DE MUSCULATURA LLISA EN CULTIU	157
4.1. Estandardització de la transfecció transitòria de la línia cel·lular A7r5.....	157
4.1.1. Transfecció transitòria de GFP.....	157
4.1.2. Transfecció transitòria de VAP-1/SSAO.....	158
4.2. Efecte de l'oxidació de la MA en cèl·lules A7r5 transfectades transitòriament amb VAP-1/SSAO	160
4.3. Obtenció de línies estables VAP-1/SSAO en cèl·lules A7r5.....	161
4.3.1. Caracterització de les línies cel·lulars estables VAP-1/SSAO.....	164
4.4. Efecte de l'oxidació de la MA en línies cel·lulars estables VAP-1/SSAO	167
DISCUSSIÓ CAPÍTOL 4	169
RESULTATS CAPÍTOL 5	173
5. ESTUDI DE LA POSSIBLE IMPLICACIÓ DE LA SSAO EN MODELS <i>IN VITRO</i> I <i>IN VIVO</i> D'ANGIOPATIA CEREBRAL AMILOIDE	175
5.1. Possible contribució de la SSAO en la citotoxicitat per β -Amiloide en cèl·lules de musculatura llisa procedents de vasos leptomeníngis humans.....	176
5.1.1. Caracterització del cultiu primari HLSCMC.....	176
5.1.1.1. Assaig immunocitoquímic amb l'anticòs α -actina de musculatura llisa i tinció de nuclis per Hoechst 33258.....	177
5.1.1.2. Comprovació per mètodes immunocitoquímics de la puresa del cultiu d'HLSCMC.....	177

5.1.1.3.	Estudi de la SSAO en el cultiu primari d'HLSMC.....	180
5.1.2.	Estudi de la SSAO en el model de citotoxicitat per D β -A _{1→40} en HLSMC.....	181
5.2.	Possible contribució de la SSAO en la citotoxicitat per β -Amiloide en cèl·lules A7r5..	184
5.2.1.	Citotoxicitat per D β -A _{1→40} en cèl·lules A7r5.....	185
5.2.2.	Estudi de l'efecte de la sobreexpressió de la SSAO/VAP-1 en el procés de mort cel·lular per D β -A _{1→40} en A7r5	186
5.2.2.1.	Sobreexpressió de VAP-1/SSAO per transfecció transitòria	186
5.2.2.2.	Sobreexpressió de VAP-1/SSAO per transfecció estable.....	187
5.3.	Estudi de la SSAO en ratolins transgènics Tg-SwDI.....	188
5.3.1.	Característiques dels ratolins Tg-SwDI.....	188
5.3.2.	Estudi de la SSAO en ratolins Tg-SwDI.....	189
DISCUSSIÓ CAPÍTOL 5	192
RESULTATS CAPÍTOL 6	199
6. ESTUDI DE LA REGULACIÓ DE L'ACTIVITAT SSAO	201
6.1.	Regulació de la SSAO per un component del plasma humà.....	201
6.1.1.	Activació de la SSAO soluble i lligada a membrana per un component del plasma humà.....	202
6.1.2.	Activació de la SSAO lligada a membrana del sistema cerebrovascular humà per un component del plasma humà.....	203
6.2.	Regulació de la SSAO per lisofosfatidilcolina.....	205
6.2.1.	Activació de la SSAO lligada a membrana del sistema cerebrovascular humà per LPC.....	205
6.3.	Regulació de la SSAO soluble per un component del medi de cultiu (DMEM).....	206
6.3.1.	Modulació de la SSAO plasmàtica humana per glucosa i àcid pirúvic.....	210
6.3.2.	Modulació de la SSAO plasmàtica humana per bicarbonat.....	211
DISCUSSIÓ CAPÍTOL 6	214
DISCUSSIÓ GENERAL	219
CONCLUSIONS	229
BIBLIOGRAFIA	235
ANNEX I: PURIFICACIÓ D'ANTICOSSOS POLICLONALS ANTI-SSAO	263
1.	Protocol de purificació d'anticossos anti-SSAO.....	265
2.	Comprovació de l'eficiència i puresa dels anticossos obtinguts.....	266

ANNEX II: PUBLICACIONS RELACIONADES AMB EL PROJECTE DE TESI

1. Ferrer I, Lizcano JM, **Hernandez M**, Unzeta M. Overexpression of semicarbazide sensitive amine oxidase in the cerebral blood vessels in patients with Alzheimer's disease and cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Neurosci Lett*. 2002 Mar 15;321(1-2):21-4 269
2. Dalfo E, **Hernandez M**, Lizcano JM, Tipton KF, Unzeta M. Activation of human lung semicarbazide sensitive amine oxidase by a low molecular weight component present in human plasma. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jul 30;1638(3):278-86..... 275
3. **del Mar Hernandez M**, Esteban M, Szabo P, Boada M, Unzeta M. Human plasma semicarbazide sensitive amine oxidase (SSAO), beta-amyloid protein and aging. *Neurosci Lett*. 2005 Aug 12-19;384(1-2):183-7..... 287
4. **Hernandez M**, Solé M, Boada M, Unzeta M. Soluble Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase (SSAO) catalysis induces apoptosis on vascular smooth muscle cells. Manuscript sotmès a revisió editorial..... 295

ANNEX III: ALTRES PUBLICACIONS

1. O'Sullivan J, O'Sullivan M, Tipton KF, Unzeta M, **Del Mar Hernandez M**, Davey GP. The inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase by aminohexoses. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Apr 11;1647(1-2):367-71..... 323
2. Gallardo-Godoy A, **Hernandez M**, Sanz E, Unzeta M. Synthesis of 4-methyl-thio-phenyl-propylamine and the evaluation of its interaction with different amine oxidases. *Bioorg Med Chem*. 2004 Jan 2;12(1):273-9..... 331

ABREVIATURES

ABREVIATURES

A:	Adrenalina
AD:	<i>Alzheimer's disease</i> : Malaltia d'Alzheimer
AGE:	<i>Advanced Glycation End products</i>
AIF:	<i>Mitochondrial intermembrane Apoptosis-Inducing Factor</i>
AMPc:	Adenosin monofosfat cíclic
AO:	Amino oxidasa
Apaf-1:	<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>
ApoE:	Apoproteïna E
APP:	<i>Amyloid Precursor Protein</i> : Proteïna precursora de l'amiloide
ATP:	Adenosina 5'-trifosfat
BACE:	<i>β-site APP-Cleaving Enzyme</i>
Bak:	<i>Bcl-2 homologous Antagonist Killer</i>
Bax:	<i>Bcl-2 Associated X protein</i>
Bcl-2:	<i>B Cell leukemia/Lymphoma-2</i>
Bcl-X _L :	<i>Bcl-2 homologous splice variant from the same gene</i>
BS:	Sèrum Boví
BSA:	Albúmina sèrica bovina
BSAO:	<i>Bovine Serum Amino Oxidase</i>
Bz:	Benzilamina
c.c.l.p.h.	Component concentrat i liofilitzat de plasma humà
Ca ⁺² :	Calci
CAA:	<i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i> : Angipoatia cerebral amiloide
Caspasa:	<i>Cysteine-aspartate-proteases</i>
cDNA:	DNA complementari
Cit c:	Citocrom c
DA:	Dopamina
DAO:	Diamino oxidasa
Dep:	L-Deprenil
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle Media</i>
DMSO:	Dimetilsulfòxid

DNA:	Àcid desoxiribonucleic
D β -A:	Mutant <i>Duch</i> del pèptid β -amiloide
EDTA:	Àcid etilendiaminotetracètic
FAD:	Dinucleòtid de flavina adenina
FCS:	<i>Fetal Calf Serum</i>
GDS	<i>Global Deterioration Scale</i>
GFAP:	Proteïna àcida gliofibril·lar
GFP:	<i>Green Fluorescent Protein</i>
H ₂ O ₂ :	Peròxid d'hidrogen
HASMC:	<i>Human Aortic Smooth Muscle Cells</i>
HBP:	<i>Human Brain Perycites</i>
HBSS:	<i>Hanks' Balance Salt Solution</i>
HCHWA-D:	<i>Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis- Dutch type</i>
HLSMC:	<i>Human Leptomeningeal Smooth Muscle Cells</i>
IAP:	<i>Inhibitor Apoptosis Protein</i>
IFN- γ :	Interferó gamma
IL-1:	Interleucina-1b
LDL:	Lipoproteïnes de baixa densitat
LO:	Lisil oxidasa
LPC:	Lisofosfatidilcolina
LPS:	Lipopolisacàrid
LRP:	<i>Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
LTQ:	Lisil-tirosil quinona
MA:	Metilamina
MAC:	<i>Mitochondrial Apoptosis-induced Channel</i>
MAO:	Monoamino oxidasa
MDL 72145:	(<i>E</i>)-2-(3',4'-dimetoxifenil)-3-fluoroalilamina
MDL 72974A:	(<i>E</i>)-2-(4-fluorofenetil)-3-fluoroalilamina
MMP:	Metal·loproteasa de matriu
mRNA:	RNA missatger
MTT:	Metil-tiazol-tetrazoli
NA:	Noradrelanila
NINCDS-ADRA:	<i>National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke –Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i>

NaHCO ₃ :	Hidrogen carbonat sòdic; bicarbonat sòdic
NO:	Òxid nítric
PAO:	Poli-amino oxidasa
PARP:	<i>Poly (ADP-ribose) polimerase</i>
PBS:	Tampó fosfat salí
PMN:	<i>Polymorphonuclear leukocytes</i>
PMSF:	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PS:	Presenilina
PS1:	Presenilina 1
PS2:	Presenilina 2
PTP:	<i>Permeability Transient Porus</i>
RAGE:	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i>
RAO:	Amino oxidasa de retina
RE:	Reticle endoplasmàtic
RNA:	Àcid ribonucleic
ROS:	<i>Reactive Oxygen Species</i> : Espècies reactives d'oxigen
SC:	Semicarbazida
SDS:	Dodecil sulfat sòdic
SMC:	<i>Smooth Muscle Cells</i> : Cèl·lules de múscul llis
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis</i>
Smac/DIABLO:	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct IAP-binding protein with low pI</i>
SSAO:	<i>Semicarbazide Sensitive Amino oxidase</i> : Amino Oxidasa Sensible a Semicarbazida
SZT:	Estreptozotocina
TAE:	Tampó acetat per electroforesi
TB:	Tampó de Tris
TBS:	Tampó salí de Tris
TTBS:	Tampó salí de Tris amb detergent Tween
Tg:	Transgènic
TNF:	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNF-R :	<i>Tumor Necrosis Factor-Receptor</i>
TPQ:	Topaquinona
TPK:	Tampó fosfat de potassi

Abreviatures

Tris:	Tris(hidroximetil)aminometona
Trypt:	Triptamina
Tyr:	Tiramina
VAP-1:	<i>Vascular adhesion Protein-1</i>
VD:	Demència vascular
VSMC:	<i>Vascular Smooth Mmuscle Cells</i>
UV:	Ultraviolat
UPR:	<i>Unfolded Protein Response</i>
β A:	β -amiloide
β -PEA:	β -feniletilamina

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

I. AMINO OXIDASA SENSIBLE A SEMICARBAZIDA (SSAO)

1. Amino Oxidases

1.1. Classificació enzimàtica

Les amino oxidases (AOs) dels teixits de mamífers són una família enzimàtica molt heterogènia que catalitzen la desaminació oxidativa de monoamines, diamines i poliamines, ja siguin xenobiòtics, com substàncies de producció endògena o absorbides directament de la dieta.

Les amino oxidases s'han dividit tradicionalment en dos grups (Fig. 1): per una banda, trobem els enzims que contenen FAD (dinucleòtid de flavina adenina), les monoamino oxidases (MAO-A i MAO-B) [EC 1.4.3.4.], i les poliamino oxidases [EC 1.5.3.3.], que són enzims intracel·lulars. En segon lloc, l'altre grup de AOs són enzims que contenen coure [EC 1.4.3.6.] i que com a cofactor presenten un o més grups carbonil (Lyles, 1996). En aquest grup d'enzims, s'inclourien la lisil oxidasa (LO), la diamino oxidasa (DAO), i l'amino oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO), la qual està present en dues formes; la unida a membrana i la forma soluble present en plasma. Tot aquest darrer grup d'enzims tenen la característica comú de ser inhibits per la semicarbazida.

Els dos grans grups d'AOs no tan sols difereixen en el cofactor, sinó que presenten diferències en quant a la distribució cel·lular, la seva especificitat envers determinats substrats i inhibidors, i la seva funció fisiològica. La MAO-A i B són enzims localitzats a la membrana externa mitocondrial i oxiden tant amines primàries com secundàries i terciàries. Principalment, metabolitzen substàncies neuro i vasoactives com la serotonina, noradrenalina, dopamina i triptamina. La importància fisiològica d'aquests enzims està relacionada amb el metabolisme d'amines biògenes endògenes, algunes d'elles amb funció neurotransmissora, i amines exògenes, ja siguin procedents de la dieta o xenobiòtics (Shih *et al.*, 1999). Les poliamino oxidases metabolitzen

preferentment espermina, esperimidina i els seus derivats N-acetil. Sembla que es localitzen principalment en mitocondris i peroxisomes, i se les relaciona amb la funció de regulació del creixement cel·lular (Seiler, 1990).

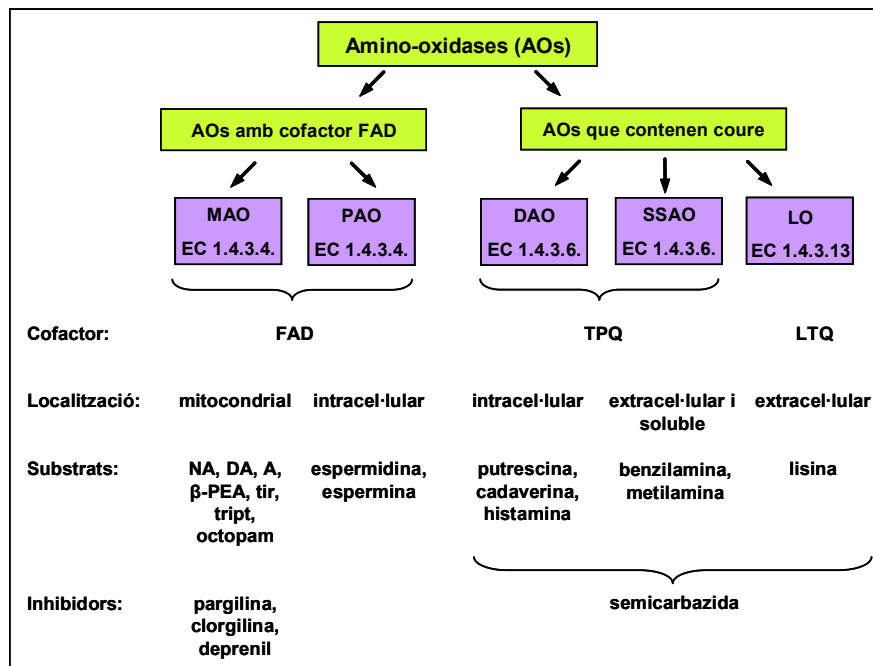


Figura 1. Classificació de les AOs. FAD, dinucleòtid de flavina i adenina; TPQ, topaquinona; LTQ, lisil-tirosil quinona; NA, noradrelanila; DA, dopamina; A, adrenalina; β-PEA, β-feniletilamina; tir, tiramina; tript, triptamina. Adaptació de Jalakanen i Salmi, 2001.

En quant a les AOs que contenen coure, tant les SSAOs com les DAOs contenen com a cofactor la topaquinona (Janes *et al.*, 1990), mentre que la LO conté una lisil tirosilquinona com a cofactor (Wang *et al.*, 1997). De fet, la LO difereix molt de la resta de AOs del seu grup ja que és una proteïna extracel·lular monomèrica i de baix pes molecular (32 kDa). La LO participa en l'encreuament de proteïnes de la matriu del teixit connectiu, com el col·lagen i l'elastina (Kagan *et al.*, 1995). Les DAOs són enzims intracel·lulars que catalitzen la desaminació oxidativa de les diamines putrescina i cadaverina (Buffoni, 1966) i són sintetitzats principalment al ronyó i a l'intestí (Schwelberger *et al.*, 1998). Existeix una forma secretada que s'uneix a les cèl·lules endotelials de manera dependent d'heparina (Bielb *et al.*, 2002). S'ha relacionat aquest enzim amb la regulació de reaccions al·lèrgiques i inflamatòries, ja que també metabolitza la histamina, i en processos de control de proliferació cel·lular (Quash *et al.*,

1979). De fet, s'ha descrit que és proteïna quelant d'amiloride de ronyó humà amb activitat diamino oxidasa sensible a semicarbazida (Novotny *et al.*, 1994).

1.2. Amino oxidases [EC 1.4.3.6.] de diferents espècies

S'han identificat i clonat amino oxidases que contenen coure, presenten el cofactor topaquinona i són sensibles a semicarbazida en bacteris, llevats, plantes i mamífers (taula 1).

Actualment ja es disposa de la seqüència completa de cDNA de la SSAO de diferents mamífers, però concretament, la SSAO humana va ser clonada per dos grups independents donant lloc a noms diferents; l'amino oxidasa de placenta humana (Zhang i McIntire, 1996) i la proteïna d'adhesió vascular (VAP-1) (Smith *et al.*, 1998). El fet que les dues seqüències fossin idèntiques va revelar que es tractava de la mateixa proteïna; per una banda, una proteïna amb funció d'adhesió immunològica, i per altra banda, un enzim amb activitat amino oxidasa. Més endavant, es va clonar una SSAO específica de retina (anomenada RAO) (Imamura *et al.*, 1997), la qual mostrava diferents variants d'*splicing* (Imamura *et al.*, 1998), així com un aparent pseudogen de la SSAO (Cronin *et al.*, 1998). Aquestes tres SSAOs s'han identificat en la seqüència del genoma humà i totes elles es troben al braç llarg del cromosoma 17. Els homòlegs a la SSAO humana de rata (Moldes *et al.*, 1999, Ochiai *et al.*, 2005) i ratolí (Morris *et al.*, 1997; Bono *et al.*, 1998) també han estat clonats. En quant a les proteïnes d'aquesta família d'origen boví, la BSAO (forma soluble de sèrum boví) va ser la primera SSAO que es va clonar (Mu *et al.*, 1992). Més endavant, evidències genètiques van suggerir que podien existir almenys tres enzims diferents de teixit boví (Høgdall *et al.*, 1998).

La proteïna humana (hVAP-1) presenta un elevat grau d'homologia amb la proteïna de ratolí (mVAP-1) (83% d'homologia), de rata (rVAP-1) (80%), la forma soluble bovina (BSAO) (80%) i la forma humana de retina (hRAO) (64%). Les proteïnes diamino oxidases presenten un grau d'homologia del 49% tant per la forma humana (hDAO), com la de ratolí (mDAO) o de rata (rDAO). Més allunyades filogenèticament, i amb un grau d'homologia de l'ordre del 15 %, es troben les amino oxidases que contenen coure de llevat (HPAO), fong (ANAO), bacteris (ARAO, ECAO, KPAO) i plantes (LSAO, PSAO,

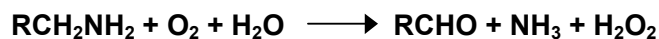
ATAO). Aquest darrer grup d'amino oxidases no s'han classificat com DAO o SSAO, sinó que se les anomena amino oxidases que contenen coure.

Llevat	HPAO	<i>"Hansenula polymorpha copper-containing amine oxidase"</i>	Bruinenberg <i>et al.</i> , 1989
Fong	ANAO	<i>"Aspergillus niger copper-containing amine oxidase"</i>	Frebort <i>et al.</i> , 1996
Bacteris	ARAO	<i>"Arthrobacter sp, strain P1, copper-containing amine oxidase"</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1993
	ECAO	<i>"Escherichia coli copper amine oxidase"</i>	Parsons <i>et al.</i> , 1995 Roh <i>et al.</i> , 1994
	KPAO	<i>"Klebsiella aerogenes copper amine oxidase"</i>	Sugino <i>et al.</i> , 1992
Plantes	LSAO	<i>"lentil seeding copper-containing amine oxidase"</i>	Rossi <i>et al.</i> , 1992
	PSAO	<i>"pea seeding amine oxidase"</i>	Tipping i Mc Pherson, 1995
	ATAO	<i>"Arabidopsis thaliana copper amine oxidase"</i>	Moller i McPherson, 1995
Mamífers			
Humans	hVAP-1 = hpAO (AOC3)	<i>"human vascular adhesion protein oxidase 1"</i> <i>"human placenta copper containing amine oxidase"</i>	Smith <i>et al.</i> , 1998 Zhang <i>et al.</i> , 1996
	hRAO (AOC2)	<i>"human retina-specific amine oxidase"</i>	Imamura <i>et al.</i> , 1997
	hDAO (AOC1)	<i>"human diamine oxidase"</i> = <i>"human amiloride binding protein"</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1995
Ratolí	mVAP-1	<i>"mouse vascular adhesion protein oxidase 1"</i>	Morris <i>et al.</i> , 1997 Bono <i>et al.</i> , 1998
	mDAO	<i>"mouse diamine oxidase"</i>	Strausberg <i>et al.</i> , 2002
Rat	rVAP-1	<i>"rat vascular adhesion protein oxidase 1" = "rat semicarbazide sensitive amine oxidase"</i>	Moldes <i>et al.</i> , 1999 Ochiai <i>et al.</i> , 2005
	rDAO	<i>"rat diamine oxidase"</i>	Lingueglia <i>et al.</i> , 1993
Boví	BSAO	<i>"bovine serum amine oxidase"</i>	Mu <i>et al.</i> , 1992

Taula 1. Gens clonats de les amino oxidases de la família E.C. 1.4.3.6. de diferents espècies.

2. ACTIVITAT CATALÍTICA SSAO

Les SSAOs catalitzen oxidativament la desaminació d'amines primàries seguint la reacció:



La reacció cinètica segueix un mecanisme de *ping pong* i consisteix en dos passos. En primer lloc, l'enzim és reduït pel substrat amb l'alliberament simultani del corresponent aldehid. Aquesta primera etapa implica la formació de nombrosos estats de transició en els que es forma una base de Schiff transitòria, però covalent entre l'enzim i el substrat, abans de l'alliberament de l'aldehid. En un segon pas, el cofactor topaquinona de l'enzim reduït és reciclat a la seva forma oxidada gràcies a la reoxidació per part d'una molècula d'oxigen, alliberant-se el peròxid d'hidrogen i l'amoni (Dooley *et al.*, 1991; Hartmann *et al.*, 1993).

2.1. Especificitat de substrat

Pel que fa a substrats específics de la SSAO, està generalment acceptat que tant l'enzim de membrana com el soluble metabolitzen només amines primàries. El que no s'ha aconseguit fins al moment és trobar una mateixa especificitat de substrat per les diferents espècies estudiades, fet que dificulta la creació d'una hipòtesi unificada pel paper de la SSAO *in vivo*.

El compost no fisiològic benzilamina és el substrat pel qual presenten més afinitat les SSAOs, però a la seva vegada també és substrat de la MAO-B. En certes condicions, i depenent de l'espècie i del teixit, les SSAOs són capaces de metabolitzar amines biògenes com tiramina, triptamina, dopamina, histamina i feniletilamina, entre d'altres (Fernandez de Arriba *et al.*, 1991; Lizcano *et al.*, 1991), tot i ser generalment millors substrats d'alguna de les dues isoformes de la MAO que de la SSAO.

Si ens centrem en la SSAO humana, hi ha un substrat endogen pel qual l'enzim humà és molt més actiu que la resta d'enzims d'altres espècies. Es tracta de l'amina alifàtica metilamina, que es forma com a conseqüència de la degradació de la sarcosina, la creatinina i l'adrenalina (Precious *et al.*, 1988). En quant a aquest substrat, existeix una

hipòtesi que relaciona la MAO i la SSAO en condicions d'estrès. En aquest tipus de situació, s'alliberen elevades quantitats d'adrenalina, les quals poden ser metabolitzades per la MAO-A generant metilamina, i aquesta a la seva vegada, ser oxidada per la SSAO (Yu *et al.*, 1997). D'altra banda, la metilamina pot tenir un origen exogen, ja que pot provenir de la ingesta de colina i lectina (Zeisel *et al.*, 1983) o directament de la inhalació del fum del tabac (Yu, 1998). Cal tenir en compte que la metilamina és un bon substrat tant per la forma soluble de la SSAO com per la lligada a membrana, però no és capaç de ser oxidada per cap de les dues isoformes de la MAO. Així mateix, l'aminoacetona, una altra amina alifàtica que deriva del metabolisme de la glicina i la treonina també s'ha proposat com un altre possible substrat fisiològic per la SSAO humana (Lyles and Chalmers, 1992).

2.2. Inhibidors de la SSAO

Donat que no existeix una uniformitat en l'especificitat dels substrats per la SSAO de diferents espècies, i que existeixen compostos que tant poden ser metabolitzats per la SSAO com per la MAO, cal utilitzar inhibidors específics de les dues formes enzimàtiques a l'hora d'estudiar-ne l'activitat de cada una d'elles. Un dels inhibidors que caracteritza les SSAOs, com el seu nom indica, és la semicarbazida, la qual a 1 mM les inhibeix totalment (Lewinshon *et al.*, 1978) mentre que no té cap efecte sobre les MAOs. Un altre inhibidor molt potent i més selectiu per la SSAO és la hidroxilamina, la qual a una concentració de 1 μ M inhibeix completament la SSAO lligada a membrana, no presentant cap efecte inhibitori sobre l'activitat MAO fins a una concentració de 10 mM (Lyles, 1996). Les MAOs, a la seva vegada, es caracteritzen per presentar una inhibició irreversible de tipus suïcida davant els compostos acetilènics pargilina, clorgilina i deprenil. Concretament, la clorgilina a una concentració 1 μ M inhibeix exclusivament la MAO-A, mentre que el deprenil a aquesta mateixa concentració inhibeix solsament la MAO-B (Johnston, 1968; Fowler *et al.*, 1982). Els tres inhibidors esmentats, a una concentració de 1 mM, deixen de ser específics i inhibeixen ambdues isoformes de la MAO sense tenir cap efecte sobre la SSAO.

A part de la semicarbazida, s'han descrit altres derivats de la hidrazina que inhibeixen la SSAO de membrana, com la fenelzina i la fenilhidrazina (Lizcano *et al.*, 1996). L'aminoguanidina, una hidrazina nucleofílica, també s'ha descrit com a inhibidor

irreversible de la SSAO (Yu i Zuo, 1997), tot i que no resulta ser gaire selectiu comparativament a la MAO (Lyles, 1996). Per altra banda, una altra família de compostos que presenten una forta inhibició sobre l'activitat SSAO són les haloalilamines. El compost MDL 72145 ((*E*)-2-(3',4'-dimetoxifenil)-3-fluoroalilamina) s'ha descrit com un potent inhibidor irreversible de la SSAO lligada a membrana (Lyles i Fitzpatrick, 1985), però presenta propietats inhibidores semblants sobre la MAO-B (Zreika *et al.*, 1984). Un altre inhibidor molt utilitzat ha estat el MDL 72974A ((*E*)-2-(4-fluorofenil)-3-fluoroalilamina), el qual inhibeix irreversiblement l'activitat SSAO tant de teixits vasculars com de sèrum de diferents espècies, tot i que també presenta una potent i irreversible inhibició sobre la MAO-B (Lyles *et al.*, 1987, Yu i Zuo, 1992). Més darrerament, s'han descrit dues haloamines com a inhibidors selectius de la SSAO lligada a membrana (Kinemuchi *et al.*, 2001, 2004). Es tracta de la 3-bromopropilamina, un inhibidor competitiu i reversible, i la 2-bromoetilamina, un inhibidor irreversible de tipus suïcida, el qual no presenta efectes inhibitoris sobre la MAO i és igualment efectiu en estudis *in vivo* (Yu *et al.*, 2001, 2004). Recentment, s'està utilitzant un compost carbocíclic de tipus hidrazina soluble en aigua, anomenat BTT-2027, com a potent inhibidor de la SSAO/VAP-1 (Koskinen *et al.*, 2004). Aquest compost presenta una activitat inhibidora molt baixa davant les MAOs, i s'ha observat que és altament selectiu per la SSAO. Un altre inhibidor d'aquesta família és el BTT-2042 (BioTie Therapies), utilitzat *in vivo* en animals transgènics que sobreexpressen la SSAO/VAP-1 en cèl·lules endotelials (Stolen *et al.*, 2004a).

3. SSAO LIGADA A MEMBRANA

3.1. Estructura

La SSAO de membrana és una glucoproteïna dimèrica amb un pes molecular aparent en mamífers de 180-200 kDa (Mu *et al.*, 1994; Lyles, 1996) (Fig. 2). Recentment, la cristal·lització de la proteïna humana (hVAP-1) ha permès confirmar que el pes molecular de cada monòmer en humans és de 90 kDa (Nymalm *et al.*, 2003). Cada dímer conté dos àtoms de coure i el cofactor contingut al centre actiu és la topaquinona (TPQ) (2,4,5-trihidroxifenilalanina quinona). La TPQ és una tirosina modificada en la seqüència conservada del centre actiu Ser/Thr-X-X-Asn-Tyr(TPQ)-Asp/Gly-Tyr (Janes *et*

al., 1990), la qual es forma a partir d'un procés autocatalític que requereix la unió de l'ió coure i oxigen molecular (Mu *et al.*, 1992).

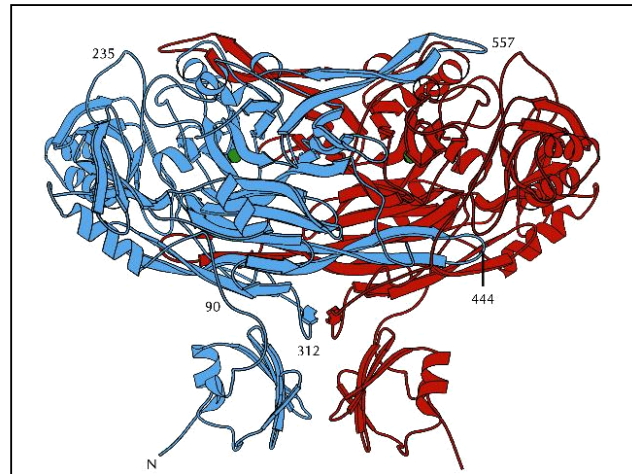


Figura 2. Representació de l'estructura de la SSAO humana. Els 2 monòmers es presenten en blau i vermell i la posició del centre actiu en verd (Jalkanen i Salmi, 2001).

La SSAO és una proteïna transmembranal tipus II amb un extrem N terminal de la molècula molt curt (4 amino àcids) encarat a la part intracel·lular, i la major part de la proteïna i el centre actiu orientats al medi extracel·lular. Segons l'estructura primària de la proteïna, totes les seqüències fins ara conegudes contenen una regió d'aminoàcids hidrofòbics entre el residu 5 i els residus 25-27, que representarien el domini transmembrana. També es conserven 3 histidines que seran les encarregades d'unir l'àtom de coure; un motiu His-X-His d'uns 50 residus al C-terminal i una altra His a uns 20-30 residus cap a l'N-terminal des del residu TPQ. Així mateix, també hi ha un residu d'àcid aspàrtic conservat a uns 100 residus cap a l'N-terminal des del residu TPQ que intervé pròpiament en el mecanisme catalític (Jalkanen i Salmi, 2001). A la figura 3 s'il·lustren els motius estructurals més importants i conservats tant en la SSAO com la DAO.

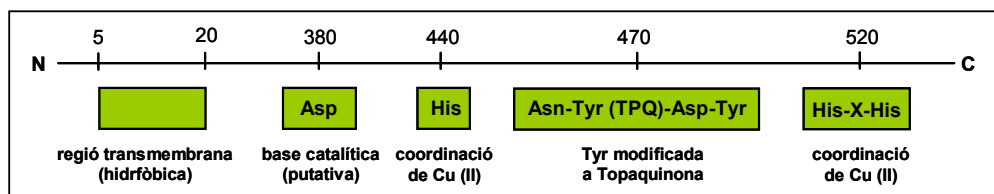


Figura 3. Motius conservats de les SSAOs. S'indiquen la regió transmembranal a l'N-terminal, el residu d'àcid aspàrtic del centre actiu, les histidines que coordinen el coure i la seqüència conservada on es troba el residu de tirosina que serà modificat per donar lloc a topaquinona. La posició dels aminoàcids és aproximada tenint en compte les diferents longituds de les SSAOs. (Jalkanen i Salmi, 2001).

Tot i que la SSAO humana ja ha estat cristal·litzada a partir de l'expressió i purificació de la proteïna en cèl·lules CHO (*Chinese hamster ovary cells*) (Nymalm *et al.*, 2003), els resultats de difracció per raigs X són preliminars i encara no es disposa de l'estructura completa de la proteïna humana. En canvi, la SSAO d'*Escherichia coli* ha estat cristal·litzada i ben caracteritzada (Parsons *et al.*, 1995). Aquesta estructura ha permès realitzar estudis de modelatge estructural de la proteïna humana (Salminen *et al.*, 1998), i es suggereix, com en el cas de la proteïna bacteriana, que la SSAO humana conté 4 dominis (D1-D4) formant una estructura en forma de bolet. El D4 és el centre catalític que conté el centre actiu i forma la interfase entre el dímer. Els D2 i D3 són dominis més petits que envolten l'entrada al centre actiu. L'estructura de dímer es manté gràcies a connexions covalents, mitjançant ponts disulfur que poden formar cisteïnes conservades en la majoria d'AO amb cofactor TPQ, i no covalents de dos β -hairpin turns del D4.

3.2. Localització

La SSAO és un enzim extensament expressat en mamífers (Lewinshon, 1984). Es distribueix principalment en teixits vascularitzats, com pulmó (Lewinshon, 1984; Lizcano *et al.*, 1994), aorta (Hysmith i Boor, 1987; Clarke *et al.*, 1982), intestí, ronyó, fetge, pàncrees o melsa (Andrés *et al.*, 2001, Morin *et al.*, 2001), i apareix majoritàriament associat a la membrana plasmàtica de cèl·lules de musculatura llisa (Lewinshon, 1984; Lyles i Singh, 1985; Hysmith i Boor, 1987). També està present en teixits no vascularitzats, bàsicament en teixit adipós blanc (Raimondi *et al.*, 1991), on presenta la màxima activitat enzimàtica associat principalment a la membrana plasmàtica cel·lular, i

en teixit adipós marró (Barrand i Callingham, 1982). La SSAO també s'expressa en cèl·lules endotelials (Salmi *et al.*, 1992; Bono *et al.*, 1998), però la distribució de la SSAO varia entre els diferents tipus de vasos sanguinis i limfàtics (Andrés *et al.*, 2001; Jalkanen *et al.*, 2001). També s'ha observat expressió de SSAO en fibroblasts de vasos sanguinis humans (Andrés *et al.*, 2001) i de pell de conill d'índies (Buffoni *et al.* 2000).

Per altra banda, també s'ha descrit la presència de SSAO en teixits com el vas deferent de rata (Lizcano *et al.*, 1991), cartílag de rata (Lyles i Bertie, 1987), odontoblasts de polpa dentària de porc (Norqvist *et al.*, 1981), i diferents teixits de l'ull boví (Fernández de Arriba *et al.*, 1991).

Donat que un dels objectius d'aquest treball serà l'estudi de la SSAO en el sistema cerebrovascular humà, cal fer constar la clara presència de SSAO en vasos cerebrals grans de meninges i microvasos de cervell humà i boví (Castillo *et al.*, 1998) i de rata (Zuo i Yu, 1994). Concretament, la SSAO s'ubica en la *túnica media* de vasos grans de meninges, mentre que en microvasos apareix a la capa *intima* endotelial. Així mateix, es confirma l'absència de SSAO en cèl·lules gials i neurones.

3.3. Funcions fisiològiques

Degut a l'amplia distribució de la SSAO en teixits de mamífers és difícil acotar l'acció d'aquest enzim *in vivo* i trobar una funció fisiològica definida. Està pràcticament acceptat que la SSAO és un enzim multifuncional depenent del teixit on s'expressi. En mamífers, en un principi es creia que la seva funció es limitava a la detoxificació d'amines endògenes i xenobiòtiques, però recentment existeixen evidències que demostren que els productes de la seva reacció catalítica poden tenir importants funcions en la regulació del desenvolupament cel·lular i en l'homeòstasi de la glucosa. Així mateix, la SSAO, en certs teixits, també es comporta com una proteïna d'adhesió vascular en condicions d'inflamació.

Per altra banda, també s'ha postulat una implicació de la SSAO en diverses situacions patològiques a nivell vascular (Lyles, 1996; Yu and Zuo, 1996; Yu *et al.*, 1997). Degut a que aquest aspecte fa referència a un gran ventall de possibles subfuncions, encara s'ha d'aclarir i confirmar algunes de les hipòtesis proposades.

3.3.1. SSAO i el metabolisme de la glucosa

En adipòcits, l'efecte de la insulina provoca un augment en la captació de glucosa promovent la translocació del transportador de glucosa GLUT-4 des dels endosomes intracel·lulars cap a la membrana plasmàtica, augmentant d'aquesta manera la densitat d'aquest transportador a la superfície cel·lular. Per altra banda, en aquest sistema la insulina també inhibeix la lipòlisis i augmenta la litogènesis.

La SSAO és una proteïna molt abundant en adipòcits madurs. De fet, la detecció quantitativa de la SSAO en adipòcits aïllats de rata indica que cada cèl·lula conté $14 \cdot 10^6$ còpies de la proteïna (Morris *et al.*, 1997). En estudiar la localització i funció de la SSAO en l'adipòcit, es va observar que, tot i que la SSAO es distribuïa majoritàriament a la membrana plasmàtica, una part de la proteïna es trobava en vesícules endosòmiques colocalitzant amb el transportador GLUT-4 (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998). Per altra banda, diferents substrats de la SSAO, com la benzilamina i la tiramina, juntament amb concentracions baixes de vanadat, induïen un augment en els nivells de recaptació de glucosa, degut a la translocació del GLUT-4 des de compartiments intracel·lulars a la membrana plasmàtica, tal i com succeïa en presència d'insulina (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Martí *et al.*, 1998).

Aquest efecte metabòlic era degut al peròxid d'hidrogen format per l'acció catalítica de la SSAO, ja que tant antioxidants, com la catalasa, o inhibidors de la SSAO, com la semicarbazida, revertien completament l'efecte observat (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998; Martí *et al.*, 1998). En adipòcits aïllats de rata, es va descriure que aquest l'efecte de l'activitat SSAO en el metabolisme de la glucosa estava relacionat amb la translocació del GLUT-4 via l'estimulació de la fosforil·lació dels substrats del receptor d'insulina (IRS-1 i IRS-3) i l'estimulació de l'activitat fosfoinositid 3 cinasa (PI-3K) (Enrique-Tarancón *et al.*, 2000), components crucials de la via de transducció de la insulina. Tots aquests efectes però, tant en adipòcits aïllats de rata com en adipòcits 3T3-L1, requerien la presència conjunta tant de substrats de la SSAO com de vanadat (Enrique-Tarancón *et al.*, 1998, 2000; Martí, 1998). El vanadat és un potent inhibidor de fosfatases, el qual en presència de peròxid d'hidrogen forma el peroxovanadat, compost capaç d'activar per ell mateix el transport de glucosa en adipòcits.

Tot i així, posteriorment es va descriure que la presència de substrats de la SSAO sense vanadat eren capaços d'augmentar el transport de glucosa en adipòcits aïllats humans (Morin *et al.*, 2001) i adipòcits 3T3 F442A (Fontana *et al.*, 2001) per ells mateixos, fet que encara feia més evident la importància biològica dels resultats anteriors i demostrava per primera vegada una funció clara per aquesta amino oxidasa. A més, aquests treballs van permetre demostrar que l'efecte de l'oxidació de substrats de la SSAO també tenia efectes insulínomimètics; a nivell d'inhibició de la lipòlisi en adipòcits aïllats humans (Morin *et al.*, 2001) i activació de la lipogènesis en cèl·lules 3T3 F442A (Fontana *et al.*, 2001). Per altra banda, cal assenyalar que l'increment en la recaptació de glucosa observat en presència de substrats de la SSAO i vanadat en adipòcits 3T3-L1 es veia inhibit pel TNF- α , el qual està implicat en la resistència a insulina en obesitat. Aquests resultats estarien d'acord amb el fet que el tractament amb TNF- α disminueix l'expressió gènica i proteica de la SSAO, així com la seva activitat catalítica, en adipòcits tant *in vitro* com *in vivo* (Mercier *et al.*, 2003).

També es va estudiar la implicació de la SSAO en el metabolisme de la glucosa en cèl·lules de musculatura llisa d'aorta de rata prèviament diferenciades, i es va demostrar que el substrat fisiològic de la SSAO, la metilamina, també era capaç d'augmentar la recaptació de glucosa via el transportador GLUT-1 sense la presència de vanadat en aquest tipus cel·lular (El Hadri *et al.*, 2002). Encara no és coneix el mecanisme pel qual alguns tipus cel·lulars requereixen l'exposició a substrats de la SSAO juntament amb vanadat per activar el transport de glucosa, mentre d'altres responen als substrats de la SSAO independentment del vanadat (Zorzano *et al.*, 2003).

Les concentracions de substrat utilitzades en els estudis *in vitro* són relativament elevades (de l'ordre de mM) i no existeixen evidències metabòliques que indiquin aquest augment en la concentració dels substrats de la SSAO. Donat que l'adrenalina estimula la recaptació de glucosa, i a més, aquesta dóna lloc a metilamina a través de l'acció de la MAO-A, alguns autors han especulat sobre un possible augment de metilamina provinent de l'adrenalina en situacions de demanda de glucosa. L'increment del substrat fisiològic de la SSAO, la metilamina, i la seva oxidació per part de la SSAO serien els responsables de l'estimulació del procés de recaptació de glucosa (O'Sullivan *et al.*, 2004).

Més darrerament, estudis *in vivo* han demostrat com l'administració aguda de benzilamina i vanadat augmenta la tolerància a la glucosa de rates no diabètiques, de rates diabètiques per estreptozotocina (SZT) (model de diabetis tipus I) (Marti *et al.*, 2001) i de rates diabètiques Goto-kakizaki (model de diabetis tipus II) (Abella *et al.*, 2003). Així mateix, tractament crònics de benzilamina i vanadat normalitzen la glucèmia en aquests dos models de diabetis. En el cas de rates diabètiques per SZT, s'observa com el tractament crònic augmenta el transport de glucosa i l'expressió de GLUT-4 (Marti *et al.*, 2001). En el cas de rates diabètiques Goto-kakizaki, el tractament crònic amb benzilamina i vanadat indueix l'augment del transport de glucosa, la quantitat de GLUT-4 a la membrana plasmàtica, reverteix la resistència a la insulina al múscul i estimula la secreció d'insulina en illots pancreàtics (Abella *et al.*, 2003). El peròxid d'hidrogen, generat per l'oxidació de substrats de la SSAO, i el vanadat generen compostos de peroxovanadat, considerats com a potents insulinomimètics i capaços d'inhibir activitats proteïna tirosina-fosfatasa i (Shisheva i Schechter, 1993). Davant aquestes dades, els autors del treball proposen que l'administració de substrats de la SSAO, juntament amb concentracions baixes de vanadat, les quals donarien lloc a una producció local de peroxovanadat, es podria considerar com una nova estratègia terapèutica per al tractament de diabetis *mellitus* (Abella *et al.*, 2003)..

També s'ha estudiat els efectes de l'administració de substrats de la SSAO per ells mateixos en models animals com el conill i ratolins diabètics (Iglesias-Osma *et al.*, 2004), ja que com s'ha comentat anteriorment, l'exposició de substrats de la SSAO sense la presència de vanadat era suficient per activar el transport de glucosa en adipòcits humans. Els resultats d'aquest treball mostren com un tractament agut amb benzilamina, en conill o ratolí, no és capaç de reproduir tots efectes insulinomimètics observats amb l'administració conjunta de benzilamina i vanadat en rata (Enrique-Taracón *et al.*, 2000; Martí *et al.*, 2001; Abella *et al.*, 2003).

3.3.2. Regulació de la diferenciació i el creixement cel·lular

L'activitat SSAO també juga un paper important en el desenvolupament d'alguns tipus cel·lulars. Concretament, s'ha descrit que l'administració de substrats de la SSAO és capaç de provocar la diferenciació adipocídica, augmentant els nivells d'expressió i d'activitat de la proteïna (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001). De fet, treballs

anteriors ja demostraven que els nivells de SSAO en preadipòcits eren pràcticament indetectables i que augmentaven durant el procés de diferenciació a adipòcits madurs (Moldes *et al.*, 1999; Raimondi *et al.*, 1990). Posteriorment, es va descriure com el tractament de fibroblasts 3T3-F442A durant 8 dies amb els substrats de la SSAO, benzilamina i tiramina, era capaç d'estimular l'adquisició del fenotip adipocitari determinat per l'aparició de diferents marcadors i l'acumulació de triacilglicerol (Fontana *et al.*, 2001). Per la seva banda, el substrat fisiològic, metilamina, també estimulava el procés de diferenciació de fibroblasts 3T3-L1 a adipòcits madurs (Mercier *et al.*, 2001). Es va observar que aquest procés era depenent de l'activitat SSAO i del peròxid d'hidrogen generat per la seva acció catalítica, ja que la presència d'inhibidors de la SSAO i compostos antioxidants impediien el procés de diferenciació cel·lular (Fontana *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001).

Així doncs, es va demostrar que la SSAO es podia considerar com un marcador tardà de la diferenciació adipocitaria i que la seva activitat donava lloc a processos de diferenciació d'aquest tipus cel·lular, tal i com ho feia l'insulina. A més, aquests resultats corroboraven el fet que el peròxid d'hidrogen no només era una font d'estrès oxidatiu, sinó que també representava un missatger secundari capaç de modular el desenvolupament i certs processos metabòlics d'adipòcits madurs o en estats de diferenciació.

Per altra banda, la SSAO també sembla tenir un paper important en el desenvolupament i el manteniment de la matriu extracel·lular. En aquest sentit, s'ha descrit com la inhibició enzimàtica de la SSAO condueix a dipòsits aberrants de col·lagen i elastina en cèl·lules de múscul llis d'aorta *in vitro* (Langford *et al.*, 2002), així com una desorganització de l'estructura d'elastina d'aorta acompanyada de degeneració vascular *in vivo* (Langford *et al.*, 1999). Aquests resultats permeten als autors dels treballs suggerir la implicació de la SSAO en el desenvolupament fisiològic de l'arquitectura d'elastina vascular, tal i com s'havia descrit anteriorment per l'enzim lisil oxidasa (Kagan *et al.*, 1995).

3.3.3. SSAO/ VAP-1: amino oxidasa amb funció d'adhesió immunològica

En situacions d'inflamació, i en resposta a certes senyals, els limfòcits que circulen per la sang han de ser transvasats als teixits afectats. En el procés de captació dels leucòcits, migració a través de la membrana de les cèl·lules endotelials dels vasos, activació, adhesió i transvasament a l'interior del teixit, hi intervenen un gran nombre de proteïnes. Una d'aquestes proteïnes és la proteïna d'adhesió vascular (VAP-1), i sembla que la seva funció estaria relacionada amb l'etapa de rodar sobre l'endoteli (*rolling*) i l'etapa d'extravasació (diapèdesi) (Tohka *et al.*, 2001) (Fig. 4).

La VAP-1 és una glucoproteïna homodimèrica (Salmi i Jalkanen, 1992) que es troba constitutivament present en grànuls intracel·lulars de cèl·lules endotelials i que es transloca a la membrana encarant-se al lumen del vas sota situacions d'inflamació (Salmi *et al.*, 1993). Fins al moment, es desconeix la molècula dels limfòcits a la qual s'adhereix la VAP-1. Tot i així, el procés d'adhesió és específic ja que no totes les poblacions de limfòcits s'adhereixen a les cèl·lules endotelials que expressen VAP-1 (Salmi *et al.* 1997).

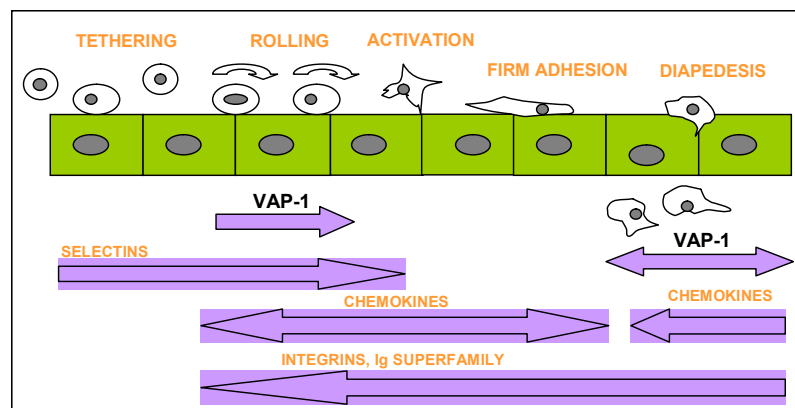


Figura 4. Procés d'extravasació de leucòcits al teixit afectat. És una cascada en diferents passos en els que es veuen implicades varies molècules d'adhesió. La VAP-1 intervé en el procés de *rolling* i contribueix en la diapèdesi. Esquema basat en el model de Jalkanen i Salmi (2001).

Quan es va clonar la VAP-1 humana és va observar que aquesta proteïna formava part de la família de SSAOs [EC 1.4.3.6.], i concretament, es va poder apreciar que seqüencialment coincidia amb la SSAO lligada a membrana (Smith *et al.*, 1998), presentant la mateixa activitat catalítica. Aquest fet va suggerir la possible implicació de l'activitat monoamino oxidasa de la proteïna amb la recaptació limfocitària, ja que estudis previs ja havien demostrat que l'activitat SSAO es veia augmentada en situacions d'inflamació (Callingham *et al.*, 1995). En experiments *in vitro*, es va descriure que la inducció de VAP-1 era un procés altament selectiu, donat que citocines inflamatòries, com IL-1, IL-4, TNF- α , IFN- γ , i LPS, eren capaces d'induir l'expressió de la proteïna en cultius de teixit d'amígdala humana, mentre no tenien cap efecte sobre la inducció de VAP-1 en altres tipus de teixit humans o en cèl·lules endotelials en cultiu (Arvilommi *et al.*, 1997). En estudiar la proteïna VAP-1 en cèl·lules de musculatura llisa en teixit, es va poder apreciar que, tot i mantenir les principals característiques descrites, la VAP-1 en múscul llis resultava ser estructuralment i funcionalment diferent a la proteïna endotelial. Concretament, la VAP-1 expressada en múscul llis no era induïble sota situacions d'inflamació i no presentava la funció d'adhesió limfocitària *in vitro* (Jaakkola *et al.*, 1999). Aquests resultats demostren que la proteïna VAP-1 està regulada de manera diferent depenent del teixit on s'expressi, i suggereix que, conseqüentment, pugui tenir una funció diferent en múscul llis o endoteli.

S'ha demostrat que l'activitat amino oxidasa és necessària per la funció d'adhesió (Salmi *et al.*, 2001), ja que inhibidors de l'activitat SSAO aconseguixen reduir en un 50% el procés de *rolling* dels limfòcits. En presència de substrats solubles específics de la SSAO, l'adhesió limfocitària sembla disminuir, enlloc d'augmentar, possiblement per un problema de toxicitat dels productes de la reacció catalítica (Salmi *et al.*, 2001). A partir d'aquests resultats, s'ha plantejat la possibilitat que es requereix de substrats adherits a la superfície cel·lular, per exemple grups amino de les proteïnes o amino sucres, enlloc de substrats solubles. En aquest context, darrerament s'ha descrit que certes aminohexoses són capaces de modular selectivament la SSAO soluble bovina *in vitro* (O'Sullivan *et al.*, 2003) donant lloc a una inhibició depenent del temps i reversible per dilució. En la recerca d'altres aminosubstrats per modelatge proteic, s'han descrit polipèptids que encaixen a la cavitat del centre actiu de l'enzim i resulten ser eficients inhibidors de l'activitat SSAO humana i de les interaccions leucòcit-endoteli (Yegutkin *et*

al., 2004). Tot i així, fins al moment no s'ha aconseguit trobar molècules cel·lulars, no solubles, que actuïn com a bons substrats d'aquest enzim.

Recentment, utilitzant cèl·lules HUVEC transfectades amb la VAP-1 humana, s'ha demostrat que la transmigració de granulòcits a través de l'endoteli és un procés regulat per l'activitat amino oxidasa de la VAP-1 (Koskinen *et al.*, 2004), ja que la transfecció de la forma mutada de la proteïna, enzimàticament inactiva, i la utilització d'inhibidors altament específics, com el BTT-2027 van permetre observar una important disminució en els processos de *rolling* i extravasació de granulòcits. Per altra banda, quan es bloquejava la VAP-1 amb anticossos específics també s'observava una disminució d'aquests dos processos, sense obtenir-se un efecte sinèrgic utilitzant els anticossos i els inhibidors de la SSAO. Aquests resultats han fet postular als autors del treball un mecanisme en dos passos diferents, però interrelacionats entre ells; en primer lloc, els leucòcits s'unirien a la proteïna (epitops que serien bloquejats l'anticòs), i en segon lloc, la unió del substrat permetria la formació de la base de Schiff necessària per dur a terme la reacció enzimàtica. Els dos passos serien imprescindibles pel correcte funcionament de la proteïna en el procés, però tot i així, cal remarcar que és tant sols una hipòtesi en la qual no es pot confirmar l'ordre dels processos plantejats (Fig. 5).

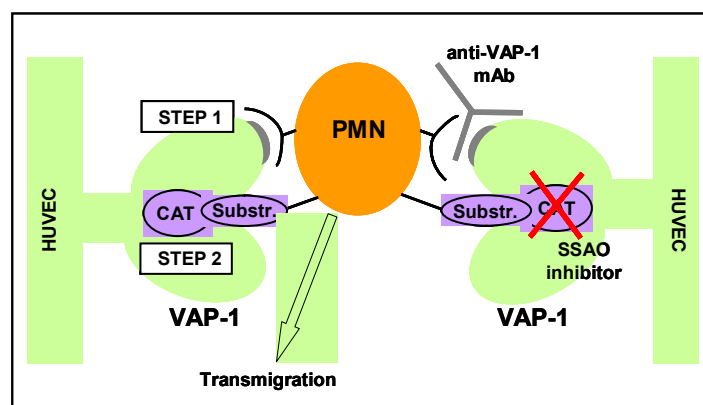


Figura 5. Esquema de la possible implicació de la VAP-1 en procés d'extravasació de granulòcits (*polymorphonuclear leukocytes*; PMN) proposat per Koskinen *et al.* (2004). En un primer pas, es dona un contacte inicial entre el PMN i la proteïna VAP-1 (bloquejat per anticossos anti-VAP-1), i en segon lloc, es produeix la reacció oxidativa del substrat (inhibit per inhibidors de la SSAO). Els dos passos serien independents, però imprescindibles per a dur a terme el procés d'extravasació.

No ha estat fins la generació de ratolins deficients en el gen AO3 (VAP-1) (Stolen *et al.*, 2005) que no s'ha pogut confirmar el paper de aquesta proteïna en la migració leucocitària. En aquest model animal, s'ha demostrat que la VAP-1 és una de les proteïnes necessàries per l'entrevessament de leucòcits sota situacions fisiològiques i d'inflamació, concretament, s'ha observat una disminució important en els processos de *rolling*, de ferma adhesió i de diapedesis de limfòcits i leucòcits polimorfonuclears (PMN). Cal remarcar però, que el gen AO3 no és necessari pel desenvolupament, i que l'absència de la proteïna, i la seva conseqüent activitat catalítica, no implica un diferent fenotip, ni canvis macroscòpics ni microscòpics en cap dels teixits analitzats.

3.3.4. Altres possibles funcions

Recents estudis en adipòcits madurs mostren com la SSAO es troba localitzada en caveoles. Aquestes estructures són invaginacions de 50-100 nm de la membrana plasmàtica formades per l'expressió d'una o més isoformes de cavelolina, i s'ha suggerit que estan involucrades en el transport lipídic cap a dins i fora de l'adipòcit. Estudis de Suoto *et al.*, (2003) han mostrat com les caveoles d'adipòcits madurs no presenten receptors d'insulina ni transportadors de glucosa GLUT-4, però en canvi, les proteïnes que s'expressen majoritàriament són un receptor *scavenger* de lipoproteïnes, CD36, i la SSAO. Donat que aquestes dues proteïnes tenen una estructura tridimensional molt similar, s'ha proposat que la SSAO també pugui intervenir amb el transport de lípids en adipòcits madurs per un mecanisme encara desconegut (Souto *et al.*, 2003).

4. SOBREEXPRESSIÓ DE VAP-1/SSAO EN MODELS EXPERIMENTALS D'ANIMALS TRANSGÈNICS

En els darrers dos anys s'han publicat diferents treballs en els quals s'exposa l'estudi de models de ratolins transgènics que sobreexpressen la SSAO/VAP-1 humana en diferents tipus cel·lulars. Aquests estudis són de gran importància per intentar explicar la funció fisiològica de la SSAO tissular i soluble en diferents teixits, així com el comportament d'aquest enzim en certes patologies.

El primer model de ratolí transgènic descrit (Göktürk *et al.*, 2003) sobreexpressava la proteïna SSAO humana específicament en cèl·lules de múscul llis de ratolí adult, ja que per desenvolupar aquest model es va utilitzar un constructe amb el promotor de l' α -actina de múscul llis de ratolí. Eren animals amb un fenotip aparentment normal, fèrtils i amb un desenvolupament equivalent als ratolins homòlegs salvatges. És va realitzar l'estudi quan els ratolins tenien entre 2 i 4 mesos d'edat, i l'anàlisi dels nivells d'mRNA va revelar un augment d'expressió de SSAO en tots aquells teixits rics en musculatura llisa, amb el corresponent increment en l'activitat SSAO. Per altra banda, també es va detectar un augment significatiu d'activitat SSAO soluble en el sèrum d'aquests ratolins. Un dels canvis observats en aquests transgènics va ser l'anormal morfologia i arquitectura de les fibres d'elastina de la túnica *media* de l'aorta i l'arteria renal, ja que anàlisis histoquímiques mostraven una severa rigidesa d'aquestes làmines d'elastina. A més, aquests animals presentaven una pressió arterial més baixa que els ratolins salvatges, probablement degut a que la inflexibilitat de l'aorta no els permetia regular la pressió sanguínia de la mateixa manera que ho feien els ratolins no transgènics. Aquestes dades suggerien la implicació de la SSAO en la organització de l'estructura d'elastina del teixit connectiu, com s'havia plantejat anteriorment i tal com estava descrit per la proteïna lisil oxidasa (Langford *et al.*, 1999).

Paral·lelament, es va descriure un altre model de ratolí transgènic, el qual sobreexpressava la SSAO/VAP-1 específicament en cèl·lules endotelials (mTIEhVAP-1) (Stolen *et al.*, 2004a). Aquests ratolins també eren normals en quant al comportament i la reproducció, però resultaven lleugerament més obesos que els ratolins salvatges. En ratolins de 15 mesos d'edat, s'observava una sobreexpressió de la VAP-1 en la superfície cel·lular de les cèl·lules endotelials dels mTIEhVAP-1, però a més, aquests ratolins presentaven un important augment en els nivells de VAP-1 humana circulant en sèrum, associat a l'increment d'activitat SSAO. L'administració crònica de metilamina, per una banda, feia augmentar els nivells de recaptació de glucosa a aquells animals transgènics que havien estat sotmesos a un test de tolerància a la glucosa, i aquest efecte es veia revertit per l'administració prèvia d'inhibidors de la SSAO. Però per altra banda, el substrat metilamina en mTIEhVAP-1 produïa certes complicacions associades a la malaltia de la diabetis, com l'augment de productes avançats de glucosilació (AGE; *advanced glycation end products*), l'augment de la pressió sanguínia i la modificació de la progressió d'arteriosclerosi.

Aquestes dades apuntaven a que l'administració de substrats de la SSAO es podia considerar com una bona diana per al restabliment de la hiperglucèmia en diabetis, però a l'hora, s'havia de tenir present que els productes metabòlics derivats de l'acció catalítica de l'enzim podien provocar complicacions i dany vascular, tal i com ja havien apuntat anteriors treballs de Yu *et al.* (1997, 1998).

Els mateixos autors van generar un altre model d'animal transgènic on la SSAO/VAP-1 humana s'expressava específicament en el teixit adipós (aP2hVAP-1) (Stolen *et al.*, 2004b). En aquests ratolins, s'observava una elevada expressió de VAP-1 en teixit adipós blanc i marró, però en aquest cas, els nivells de proteïna i d'activitat SSAO en el sèrum eren molt més baixos que en els ratolins mTIEhVAP-1. En el cas de la inducció de diabetis mitjançant l'administració de STZ, tant de ratolins aP2hVAP-1 com mTIEhVAP-1, s'aconseguien detectar uns valors molt més elevats de proteïna VAP-1 humana soluble en sèrum associats a activitat SSAO en ambdós models.

Així doncs, tots aquests models transgènics han permès avançar en el coneixement de la proteïna SSAO en situacions fisiològiques i en malalties com la diabetis, on com es comentarà més endavant, la SSAO té una important rellevància. També cal destacar la immensa utilitat d'aquests models *in vivo* per tal d'estudiar possibles teràpies a malalties en els quals s'observa una desregulació o sobreexpressió de la proteïna SSAO. Per altra banda, i tal i com es veurà més profundament en els següents apartats, aquests models animals han estat de gran ajuda a l'hora d'esclarir l'origen de la forma soluble de la SSAO i complementar altres estudis *in vitro* duts a terme paral·lelament.

5. SSAO PLASMÀTICA

Existeix una forma soluble de la SSAO circulant a la sang en totes les espècies de mamífers estudiades (Lyles, 1996). Es tracta d'una activitat enzimàtica que catalitza la desaminació oxidativa d'amines primàries. En totes les espècies estudiades, la benzilamina (amina sintètica) sembla ser el substrat preferent de la SSAO plasmàtica, la qual també és sensible a reactius tipus carbonil (semicarbazida, fenilhidrazina) i insensible a inhibidors de tipus acetilènic (clorgilina, deprenil) (Blaschko *et al.*, 1962; McEwen, 1965). Des de que es va demostrar per primera vegada la presència d'aquesta

amino oxidasa en cavall (Bergeret *et al.*, 1957), s'ha intentat trobar la seva funció i procedència, però no ha estat fins fa pocs anys que es comencen a tenir indicis clars del seu origen.

5.1. Origen de la SSAO plasmàtica

Al llarg dels anys, s'han plantejat diferents hipòtesis per explicar la procedència de la SSAO soluble. Existeixen indicis bibliogràfics que indiquen que la SSAO plasmàtica i la SSAO tissular podrien ser dues formes enzimàtiques diferents i independents, les quals estarien codificades per gens diferents. Una altra possibilitat plantejada ha estat el fet que la SSAO soluble derivés de la SSAO de membrana com a conseqüència d'un diferent procés d'*splicing* a partir d'un mateix gen. Tot i així, recents evidències apunten a que la forma soluble de la SSAO es produeix a partir del tall proteolític o *shedding* de la forma de membrana.

Una dada important que va suggerir que la SSAO soluble estava codificada per un gen diferent va ser el clonatge de la forma plasmàtica bovina (BSAO) (Mu *et al.*, 1994). De fet, en analitzar una llibreria genòmica bovina, Hødgal *et al.*, (1998) van trobar tres gens diferents per la SSAO; un gen que codificaria per la forma de membrana (en pulmó, fetge, cor i melsa), un segon gen que s'expressaria al fetge i codificaria per la forma soluble, i un darrer que codificaria per la bDAO. Altres estudis en porc van descriure diferències de seqüència en el centre actiu de la proteïna purificada plasmàtica respecte la forma de membrana (Holt *et al.*, 1998). Així mateix, estudis cinètics demostren que les dues formes de la SSAO presenten diferències en ovella (Elliott *et al.*, 1992). Tot i que aquests treballs no són del tot conclouents, suggereixen que l'espècie pot ser un factor determinant a l'hora de postular l'origen de la SSAO plasmàtica.

La seqüència publicada del genoma humà va permetre descriure dos únics gens per la SSAO humana corresponents a les formes tissulars; AOC3 (*human vascular adhesion protein oxidase 1/ human placenta copper containing amine oxidase*) i AOC2 (*human retina-specific amine oxidase*), descartant l'existència d'un gen independent per la forma soluble en humans.

Kurkijarvi *et al.*, (2000) suggereixen que la forma soluble humana provingui de la forma tissular expressada en fetge. Concretament, demostren que l'eliminació de la VAP-1 soluble per una columna d'immunoafinitat va acompanyada de la total supressió d'activitat SSAO en sèrum. Així mateix, diversos estudis correlacionen la quantitat de proteïna VAP-1 amb l'activitat SSAO en sèrum procedent d'individus control (Boomsma *et al.*, 2003), i de pacients amb malalties inflamatòries de fetge (Kurkijarvi *et al.*, 1998) i amb diabetis (Salmi *et al.*, 2002). Tot i que aquesta dada demostra que la VAP-1 és la única font d'activitat SSAO, no permeten concloure si la SSAO circulant és una conseqüència d'un procés proteolític o és una forma d'*splicing* diferent del mateix gen.

Recentment, la publicació del treball d'Abella *et al.*, (2004) ha permès avançar molt en aquest camp. Aquests autors descriuen com la SSAO d'adipòcits 3T3-L1 i explants humans de teixit adipós en cultiu alliberen SSAO soluble al medi en un procés proteolític depenent d'una activitat metal·loproteasa. Les dades que recolzen aquest estudi són: 1) el fet que la forma SSAO alliberada al medi de cultiu és d'un tamany 2 KDa inferior a la cel·lular, d'acord amb la pèrdua del domini transmembrana i citoplasmàtic, 2) conté la mateixa quantitat de glucosilacions i residus d'àcid siàlic, i 3) presenta uns valors cinètics de Km en front a benzilamina similars a la forma de membrana en adipòcits. Així mateix, la presència de l'inhibidor de metal·loproteases de matriu (MMP), batimastat, impedeix l'alliberació de la SSAO al medi de cultiu. Aquests mateixos autors proposen que l'acció de les MMP, així com altres estímuls, tals com el TNF- α o l'augment d'AMPc, podrien induir l'alliberació de SSAO soluble.

Per altra banda, en estudis *in vivo* en rates i ratolins diabètics, així com en rates obesas, s'observa un augment en l'activitat SSAO plasmàtica. En canvi, en rates que han patit una ablació d'una part del teixit adipós, s'observa una davallada d'aquesta activitat (Abella *et al.*, 2004). Aquests resultats suggereixen que el teixit adipós podria ser una font important de SSAO soluble, ja que tant en situacions patològiques, com diabetis o obesitat, en les quals hi ha una greu alteració metabòlica del teixit adipós, provoquen canvis en els nivells de SSAO circulant.

Estudis en models d'animals transgènics (veure Introducció I.4), en els quals es sobreexpressa la proteïna VAP-1/SSAO humana específicament en certs tipus cel·lulars, han complementat i reforçat els estudis plantejats fins al moment sobre

l'origen de la forma soluble de la SSAO. Així doncs, la sobreexpressió de VAP-1 humana en cèl·lules de múscul llis (Göktürk *et al.*, 2003, 2004), en cèl·lules endotelials (ratolins mTIEhVAP-1) (Stolen *et al.*, 2004a, 2004b) i en adipòcits (ratolins aP2hVAP-1) (Stolen *et al.*, 2004b) de ratolí, dona lloc a un augment de l'activitat SSAO en tots els casos, associat a un augment dels nivells de la proteïna VAP-1 utilitzant anticossos contra la forma humana de la proteïna (Stolen *et al.*, 2004a, 2004b). Aquesta dada recolzaria la hipòtesi que defensa que la SSAO soluble prové de la forma de membrana cel·lular, almenys en humans i en certes espècies.

Donat que els nivells de SSAO soluble són molt més elevats en el cas dels ratolins mTIEhVAP-1 que en ratolins aP2hVAP-1, Stolen *et al.* (2004) defensen que la proteïna soluble provindria de la SSAO expressada en cèl·lules endotelials, tal i com ja s'havia proposat anteriorment per Kurkijarvi *et al.* (1998). En canvi, en el cas de situacions patològiques, com per exemple en diabetis, el teixit adipós podria ser una altra font d'origen, ja que ratolins transgènics aP2hVAP-1 alliberaven una quantitat molt superior de proteïna VAP-1 quan se'ls induïa diabetis. Aquest fet també corroboraria els experiments plantejats per Abella *et al.* (2004), en els quals s'observava com diferents estímuls eren capaços de provocar l'alliberament de la proteïna d'adipòcits en cultiu. Tot i així, no es pot descartar que en certes patologies, altres estímuls, per exemple un augment de l'expressió de MPP, puguin augmentar el *shedding* de la proteïna expressada en altres tipus cel·lulars, com cèl·lules de múscul llis.

Així doncs, caldran futures investigacions en aquest sentit per tal d'estudiar les causes i les conseqüències d'un alliberament anormal de proteïna per part dels diferents tipus cel·lulars que expressen la SSAO de membrana. Tanmateix, les evidències presentades fins al moment semblen indicar que, almenys en humans, la SSAO soluble provindria de la SSAO tissular, encara que caldrà aprofundir en l'estudi del mecanisme d'alliberament en diferents models *in vitro* i *in vivo*.

5.2. SSAO plasmàtica en situacions patològiques

Tot i que encara no s'ha establert una funció concreta per la SSAO soluble present en plasma, s'han descrit diverses condicions patològiques en les quals la seva activitat es troba augmentada o disminuïda respecte els valors normals en condicions fisiològiques.

De fet, diferents treballs demostren com els nivells de SSAO plasmàtica humana i la seva activitat es mantenen dins uns nivells estables en individus control, sense correlacionar-se amb l'edat o el sexe dels individus (Kurkijarvi *et al.*, 1998, Salmi *et al.*, 2002; Boomsma *et al.*, 2003).

En humans, s'ha descrit un augment d'activitat SSAO plasmàtica en pacients amb diabetis tipus I (Boomsma *et al.*, 1995, 1999; Salmi *et al.*, 2002), amb diabetis tipus II (Boomsma *et al.*, 1995; Boomsma *et al.*, 1999; Meszaros *et al.*, 1999) i diabetis tipus II associada a retinopatia (Garpenstrand *et al.*, 1999; Gronvall-Nordquist *et al.*, 2001), amb infart de miocardi (Boomsma *et al.*, 1997), en obesos (Weiss *et al.*, 2003), en pacients amb certes malalties inflamatòries de fetge (McEwen, 1967; Kurkijarvi *et al.*, 1998, 2000) i renals (Kurkijarvi *et al.* 2001). No obstant, en artritis reumatoidea i en malalties inflamatòries de l'intestí (Kurkijarvi *et al.*, 1998) no s'han detectat canvis en els valors d'activitat SSAO plasmàtica, indicant que els augments descrits són específics de determinades malalties inflamatòries.

D'altres casos interessants en els que l'activitat SSAO soluble es veu modificada és en pacients cremats, on l'activitat davalla considerablement, o en pacients amb diferents tipus de càncers (Lewinshon, 1977). Tot i així, en el cas de càncer de pròstata que impliqui metàstasi òssia, s'ha trobat un augment considerable d'aquesta activitat enzimàtica. En canvi, en pacients amb càncer prostàtic que no impliqui metàstasi, els nivells d'activitat de la SSAO plasmàtica es troben dins el rang de la normalitat (Ekblom *et al.*, 1999).

Tot i que l'activitat SSAO es troba alterada en certes situacions patològiques, els resultats dels que es disposa fins al moment no permeten explicar els mecanismes responsables causants dels canvis en els nivells d'activitat i de proteïna VAP-1/SSAO.

5.3. Possibles funcions de la SSAO plasmàtica

Donat l'escàs coneixement que es tenia fins fa poc temps sobre la procedència de la forma soluble de la SSAO, ha estat difícil trobar-ne una funció fisiològica associada a la seva activitat. Alguns autors han postulat que senzillament la seva funció sigui la

desaminació del seu substrat endogen preferent, no descrit encara per moltes espècies, o altres amines exògenes.

Per una part, la SSAO plasmàtica bovina s'ha descrit que és capaç de modular els fluxos a través dels canals de K^+ neuronals. Concretament, s'ha observat que l'acció de la SSAO activa els fluxos del canal inhibint la despolarització de membrana induïda per una altra proteïna que conté coure, la ceruloplasmina (Wu *et al.*, 1996). Tot i així, encara no es coneixen els possibles efectes fisiològics d'aquests resultats.

Per altra banda, s'ha proposat una possible funció fisiològica de la SSAO plasmàtica humana que estaria relacionada amb la modulació de l'adhesió dels limfòcits a les cèl·lules endotelials (Kurkijarvi *et al.*, 1998), suposadament enviant senyals positives als limfòcits, ja que s'ha observat que cèl·lules transfectades amb VAP-1 augmenten els nivells d'adhesió en presència de l'enzim soluble.

5.4. Moduladors de la SSAO plasmàtica

Tot i que s'ha descrit que l'augment observat en l'activitat SSAO plasmàtica en certes patologies es correlaciona totalment amb l'increment dels nivells de proteïna (Kurkijarvi *et al.*, 1998; Salmi *et al.*, 2002), l'estudi sobre la modulació de la forma soluble és de gran interès per tal d'esclarir els possibles mecanismes que podrien contribuir a l'increment o decrement d'aquesta activitat observada en humans.

Buffoni *et al.* al 1983 van descriure la presència en plasma humà d'un inhibidor reversible de l'activitat SSAO plasmàtica. Tot i així, aquest modulador no va ser caracteritzat i se'n desconeixen els seus nivells en situacions patològiques. Anys més tard, s'han observat diferents molècules que poden inhibir l'activitat de la SSAO plasmàtica bovina (BSAO) en experiments *in vitro*, tals com el peròxid d'hidrogen (Pietrangeli *et al.*, 2000), generat per la pròpia acció catalítica de l'enzim o addicionat exògenament, actuant com a modulador enzimàtic. Darrerament, s'ha descrit com certes aminohexoses, la galactosamina, glucosamina i manosamina, són capaces d'inhibir selectivament la BSAO, mentre els seus N-acetil derivats i les hexoses corresponents no presenten cap efecte sobre la seva activitat (O'Sullivan *et al.*, 2003).

Per altra banda, Trent *et al.* (2002) descriuen un efecte activador sobre la SSAO present en el FCS (*Fetal Calf Serum*), així com un efecte inhibidor sobre l'activitat SSAO de plasma de rata, per part del medi de cultiu estàndard *Dulbecco's modified Eagle media* (DMEM) *in vitro*. Aquests efectes contraris per part del DMEM sobre l'activitat SSAO suggereixen que l'efecte modulador del DMEM dependria de l'origen i l'espècie de la qual prové l'enzim soluble. Tot i així, aquest estudi no permet aïllar el component del DMEM responsable de l'efecte observat, descartant candidats com la glucosa, l'àcid pirúvic, la L-glutamina i la piridoxina, i proposant un possible efecte sinèrgic entre diferents components continguts en el DMEM. Aquests treballs poden resultar interessants en el context de buscar possibles molècula(es) a la sang capaces de contribuir a l'augment d'activitat SSAO observat en certes patologies.

6. SSAO I EL CATABOLISME D'AMINES BIÒGENES COM A RESPONSABLE DEL DANY VASCULAR

Donada la capacitat de la SSAO per oxidar amines alifàtiques, com la metilamina i l'aminoacetona, durant molts anys s'ha considerat que una de les funcions d'aquest enzim era precisament la desaminació d'aquests compostos que es troben circulant en sang. Tot i així, els productes de la reacció d'oxidació dels dos substrats fisiològics proposats fins al moment, donen lloc a compostos encara més tòxics que els substrats inicials; amoni, peròxid d'hidrogen, i formaldehid (McEwen, 1965), en el cas de metabolitzar metilamina, i metilgloxal, en el cas de l'aminoacetona (Precious *et al.*, 1988; Lyles i Chalmers, 1992).

6.1. Productes generats per l'oxidació d'amines alifàtiques

El formaldehid, per la seva banda, és un reactiu altament citotòxic, considerat com un carcinogen potencial per la seva capacitat d'interaccionar amb monoamines i amides per acabar formant complexos covalents amb proteïnes i amb cadenes senzilles de DNA (Heck *et al.*, 1990).

En un principi, l'efecte del formaldehid sobre cèl·lules en cultiu va ser estudiat a través de mesures indirectes; mitjançant el tractament amb molècules generadores de

formaldehid, és a dir substàncies amb grups N-metil, i molècules capturadores d'aquest, com la dimedona (Szende *et al.*, 1995) o el resveratrol (Szende *et al.*, 2000). Els resultats d'aquests estudis suggerien que la presència d'elevades concentracions de formaldehid induïa apoptosi cel·lular, en canvi, a baixes concentracions aquest compost tenia efectes proliferatius sobre cèl·lules tumorals (Szende *et al.*, 1995; Szende *et al.*, 2000). Posteriorment, es va confirmar el paper del formaldehid com a inductor aptptòtic en cèl·lules endotelials (Tyihak *et al.*, 2001), en timocits de rata (Nakao *et al.*, 2003) i en cèl·lules mesotelials humanes (Amore *et al.*, 2003). Tot i que no es coneix el mecanisme d'actuació del formaldehid a nivell cel·lular, ni la cascada apoptòtica que desencadena, el treball de Teng *et al.* (2001) proposa que el formaldehid actuaria a nivell d'enzims mitocondrials, ja que tractaments amb formaldehid exogen inhibeixen la respiració mitocondrial augmentant els nivells de ROS (*Reactive Oxygen Species*) intracel·lulars.

El formaldehid és metabolitzat per diferents deshidrogenases intracel·lularment; l'alcohol deshidrogenasa citosòlica, la qual redueix el formaldehid a metanol, l'aldehid deshidrogenasa mitocondrial, que l'oxida a format, i la formaldehid deshidrogenada depenent de glutatió. En aquest sentit, s'ha descrit que aquests tres enzims tenen un paper clau en la detoxificació del formaldehid, ja que la seva inhibició comporta una recuperació en la citotoxicitat induïda per tractaments amb formaldehid exogen en hepatòcits (Teng *et al.*, 2001). El fet que la formaldehid deshidrogenasa no es trobi present en sèrum (Helander i Tottmar, 1987) és una dada especialment interessant pel que fa referència al metabolisme de la SSAO. Com s'ha comentat anteriorment, aquest enzim es troba en forma soluble a la sang, o associat a la membrana de cèl·lules vasculares amb el centre actiu encarat extracel·lularment. Així doncs, en el cas d'oxidar metilamina, el formaldehid format no pot ser metabolitzat si no és prèviament transportat als eritròcits, i per tant, es pot comportar com un inductor de dany cel·lular, especialment en cèl·lules de vasos sanguinis.

Per altra banda, el metilglixal també és considerat un producte tòxic que indueix apoptosi en cultius cel·lulars (Okado *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2000; Amore *et al.*, 2003), probablement a través de la formació de radicals lliures i la seva capacitat d'augmentar l'entrecreuament covalent entre proteïnes (Nagaraj *et al.*, 1996). A més, aquests aldehids també han estat implicats en l'augment de la peroxidació lipídica (Deng *et al.*,

1998) i l'activació de la glicació avançada de proteïnes (Yu *et al.*, 1997; Mathys *et al.*, 2002) donant lloc a la formació de productes AGE. Aquests compostos es formen a partir dels productes d'Amadori, els quals representen totes aquelles proteïnes que han estat glicosilades a través de reaccions no enzimàtiques, i que posteriorment, per modificacions bàsicament oxidatives (reaccions Maillard), han donat lloc als anomenats productes de glicosilació avançats (AGE). L'acumulació de productes AGE *in vivo* pot provocar l'entrecruament anormal de proteïnes, i se'ls ha implicat en estats patològics associats a la diabetis, com l'arteriosclerosi, la hipertensió i disfuncions renals (Brownlee, 2000).

Els altres productes generats per l'acció catalítica de la SSAO, l'amoni i el peròxid d'hidrogen (H_2O_2), també són considerats potencialment tòxics. El peròxid d'hidrogen és una espècie reactiva d'oxigen (ROS), la qual a determinades concentracions pot induir dany cel·lular i tissular, en tant que augmenta l'estrès oxidatiu i els nivells de radicals lliures. L' H_2O_2 dóna lloc principalment a espècies altament reactives i tòxiques, com els ions hidroxil, a través de la reacció de Fenton (Gutteridge, 1994). És interessant destacar que el formaldehid, en presència de peròxid d'hidrogen, també és capaç de generar radicals lliures (Lichszteld *et al.*, 1977). No obstant, el peròxid d'hidrogen també es considera una molècula de senyalització, que a baixes concentracions, pot regular diferents factors de transcripció i processos biològics en general (Kunsch i Medford, 1999).

6.2. El metabolisme de la SSAO com a possible font de dany vascular

La hipòtesi que els productes metabòlics de la SSAO puguin generar dany vascular va aparèixer gràcies als treballs on es descrivia que l'amina alifàtica industrial, alilamina, es convertia en un aldehid altament tòxic, l'acroleïna (Boor *et al.*, 1990). Donat que la SSAO s'expressa àmpliament en teixits vascularitzats, es va proposar que l'acció catalítica de la SSAO podia ser responsable de lesions cardiovasculars. Aquesta hipòtesi es va reforçar amb treballs posteriors, en els quals es descrivia una elevada citotoxicitat induïda pel tractament amb alilamina en cèl·lules vasculares en cultiu (Hysmith i Boor, 1988). En aquests estudis s'observava com aquesta mort cel·lular només es revertia lleugerament amb catalasa, suggerint que l'aldehid acroleïna era el màxim responsable de la citotoxicitat obtinguda (Ramos *et al.*, 1988).

Per altra banda, la SSAO present en el FCS (Lyles, 1996) també es va implicar en la mort de cèl·lules de múscul llis en cultiu amb el tractament amb alilamina (Conklin *et al.*, 1998). Posteriorment, es va descriure com la metilamina també induïa citotoxicitat en cèl·lules endotelials en cultiu en presència tant de SSAO lligada a membrana com de SSAO plasmàtica humana addicionada externament al cultiu, i que aquest efecte es revertia en presència d'inhibidors específics de la SSAO (Yu i Zuo, 1993). Així mateix, aquests resultats suggerien que el formaldehid generat pel metabolisme de la SSAO era el principal responsable de la mort d'aquest tipus cel·lular.

Tanmateix, estudis posteriors han descrit que cèl·lules de múscul llis d'aorta de rata, semblen ser resistents al tractament amb metilamina (Langford *et al.*, 1999), probablement per la poca expressió SSAO en aquest tipus cel·lular en cultiu. En quant a l'efecte de l'altra amina alifàtica considerada com a possible substrat de la SSAO, l'aminoacetona, no s'han descrit fins al moment estudis que la impliquin en toxicitat cel·lular. No obstant, s'ha observat que el tractament d'aquesta amina, en cèl·lules de múscul llis en cultiu i en rates *in vivo*, indueix un augment de la síntesi de productes AGE (Mathys *et al.*, 2002), en principi a través de la formació de l'aldehid metilglioxal generat per l'acció catalítica de la SSAO i considerat com un dels principals precursors dels productes AGE (Shamsi *et al.*, 1998).

Altres estudis *in vivo* demostren com l'administració de metilamina i aminoacetona en rata, provoca un augment en els nivells dels aldehids formaldehid i metilglioxal, respectivament, en l'orina d'aquests animals. Aquest efecte es veu revertit per la prèvia administració de substrats específics de la SSAO, suggerint que efectivament la SSAO *in vivo* metabolitza aquestes amines i que els aldehids no són metabolitzats totalment per l'organisme, i per tant, són una possible font de dany tissular. A més, l'administració crònica d'aquestes amines augmenta l'excreció de malondialdehid, un producte terminal de la peroxidació lipídica (Deng *et al.*, 1998). Altres estudis en ratolí mostren com l'administració *in vivo* de metilamina també crea la formació d'adductes irreversibles en diversos teixits (Yu i Zuo, 1996). Concretament, l'administració de metilamina marcada radioactivament, ha permès observar la formació d'adductes formaldehid-proteïna en ratolins, inhibint la seva aparició amb la prèvia administració de l'inhibidor de la SSAO MDL-72974A (Gubisne-Haberle *et al.*, 2004). Aquests resultats són una prova més que

el formaldehid, procedent de la desaminació de la metilamina, indueix *crosslinking* proteic a nivell tissular.

La utilització d'animals transgènics que sobreexpressen la SSAO (Stolen *et al.*, 2004a) han aportat més dades interessants en les quals s'implica la desaminació de la metilamina en desordres vasculars, ja que l'administració crònica de metilamina a aquests ratolins transgènics indueix l'augment de productes AGE, l'augment de la pressió sanguínia i la modificació de la progressió d'arteriosclerosi.

Donat que s'ha demostrat un augment d'activitat SSAO plasmàtica en pacients amb diabetis tipus I i II (Boomsma *et al.*, 1999; Meszaros *et al.*, 1999), relacionada amb retinopatia associada a la diabetis (Garpenstrand *et al.*, 1999), també s'han realitzat estudis *in vivo* mitjançant l'administració de inhibidors de la SSAO en models d'animals diabètics. L'administració de MDL-72974A a rates diabètiques per STZ provoca una disminució del marcador de nefropatia, lactat deshidrogenasa en orina (Yu i Zuo, 1997). Així mateix, l'administració d'aquest mateix inhibidor i d'aminoguanidina a ratolins diabètics KKAy causa un increment en la quantitat de metilamina en orina, una disminució de la quantitat de formaldehid i malondialdehid, i una disminució de lesions arterioscleròtiques (Yu *et al.*, 2002). L'aminoguanidina, inhibidor irreversible de la SSAO (Lyles, 1996), està implicat en la prevenció de glicació i en la formació de productes AGE (Edelstein i Browlee, 1992), així com la peroxidació lipídica *in vivo* (Bucala *et al.*, 1993). A més, s'ha descrit que l'aminoguanidina redueix la formació de plaques aterogèniques de ratolins que han estat alimentats amb una dieta rica en colesterol (Panagiotopoulos *et al.*, 1998).

Tant les dades exposades fins al moment, com els resultats que descriuen un augment de l'activitat SSAO en pacients amb certes malalties cardiovasculars, diabetis i desordres relacionats, porten a suggerir que la SSAO podria estar implicada en el dany vascular i a la formació de lesions aterogèniques. Moltes de les patologies, en les que s'ha descrit una alteració dels nivells de SSAO plasmàtica, es caracteritzen per estar relacionades amb desordres vasculars. És per això que s'ha elaborat la hipòtesi en la qual la SSAO, i més concretament els productes de la seva reacció catalítica, estarien provocant una alteració funcional i estructural de les proteïnes, un augment de la peroxidació lipídica i de l'estrès oxidatiu de les cèl·lules dels teixits vasculars, contribuint

a l'angiopatia lligada a l'estrès en malalties vasculars i cerebrovasculars, com la malaltia d'Alzheimer associada a angiopatia cerebral amiloide (CAA) (Yu, 2001). En l'esquema de la figura 6 es representa la hipòtesi que relacionaria la SSAO amb l'angiopatia lligada a l'estrès proposada per Yu *et al.*, (2003).

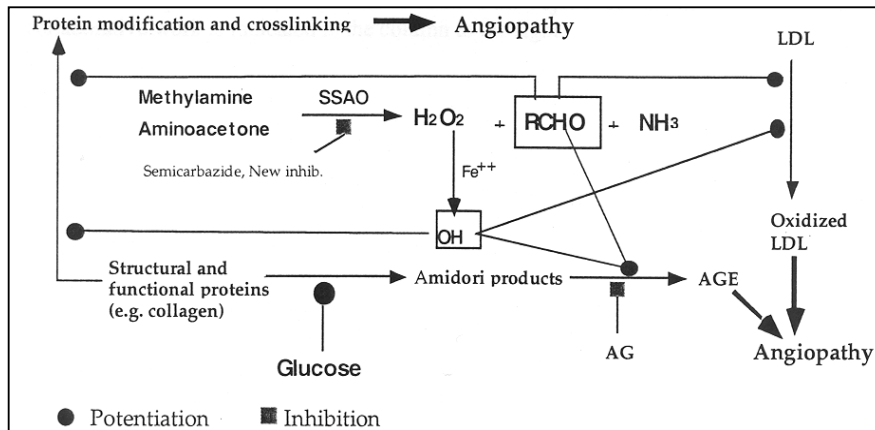


Figura 6. Hipòtesi de la implicació de la desaminació oxidativa per part de la SSAO en desordres vasculars proposada per Yu *et al.*, 2003.

II. MORT CEL·LULAR

1. Mecanismes de mort cel·lular

S'han descrit dues vies principals de mort cel·lular; un procés considerat passiu, definit com a necrosi, i una mort programada, definida com a apoptosi. Tot i així, evidències recents indiquen que els processos típics de mort per necrosi i apoptosi representen únicament els dos extrems d'un ample rang de possibles processos morfològics i bioquímics (Leist i Nicotera, 1997). Aquests dos tipus clàssics de mort es poden donar simultàniament, i el tipus, la intensitat i la duració de l'estímul, definiran si la cèl·lula és conduïda cap a un tipus de mort o un altre.

2. Mort cel·lular programada: Apoptosi

El terme apoptosi s'ha usat per definir un tipus de mort cel·lular programada (Kerr *et al.*, 1972). Aquesta definició té un caràcter funcional i implica que la mort cel·lular es produeix per activació regulada d'un programa preexistent codificat en el genoma. En termes cinètics tissulars, l'apoptosi es pot considerar com un mecanisme que contraresta l'efecte proliferatiu de la divisió cel·lular mitòtica, i per tant, és un procés fisiològic que es dona durant el desenvolupament i la embriogènesi o en cèl·lules danyades per defectes genètics, envelliment o en certes patologies. De fet, la desregulació del procés apoptòtic pot jugar un paper crucial en la patogènesi d'un gran nombre de malalties (Hetts, 1998). Concretament, s'ha descrit una important implicació d'aquest tipus de mort cel·lular en malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'AD (Eckert *et al.*, 2003).

A diferència de l'apoptosi, la mort necròtica, o més concretament, del procés anomenat "oncosis", es un procés que no requereix la participació activa de la cèl·lula (Majno i Joris, 1995), i es produeix per un dany cel·lular extern, com estímuls tipus hipòxia, isquèmia, infeccions virals o bacterianes i l'exposició a determinats agents corrosius. El procés necròtic es caracteritza per un inflament del nucli i del citoplasma, pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica i alliberació del contingut cel·lular produint una resposta inflamatòria, la qual indueix el fenomen necròtic a les cèl·lules veïnes.

2.1. Característiques de l'apoptosi

Les cèl·lules que pateixen una mort de tipus apoptòtic, exhibeixen determinats canvis morfològics característics, tals com condensació de la cromatina, fragmentació nuclear, embutllofament de la membrana plasmàtica, encongiment de la cèl·lula, condensació citoplasmàtica i formació de cossos apoptòtics. Durant aquest procés, els orgànuls i especialment la mitocòndria, romanen morfològicament intactes fins a estadis tardans. Així, les cèl·lules apoptòtiques són fagocitades per macròfags, evitant la inflamació que es dona en el procés necròtic.

Els primers estudis genètics sobre aquest tipus de mort es van realitzar en *Caenorhabditis elegans* (Ellis i Horvitz, 1986; Hengartner *et al.*, 1992), i es van identificar quatre gens implicats en l'apoptosi; *cgl-1*, *ced-3*, *ced-4* i *ced-9*. El clonatge d'aquests gens va revelar que codificaven per proteïnes homòlogues a proteïnes de mamífers, confirmant la conservació d'aquesta via de mort a través de l'evolució. D'una banda, la proteïna *ced-3* és molt similar a la cisteïna proteasa humana ICE/caspasa 1 (*interleukin 1 β converting enzyme*) (Yuan *et al.*, 1993), la proteïna *Ced-9* està relacionada amb la proteïna Bcl-2 humana (Hengartner i Horvitz, 1994), i l'homologa a *Ced-4* equival a l'Apaf-1 (factor activador de proteases) de mamífers (Zou *et al.*, 1997).

2.2. Caspases: executores principals de la mort apoptòtica

Encara que hi ha una gran varietat d'estímuls, tant intra com extracel·lulars, capaços d'induir apoptosi, la majoria de vies de transducció convergeixen en una via executora comú, activada per un tipus de cisteïna proteases anomenades caspases (*cysteine-aspartate-proteases*). Aquestes proteases estan altament conservades evolutivament i es caracteritzen per la seva especificitat per residus d'àcid aspàrtic com a substrat. S'ha considerat que són executores centrals de la via apoptòtica, ja que, en moltes ocasions, el seu bloqueig pot rescatar les cèl·lules del seu destí apoptòtic (Haunstetter i Izumo, 1998).

Les caspases es troben constitutivament expressades en la majoria de cèl·lules en forma de zimògens o proenzims, formats per tres dominis diferents; un domini N-terminal, una subunitat gran d'uns 20 KDa i una subunitat petita d'uns 10 KDa

(Nicholson i Thornberry, 1997). El precursor s'activa a través d'un trencament proteolític en les dues posicions on es troba l'àcid aspàrtic; entre el prodomini i la subunitat gran, i entre la subunitat gran i la subunitat petita. Així, aquest trencament dóna lloc a dues subunitats, les quals s'ensamblen per formar un heterodímer. La unió de dos heterodímers dóna lloc a un heterotetràmer amb dos llocs catalítics (Thornberry i Lazebnik, 1998). Conseqüentment, el processament de proenzims per trencament en residus consens implica que les caspases poden activar les seves pròpies procaspases o altres procaspases, resultant en un efecte amplificador de la cascada proteolítica (Cohen *et al.*, 1997).

Tot i que la família de les caspases comparteix una estructura comú, els anàlisis filogenètics han demostrat l'existència de subfamílies que presenten diferents característiques, les quals donen lloc a diferents funcions en el procés apoptòtic (Lincz, 1998). Així doncs, la família de les caspases es pot dividir en 3 grups: les caspases implicades en el processament de citocines (caspases -1, -4, -5, -11, -13 i -14), les caspases iniciadores (*upstream caspases*) (caspases -2,-8,-9,-10 i -11), les quals presenten prodominis funcionals que permeten l'associació d'aquestes molècules amb complexes de senyalització, i les caspases executores (*downstream caspases*) (caspases-3, -6, -7), les quals són capaces d'activar les caspases dels grups anteriors.

En resposta als senyals apoptòtics, proteïnes adaptadores específiques s'uneixen al prodomini regulador N-terminal de les caspases iniciadores. S'han identificat dos tipus de prodominis: el domini CARD (*caspase recruitment domain*) i el DED (*death effector domain*). Les interaccions entre els prodominis de les caspases i les proteïnes adaptadores acosten les procaspases entre elles i promouen l'agregació i el processament (Salvesen i Dixit, 1999). Les caspases iniciadores activen, d'una manera directa o indirecta, les caspases efectores, les quals proteolititzen varies proteïnes estructurals i reguladores. Entre el gran nombre de substrats de les caspases efectores es troben el factor de fragmentació del DNA, DFF (*DNA Fragmentation Factor*) (Liu *et al.*, 1997), la proteïna PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*), implicada en la reparació del dany del DNA (Kaufmann *et al.*, 1993), i el factor iCAD (*inhibitor of CAD*), permetent així l'activació de CAD (Caspase Activated Dnase) (Sakahira *et al.*, 1998) i la conseqüent fragmentació del DNA. Per altra banda, les caspases efectores també

proteolitzen laminines nuclears que provoquen l'encongiment nuclear i proteïnes del citoesquelet que condueixen a la pèrdua de la forma cel·lular (Hale *et al.*, 1996).

2.3. Principals vies apoptòtiques

Clàssicament, les principals vies apoptòtiques s'han dividit segons l'origen de l'estímul apoptòtic. Les vies més estudiades han estat; en primer lloc, una via que implica la unió dels receptors de mort (*Death Receptors*) al seus lligands (Yuan *et al.*, 1997), anomenada via extrínseca, i per altra banda, una via on diferents tipus d'estrès cel·lular (deprivació de factors tròfics, dany al DNA, toxines...) porten a l'alliberació per part de la mitocòndria de proteïnes que desencadenen la resposta apoptòtica (Desagher i Martinou, 2000), anomenada com la via intrínseca.

Recentment, s'ha posat especial atenció en altres vies que poden participar en el procés apoptòtic. Aquest és el cas del senyal apoptòtic que s'inicia al reticle endoplasmàtic (RE), el qual es pot activar a través de condicions que comprometin el mal plegament de proteïnes al RE o alteracions en l'homeòstasi del Ca^{+2} , i desencadenar així, l'anomenat estrès de reticle endoplasmàtic. Per a superar aquest estrès, l'RE respon activant vies de senyalització específiques, entre elles, l'anomenada UPR (*Unfolded Protein Response*) (Rao *et al.*, 2004). Com en el cas de la mitocòndria, al RE es troben associades varies molècules pro-apoptòtiques i anti-apoptòtiques, com proteïnes de la família de Bcl-2, suggerint que podrien estar implicades en la regulació de la homeòstasi de Ca^{+2} i el procés apoptòtic al RE (Scorrano *et al.*, 2003). Altres processos involucrats en la mort apoptòtica iniciada al RE impliquen l'activació de la caspasa-12 i del seu possible ortòleg humà, la caspasa-4 (Hitomi *et al.*, 2004).

2.3.1. Via extrínseca

Aquesta via implica la participació de procaspases que contenen el domini DED, les quals s'activen per la unió de lligands extracel·lulars als receptors de mort a la superfície cel·lular, com és el cas de la caspasa-8. Alguns d'aquests receptors pertanyen a la superfamília del receptor TNF-R (*Tumor Necrosis Factor-Receptor*), que posseeixen dominis extracel·lulars rics en cisteïna i una seqüència citoplasmàtica coneguda com el domini de mort (*Death Domain*) (Chinnaiyan *et al.*, 1996).

Un dels receptors més ben caracteritzat és el CD95/Fas/Apo-1 (Kroemer *et al.*, 1995). La unió del lligand Fas (*Fas-L*) al seu receptor causa l'oligomerització del receptor i el subseqüent reclutament de la proteïna adaptadora FADD (*Fas Associated Death Domain*), la qual s'uneix a la procaspasa-8, induint la seva activació (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Un cop activades les caspases iniciadores, aquestes proteolitzen i activen les caspases efectores, com la caspasa-3.

2.3.2. Via intrínseca

Aquesta via pot ser activada per diferents estímuls tant intra com extracel·lulars sense la necessitat de receptors de mort. Les diferents senyals de transducció que activen aquesta via convergeixen a la mitocòndria, la qual juga un paper primordial en l'activació de proteïnes clau d'aquest procés. En aquest cas, l'estímul apoptòtic implica un dany mitocondrial, com la disrupció de la membrana externa i la pèrdua del potencial de membrana mitocondrial. Una conseqüència crucial d'aquest procés és l'alliberament de citocrom *c* des de l'espai intermembranal de la mitocòndria al citosol. Una vegada al citosol, el citocrom *c* es pot associar amb Apaf-1 en presència d'ATP (Zhou *et al.*, 1999), permetent la seva oligomerització i el subseqüent reclutament de la procaspasa-9, per formar un complex anomenat apoptosoma (Srinivasula *et al.*, 1998). L'apoptosoma, a la seva vegada, recluta i activa les caspases efectores, com la caspasa -3 i -7.

El mecanisme pel qual el citocrom *c*, entre d'altres factors proapoptòtics, s'allibera a la mitocòndria ha sigut objecte de controvèrsia en els darrers anys. La primera hipòtesi al respecte va ser associar el col·lapse de la membrana interna mitocondrial i la caiguda del potencial de membrana, degut a l'obertura de porus de permeabilitat transitoris, PTP (*Permeability Transient Porus*), amb la sortida del citocrom *c* de la mitocòndria (Kroemer i Reed, 2000). Donat que recents estudis han demostrat que l'alliberament de citocrom *c* es podia produir en absència de despolarització mitocondrial i sense una pèrdua de la integritat de membrana, s'ha suggerit un mecanisme més selectiu de sortida de proteïnes des de la mitocòndria, com la formació d'un porus específic a la membrana mitocondrial externa, anomenat MAC (*Mitochondrial Apoptosis-induced Channel*) (Dejean *et al.*, 2005a). Tot i que no està completament definida la identitat molecular del MAC, sembla ser que un dels seus components seria un complex oligomèric de proteïnes Bax (Dejean *et al.*, 2005b). Tanmateix, no es pot descartar que

l'activació de MAC i l'obertura de PTP siguin processos paral·lels, actuant en el reclutament de Bax a la mitocòndria i maximitzant l'alliberament de citocrom c al citosol (De Giorgi *et al.*, 2002).

Cal esmentar que l'alliberament de citocrom c existeix com a conseqüència de quasi tots els processos apoptòtics. Tanmateix, en molts casos, es dona com a un procés tardà. De fet, s'ha descrit que els receptors de mort també poden induir indirectament l'alliberament de citocrom c a través de l'activació de la procaspasa-8 i la fragmentació de la proteïna Bid, amplificant així, la senyal apoptòtica (Gross *et al.*, 1999).

Entre d'altres proteïnes que s'alliberen de la mitocòndria durant el procés apoptòtic es troba l'AIF (*mitochondrial intermembrane Apoptosis-Inducing Factor*) (Susin *et al.*, 1999). Sembla ser que l'AIF és un efector apoptòtic independent de caspases, que una vegada alliberat al citosol, viatjaria fins al nucli i participaria en la degradació del DNA. Per altra banda, una altra proteïna a destacar és l'Smac/DIABLO (*Second mitochondria-derived activator of caspase/ Direct IAP-binding protein with low pI*) (Hengartner, 2000), la qual és una proteïna que es troba segregada a la mitocòndria, però que en resposta a un estímul apoptòtic, s'allibera al citosol on pot unir-se a les proteïnes IAPs (*Inhibitor Apoptosis Protein*), neutralitzant així el seu efecte i desencadenant la resposta apoptòtica (Duckett, 2005).

2.4. Proteïnes reguladores de l'apoptosi

2.4.1. Família Bcl-2

Bcl-2 dona nom a tota una família de proteïnes homologues, les qual són elements clau en la regulació de l'apoptosi via mitocondrial. Totes elles comparteixen dominis molt conservats, anomenats com dominis BH (*Bcl-2 Homology Domain*), essencials per la seva activitat i la interacció entre proteïnes. Aquesta família de proteïnes consta de 20 membres (Gross *et al.*, 1999), els quals s'han dividit en dos grans grups segons un criteri funcional; les proteïnes amb activitat anti-apoptòtica, com Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 i A1, i les proteïnes amb una funció pro-apoptòtica, com Bax, Bak, Bok, Bcl-x_s, Bad, Bid, Bik/Nkb, Bim Krk i Mtd (Antonsson i Martinou, 2000).

Tot i les similituds estructurals, els membres d'aquesta família de proteïnes també es diferencien per la seva localització subcel·lular. La proteïna Bax es troba principalment al citosol en forma soluble, però en resposta a un estímul apoptòtic, es transloca a la mitocòndria, on s'insereix a la membrana externa, s'oligomeritza i es capaç de formar canals a la membrana mitocondrial (Antonsson *et al.*, 2001). Tot i que s'ha proposat que l'ancoratge a la membrana mitocondrial de membres de la família de Bcl-2, juntament amb altres proteïnes de la membrana externa mitocondrial, com la VDAC (*voltage-dependent anion channel*), podrien formar estructures canal que permetessin la sortida de proteïnes (Shimizu *et al.*, 1999), actualment sembla que el complex oligomèric de Bax, participant en l'estructura MAC (Dejean *et al.*, 2005a), formaria el canal pel qual s'alliberarien els factors proapoptòtics, com el citocrom *c*.

La proteïna Bcl-2 es troba exclusivament en membranes intracel·lulars, incloent la membrana mitocondrial externa, el RE i la membrana nuclear (Krajewski *et al.*, 1993). En canvi, Bcl-x_L es troba tant en membranes intracel·lulars com en forma soluble al citosol, la qual es transloca a la mitocòndria durant l'apoptosi (Hsu *et al.*, 1997). La sobreexpressió de Bcl-2 i Bcl-x_L protegeix les cèl·lules davant diferents estímuls apoptòtics. De fet, s'ha demostrat que la sobreexpressió de Bcl-2 inhibeix l'oligomerització de Bax (Mikhailov *et al.*, 2001) i l'activitat MAC (Dejean *et al.*, 2005b), i conseqüentment, l'alliberament de citocrom *c* al citosol.

2.4.2. Altres proteïnes reguladores de l'apoptosi

Entre les diverses proteïnes capaces de regular les diferents vies apoptòtiques, es troben les proteïnes IAPs. Són una família de proteïnes antiapoptòtiques que sembla ser que bloquegen la mort cel·lular a nivell mitocondrial inhibint directament determinades caspases específiques (Miller, 1999). Tot i així, estudis recents han suggerit que l'acció inhibidora de l'apoptosi de certes IAPs vindria preferentment donada per la unió a Smac/Diablo (Duckett, 2005).

Finalment, gens involucrats en processos de proliferació i diferenciació cel·lular són també importants en la modulació del procés apoptòtic. Així doncs, el proto-oncogen *c-myc* (Prendergast, 1999) i el gen supressor de tumors *p53* (Shaw *et al.*, 1992; Yonish-Rouach *et al.*, 1991) estan implicats en la inducció d'apoptosi en diferents condicions.

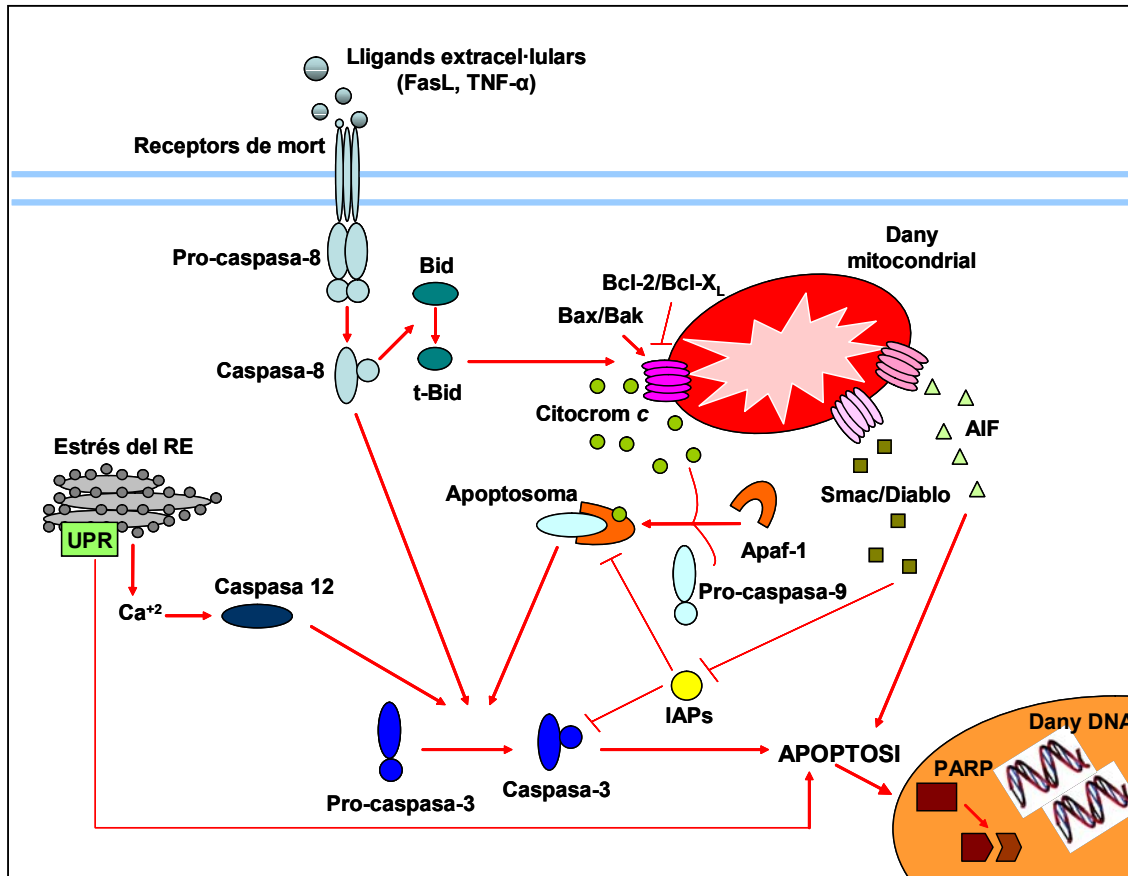


Figura 7. Esquema representatiu de les principals vies apoptòtiques i les diferents molècules implicades; la via extrínseca o associada a receptors de mort, la via intrínseca o associada al dany mitocondrial i la via induïda per l'estrés del reticle endoplasmàtic (RE).

3. Apoptosi en cèl·lules de múscul llis vascular

En el teixit vascular, com succeeix en molts d'altres teixits, s'ha demostrat que l'apoptosi de cèl·lules endotelials i de musculatura llisa és un procés fisiològic indispensable que permet la remodelació dels vasos sanguinis durant el desenvolupament (Cho *et al.*, 1995). Tot i així, també s'ha descrit que té un paper molt important en desordres vasculars o malalties associades a factors vasculars, com l'arteriosclerosi, hipertensió, restinosi i l'infart de miocardi (MacLellan i Schneider, 1997; Haunstetter i Izumo, 1998; Mallat *et al.*, 2000; Kumar i Jugdutt, 2003).

Fins al moment, s'han descrit un gran nombre d'estímuls diferents capaços d'induir apoptosi en cèl·lules de múscul llis vascular (VSMC; *Vascular Smooth muscle Cells*) en models *in vivo* o en cèl·lules en cultiu, presentant les mateixes característiques citològiques d'aquest tipus de mort cel·lular descrites per altres tipus cel·lulars (Haunstetter i Izumo, 1998).

Així doncs, s'ha descrit apoptosi en VSMC induïda per factors mecànics, com l'angioplastia amb baló (Pollman *et al.*, 1999; Perlman *et al.*, 1997) mediada per l'activació de proteïnes cinasa activades per estrès (SAPK, *Stress-activated protein kinase*) (Pollman *et al.*, 1999), per LDL oxidades (Jorjinge *et al.*, 1997) i oxisterols (Tang *et al.*, 2005), per citocines inflamatòries, virus i productes bacterians (Rakesh i Agrawal, 2005), com IFN- γ i TNF- α i/o IL-1 β (Geng *et al.*, 1996), així com per inhibidors de la PCK (*Protein Kinase C*), bloquejadors dels canals de calci i estimuladors de la proteïna cinasa dependent d'AMPc (Leszczynski *et al.*, 1994). Per altra banda, substàncies vasoactives com el NO (òxid nítric) o l'Angiotensina II, a nivells inflamatoris o patològics, promouen apoptosi en VSMC (Poolman *et al.*, 1996). En canvi, a nivells fisiològics, el NO té efectes anti-apoptòtics, prevenint l'activació de caspases (Dimmeler *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999), suggerint un paper important d'aquesta substància en la remodelació vascular durant el desenvolupament.

La producció i la resposta a espècies reactives d'oxigen s'ha associat a la proliferació i la inducció de mort cel·lular en VSMC. Per una banda, varies evidències demostren que el peròxid d'hidrogen intracel·lular pot actuar com a missatger secundari en resposta a diversos factors de creixement (Kunsch i Medford, 1999). Contràriament, l'H₂O₂ extracel·lular indueix apoptosi en aquest tipus cel·lular (Li *et al.*, 1997a; Li *et al.*, 1997b; Jin *et al.*, 2000) *in vitro*. Per tant, donat que a baixes concentracions l'H₂O₂ és capaç d'inactivar la cascada de caspases, mentre que a elevades concentracions indueix l'activació d'aquestes (Hampton i Orrenius, 1997), s'ha de tenir present l'efecte dual d'aquesta substància en la remodelació de vasos, així com en situacions patològiques o d'inflamació. Per la seva banda, l'anió superòxid, tot i que també és capaç d'induir proliferació cel·lular en certs models d'VSMC (Li *et al.*, 1997b), presenta un potent efecte apoptòtic quan s'indueix la seva producció intracel·lular en VSMC (Li *et al.*, 2002).

Les cèl·lules de múscul llis procedents de vasos cerebrals també s'han descrit que són susceptibles a l'acció de substàncies ROS. Així, l' H_2O_2 extracel·lular (Li *et al.*, 2003a) i el peroxinitrit (Li *et al.*, 2003b) s'han descrit que indueixen apoptosi en aquest tipus cel·lular, suggerint que les substàncies ROS, mitjançant la seva capacitat d'induir dany cel·lular a través de la peroxidació lipídica de membranes i el *cross-linking* de proteïnes i DNA, poden tenir un paper important en malalties vasculars cerebrals o desordres neurodegeneratius associats a la vasculatura.

III. LA MALALTIA D'ALZHEIMER ASSOCIADA A DESORDRES VASCULARS

1. Característiques principals de la malaltia d'Alzheimer

La malaltia d'Alzheimer (AD: *Alzheimer's Disease*) és un trastorn cerebral degeneratiu caracteritzat per la pèrdua progressiva de memòria i d'altres capacitats cognitives. Actualment, és la principal causa de demència senil i la seva incidència i prevalença s'incrementen quasi exponencialment amb l'envelliment (Barranco-Quintana *et al.*, 2005). A nivell anatomopatològic, es caracteritza per una atròfia del còrtex cerebral molt important, acompanyada per una disminució en el pes de la massa cerebral i un retall en els solcs i les circumvolucions del cervell. Les característiques microscòpiques més remarcables són la degeneració neuronal, la pèrdua sinàptica, els dipòsits anòmals de la proteïna β -amiloide (β A) i la formació de cabdells neurofibril·lars intraneuronals (Santacruz i Mahy, 2000). Els dipòsits insolubles de β A en parènquima, juntament amb l'acumulació d'altres proteïnes, microglia activada, astròcits fibril·lars, i neurites distròfiques, donen lloc a les anomenades plaques senils a nivell extracel·lular (Fig. 8A). Així mateix, el β A cerebral també es diposita en la *tunica media* i adventícia dels vasos leptomeningis i intracorticals (Fig. 8C). Per altra banda, el β A, mitjançant la mobilització i l'augment de calci intracel·lular, provoca la fosforil·lació de la proteïna microtubular TAU. La hiperfosforil·lació de TAU altera l'organització normal del citoesquelet donant lloc a l'aparició dels cabdells neurofibril·lars (Fig. 8B), procés que en darrera instància produeix la mort neuronal (Santacruz and Mahy, 2000).

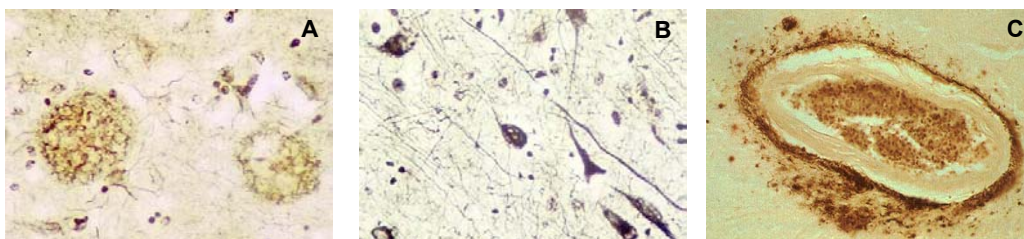


Figura 8. Seccions histopatològiques de cervells de pacients d'AD. **A.** Plaques senils extracel·lulars. **B.** Cabdells neurofibril·lars intraneuronals (www.neuropat.dote.hu/alzheim.htm). **C.** Dipòsits de β A en vasos cerebrals (www.psiquiatriageral.com.br/transtorno/alzheimer01.htm).

El pèptid β A procedeix de la proteïna precursora de l'amiloide (APP), la qual és una glicoproteïna de membrana que pateix un procés de proteòlisi mitjançant una sèrie de proteases específiques. Per una banda, el processament no amiloidogènic de l'APP és conseqüència de l'acció de l' α -secretasa, donant lloc a l'alliberament del fragment corresponent a l'extrem N-terminal soluble de l'APP (sAPP α), sense poder-se formar el pèptid β A sencer. Per altra banda, l'anomenada via amiloidogènica es basa en el processament de l'APP mitjançant l'acció de la β -secretasa, la qual talla la proteïna APP per donar lloc a una fracció carboxi-terminal soluble (sAPP β) i un fragment de membrana (C99), que esdevindrà el substrat de la γ -secretasa. El processament del C99 per la γ -secretasa generarà pèptids β A, majoritàriament de 40 aminoàcids, i en menor proporció de 42 i 43 aminoàcids (Fig. 9) (Xia, 2001; Sisodia i St George-Hyslop, 2002). Els pèptids β A generats formaran autoagregats que constituïran les fibres insolubles presents en els dipòsits amiloides.

Mentre que la β -secretasa s'ha identificat com una aspartil proteasa de membrana anomenada BACE (*β -site APP-Cleaving Enzyme*) (Vassar *et al.*, 1999), la identitat de la γ -secretasa s'ha associat a un complex format per diferents proteïnes; presenilina (PS), nicastrina (NCT), APH-1 (*anterior pharynx defective*) i PEN-2 (*presenilin enhancer*) (Edbauer *et al.*, 2003). La PS aportaria el centre actiu, la NCT estaria implicada en el reconeixement dels substrats, i la resta de proteïnes serien necessàries per l'assemblatge, l'estabilització i la maduració del complex (Steiner, 2005).

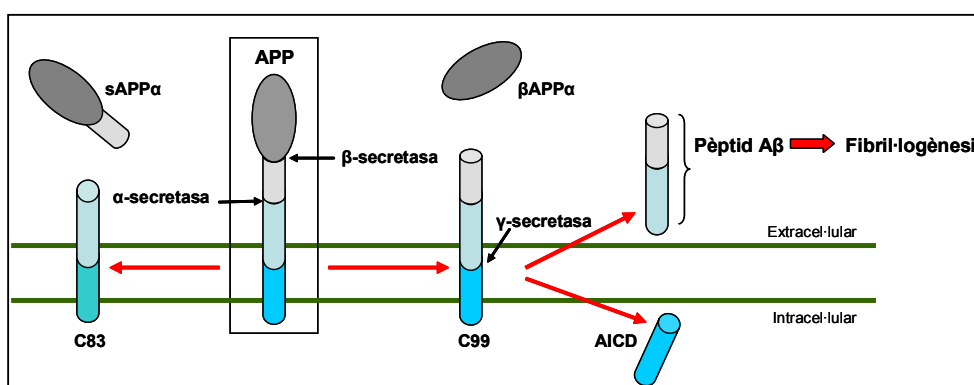


Figura 9. Processament de la proteïna APP mitjançant la α , β , γ -secretasa. Esquema basat en la representació de Gandy, 2005.

Les investigacions realitzades sobre els causants genètics de la malaltia d'AD continuen en curs, tot i que s'han descrit una sèrie de gens característics dels pocs casos d'Alzheimer familiar, casos en que la malaltia es manifesta d'una manera precoç. En primer lloc, s'han trobat varies mutacions en el gen que codifica per l'APP, localitzat en el cromosoma 21, així com mutacions en el gen que codifica per la proteïna presinilina 1 (PS1), localitzat al cromosoma 14, i mutacions en el gen que codifica per la presinilina 2 (PS2), localitzat al cromosoma 1. Totes aquestes mutacions estarien relacionades amb el processament de la proteïna APP, afavorint els dipòsits del pèptid β A (actualització de les mutacions de APP/PS1/PS2: www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/). Per tant, les mutacions en aquests gens estan directament implicades en la malaltia com a factors causals, però tot i així, de moment, tant sols un 10% dels casos d'AD corresponen a pacients amb una càrrega genètica completament identificable.

Per altra banda, la presència d'un determinat al·lel del gen que codifica per la apoproteïna E (ApoE), localitzat en el cromosoma 19, constitueix un important factor de risc a patir la malaltia. L'ApoE és una lipoproteïna plasmàtica que intervé en la recaptació i el transport de colesterol, triglicèrids i altres lípids. Concretament, el gen l'ApoE té tres al·lells diferents (ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4), essent l' ϵ 3 el més freqüent. Diferents estudis han pogut concloure que, en casos d'AD esporàdic, existeix un efecte depenent de la dosi gènica de l'al·lel ϵ 4, el qual es correlaciona amb un increment en el risc de patir la malaltia (Corder *et al.*, 1993; Saunders *et al.*, 1993). En canvi, sembla ser que la presència de l'al·lel ϵ 2 constituiria un factor de protecció contra la malaltia d'AD (Corder *et al.*, 1994). Existeixen un gran nombre d'estudis que intenten explicar la relació de l'ApoE amb l'AD, però fins al moment no s'han pogut esclarir els mecanismes pels quals les diferents isoformes de la proteïna poden incidir en aquest procés patogènic. Per una banda, s'ha descrit que l'ApoE és capaç d'unir el β A *in vitro* (Pillot *et al.*, 1999). A més, també s'ha descrit la possible capacitat de l'ApoE d'accelerar la formació de fibril·les amiloides a partir de la polimerització de β A i s'ha suggerit un paper important d'aquesta proteïna en la formació de plaques senils (Bales *et al.*, 1997).

2. Desordres vasculars associats a la malaltia d'AD

L'estudi de la patologia d'AD també inclou els desordres vasculars associats a la malaltia, ja que la majoria de pacients amb AD presenten dipòsits de β A en els vasos

cerebrals, fenomen conegut com angioptia amiloide cerebral (CAA), i degeneració de la microvasculatura (Jellinger, 2002). Concretament, s'han identificat nombroses anomalies a nivell estructural i funcional de la microvasculatura cerebral en AD (de la Torre i Mussivant, 1993). En la majoria de casos d'AD, es pot observar una disminució en la densitat vascular i una distorsió dels vasos, mostrant plegaments i enrotllaments (de la Torre i Mussivant, 1993). A més, canvis importants en l'endoteli i una davallada funcional de la barrera hematoencefèlica, també han estat descrits com a esdeveniments propis de pacients d'AD (Kalaria i Harik, 1989; Kalaria, 1992; Zlokovic, 2002).

Des de fa aproximadament 50 anys que es considera la malaltia d'AD com un desordre neurodegeneratiu seguint la classificació de demències de Roth (1955). Aquesta classificació distingia dos tipus de demència diferents; per una banda, la demència vascular (VD), originada per una lesió cerebrovascular, i per altra banda, la demència tipus AD, resultant d'un procés neurodegeneratiu. Tot i així, recents estudis epidemiològics, clínics, patològics i funcionals, han portat a diversos experts en aquest camp a qüestionar aquesta classificació (Kudo *et al.*, 2000; Grammas, 2000; Kalaria, 2002; de la Torre, 2002; Jellinger, 2002; Zlokovic, 2005). Molts d'aquests autors plantegen la possibilitat que la malaltia d'AD, en els casos on no existeix un origen genètic identificat, no sigui inicialment un desordre neurodegeneratiu sinó un desordre vascular amb posteriors conseqüències neurodegeneratives. Per una banda, existeix una important associació entre la davallada cognitiva en AD i els desordres cerebrovasculars associats (de la Torre, 2002). Així mateix, diferents estudis suggereixen que la demència causada exclusivament per factors vasculars és un fenomen molt poc freqüent. De fet, la majoria d'individus amb demència presenten lesions vasculars i característiques típiques d'AD, condició coneguda com a demència mixta (Kudo *et al.*, 2000). Un exemple és l'important estudi realitzat per Snowdon *et al.* (1997) a un grup de monges ancianes sanes i amb AD, conegut com *The Nun Study*, on es descriu com els individus amb lesions cerebrovasculars tendien a presentar trets de demència en els casos en els quals s'identificaven les característiques histopatològiques típiques de la malaltia d'AD.

Altres estudis, entre ells l'anomenat estudi de Rotterdam (Hofman *et al.*, 1997), mostren com diversos factors de risc vasculars poden ser els responsables de la davallada

cognitiva durant l'envelliment. Així, molts dels factors considerats de risc a patir la malaltia d'AD són també factors de risc de la demència vascular, tals com l'edat, l'aterosclerosi, la hipertensió, la diabetis, les lesions cerebrals, els nivells d'homocisteïna, factors trombogènics, malalties cardíaques i la presència de l'al·lel $\epsilon 4$ en el gen de l'ApoE (Strittmatter *et al.*, 1993; Gorelick, 2004; Casserly i Topol, 2004), tots ells suggerint un component vascular en la patogènesi d'aquesta malaltia neuronal. En aquest sentit, diversos estudis descriuen una estreta relació entre la malaltia d'AD, el metabolisme del colesterol i els hàbits alimentaris en general, ja que tant antioxidants, com fàrmacs que redueixen els nivells de colesterol, com les estatines, semblen ser teràpies significativament efectives a nivell epidemiològic (Poirier, 2005; Puglielli *et al.*, 2003; Raffai i Weisgraber, 2003).

En la recerca per trobar el mecanisme pel qual la degeneració microvascular pot causar o accelerar la degeneració neuronal observada en AD, s'han proposat diferents hipòtesis al llarg d'aquests darrers anys. Així per exemple, el grup de Grammas *et al.* suggereix l'existència d'un factor neurotòxic procedent de la vasculatura de malalts d'AD, com podria ser l'òxid nítric (NO), ROS, diverses citocines o d'altres factors desconeguts fins al moment, destacant la microcirculació cerebral com una nova font de dany neuronal (Grammas *et al.*, 1999). Tot i així, darrerament s'està posant especial atenció en l'estudi dels mecanismes de degradació i eliminació del βA a nivell de capil·lars cerebrals.

L'homeòstasi del βA cerebral està regulada per l'ApoE i ApoJ, per la degradació proteolítica del pèptid, i per la seva producció, agregació i oligomerització (Zlokovic, 2005). Per altra banda, el transport del pèptid βA soluble a través de la barrera hematoencefàlica es du a terme degut a proteïnes com RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) (Deane *et al.*, 2003) i LRP (*low-density Lipoprotein Receptor-related Protein*) (Shibata *et al.*, 2000; Deane *et al.*, 2004). S'ha descrit com la inhibició de les interaccions a través de RAGE inhibeix l'acumulació de βA al parènquima (Deane *et al.*, 2003), mentre que la baixa densitat de receptors LPR a la barrera hematoencefàlica en promou la seva acumulació (Deane *et al.*, 2004). Així, l'eliminació del βA a nivell vascular, i el seu transport a través de la barrera hematoencefàlica per cèl·lules dels capil·lars neurovasculars, es pot considerar com un factor crucial a l'hora de mantenir els nivells de βA cerebral (Zlokovic, 2005).

3. Angiopatia Cerebral β -Amloide

L'angiopatia cerebral amiloide (CAA) es caracteritza per dipòsits de proteïna amiloidogènica en vasos cerebrals leptomeningis i corticals. El tipus més comú de CAA és causat per la proteïna β -amiloide, però existeixen altres tipus de CAA causats pel dipòsit d'altres proteïnes com: ABri (*Amyloid-British protein*), ADan (*Amyloid-Danish protein*), PrP (*Prion Protein*), cistatina C, gelosina, entre d'altres (Yamada, 2000). En aquest treball ens referirem únicament a l'angiopatia cerebral causada per dipòsits β -amiloide, donat que està particularment associada a la malaltia d'AD.

3.1. Característiques principals de CAA

Els dipòsits d'amiloide vascular es troben principalment a la *tunica media* i adventícia de vasos leptomeningis i corticals, així com en capil·lars cerebrals (Vinters *et al.*, 1988). El CAA afecta principalment al lòbul occipital, mentre que és menys freqüent en àrees com l'hipocamp, el cerebel o els ganglis basals. Tot i que el CAA és un tret neuropatològic comú de l'envelliment, té una prevalença de l'ordre del 90% en casos d'AD (Jellinger, 2002).

Una característica important del CAA és la degeneració de les cèl·lules de les parets vasculares. Diversos estudis ultraestructurals i immunohistoquímics han demostrat la degeneració de cèl·lules endotelials, pericits (Wisniewski *et al.*, 1992) i cèl·lules de múscul llis (Kawai *et al.*, 1993) en aquells vasos afectats pels dipòsits de β A. Donat que les cèl·lules endotelials estan implicades en el manteniment de la barrera hematoencefàlica, la degeneració d'aquestes cèl·lules en vasos pot comportar la seva disfunció local en CAA i AD.

L'origen del β A en CAA, i el mecanisme pel qual es diposita en vasos, no està del tot esclarit, tot i que la teoria més acceptada fins al moment es basa en l'origen neuronal del β A. Les cèl·lules vasculares expressen APP i poden produir β A *in vivo* i *in vitro* (Davis-Salinas *et al.*, 1995), però estudis en animals transgènics amb una sobreexpressió d'APP sota el promotor neuronal Thy-1 mostren com aquests ratolins desenvolupen severa CAA (Calhoun *et al.*, 1999; Van Dorpe *et al.*, 2000), suggerint un origen neuronal d'aquest desordre vascular. El β A produït en neurones podria ser

transportat a la vasculatura a través del drenatge intersticial, amb la consegüent internalització en cèl·lules de múscul llis o acumulació en les parets del vas. Aquest fenomen seria la causa de la degeneració cel·lular vascular i la disfunció de la barrera hematoencefàlica, provocant a la seva vegada, una acumulació addicional de β A perifèric. Tot i així, no es pot descartar la contribució del β A generat en cèl·lules vasculares, el qual s'ha demostrat que té un paper rellevant en els dipòsits de β A en vasos cerebrals en cultiu (Mazur-Kolecka *et al.*, 2004). A més, el deteriorament vascular i l'envelliment, entre d'altres riscos vasculares, també serien factors que accelerarien els dipòsits de β A. Així, tot aquest procés seria el responsable dels canvis en el flux sanguini cerebral, provocant canvis vasculares secundaris, com l'engruiximent dels vasos i possibles hemorràgies cerebrals observades en pacients amb CAA (Rensink *et al.*, 2003).

3.2. Mutacions i factors de risc genètic implicats en CAA

Diferents mutacions en el gen de l'APP són responsables de CAA severa. Com s'ha vist anteriorment, mutacions en aquest mateix gen donen lloc a AD familiar, però sorprenentment, les mutacions relacionades amb la CAA són aquelles que es troben dins la regió del domini β A del gen, contràriament a les que es troben en regions que flanquegen aquest domini (Fig. 10).

Dins d'aquestes mutacions trobem la mutació Dutch que dona lloc a la malaltia anomenada HCHWA (*Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis*). L' HCHWA és un desordre autosòmic dominant causat per la mutació resultant de la substitució d'una glutamina per un residu d'àcid glutàmic a la posició 22 de la seqüència del β A en el gen de l'APP (Levy *et al.*, 1990; Van Broeckhoven *et al.*, 1990). Es caracteritza per importants dipòsits de β A en vasos leptomeningis i corticals, així com la presència de certes plaques difoses de β A en parènquima, en canvi, són absents característiques típiques de la malaltia d'AD, com plaques senils madures i cabdells neurofibril·lars. Pràcticament tots els pacients afectats de HCHWA mostren símptomes de demència i desenvolupen hemorràgies i infarts cerebrals, donant lloc a una mort en edat primerenca (Bornebroek *et al.*, 1996).

Altres mutacions descrites en el gen de l'APP i que donen lloc a CAA i lesions vasculars són: la mutació *Flemish* A21G (Hendriks *et al.*, 1992), *Italian* E22K (Tagliavini *et al.*, 1999), *Iowa* D23N (Grabowski *et al.*, 2001), *Arctic* E693G (Nilsberth *et al.*, 2001) (Fig. 10). La majoria d'aquestes mutacions impliquen canvis en la càrrega de l'aminoàcid, fet que suggereix una funció específica d'aquests residus en els efectes biològics del β A i el seu dipòsit en la paret dels vasos cerebrals.

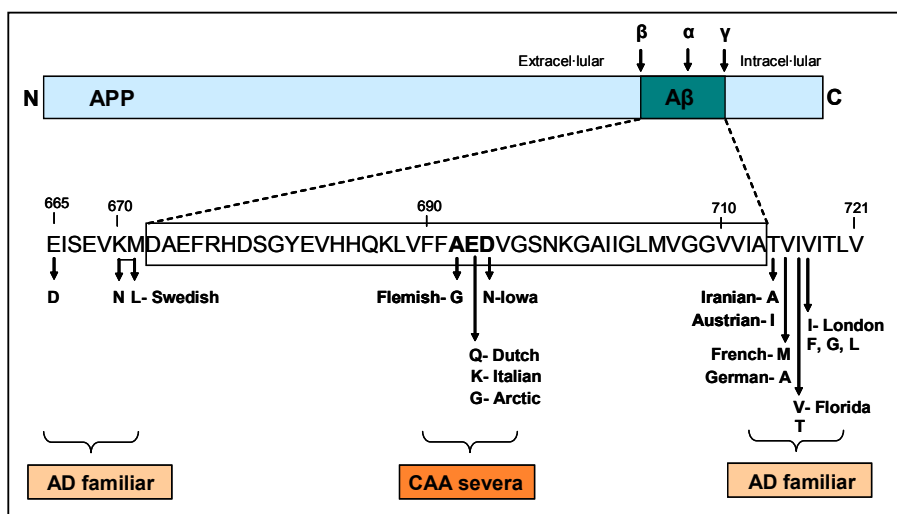


Figura 10. Esquema de les mutacions descrites en el gen APP que donen lloc a CAA i AD familiar. Representació basada en l'esquema de Rensink *et al.*, 2003.

Altres mutacions relacionades amb CAA han estat mutacions puntuals trobades en els gens de les presenilines, com la mutació L282V en PS1 i N141I en PS2. Tot i que aquestes mutacions donen lloc a AD familiar, cal remarcar que presenten severa CAA, tot i que no necessàriament són la causa d'aquest desordre vascular (Rensink *et al.*, 2003). Per altra banda, tal i com succeeix en la malaltia d'AD, la presència de l'al·lel ϵ 4 del gen de l'ApoE també és un factor de risc a patir CAA i hemorràgies associades a CAA (Greenberg *et al.*, 1995). Així mateix, també s'ha descrit que la presència de l'al·lel ϵ 2 d'aquest gen aniria igualment associat a hemorràgies associades a CAA (Greenberg *et al.*, 1998b).

3.3. Models *in vitro* de CAA

Diferents models *in vitro* han permès l'estudi dels mecanismes patogènics pels quals els dipòsits de β A donen lloc a la degeneració de cèl·lules vasculares. Aquests models inclouen el cultiu de pericits de cervell humà (HBP; *Human Brain Pericytes*) (Verbeek *et al.*, 1997), de cèl·lules de múscul llis provinents de vasos leptomeníngis humans (HLSCM; *Human Leptomeningeal Smooth Muscle Cells*) (Van Nostrand *et al.*, 1994) i de microvasos de cervell humà (Wang *et al.*, 2000), així com de cèl·lules endotelials (Eisenhauer *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002).

En el cas de la malaltia CAA, s'ha descrit com els dipòsits de β A en els vasos donen lloc a una degeneració de les cèl·lules de musculatura llisa d'aquest teixit (Coria *et al.*, 1989). En aquest sentit, en estudis en cultiu de HLSCM, es pot observar com el fragment soluble del pèptid β A (β A_{1→42}) és capaç de produir una extensa degeneració cel·lular acompanyada per un augment en els nivells cel·lulars de la proteïna APP i de la forma extracel·lular soluble del pèptid β A (Davis-Salinas i Van Nostrand, 1995). S'ha descrit però, que la forma mutada del pèptid (contenint la mutació E22Q; HCHWA-D) D β A_{1→40} provoca efectes més patogènics sobre la cèl·lula que la forma salvatge soluble β A_{1→42}, tant en HLSCM (Davis i Van Nostrand, 1996), com en HBP (Verbeek *et al.*, 1997). En aquest sentit, cal assenyalar que aquestes dades concorden amb el fet que els dipòsits de CAA i HCHWA-D estan formats majoritàriament pel tipus β A_{1→40} (Castaño *et al.*, 1996). Concretament, s'ha descrit com la forma patogènica HCHWA-D β A_{1→40}, que no forma fibril·les espontàniament en solució, és capaç de formar-les sobre la superfície de les cèl·lules HLSCM (Van Nostrand *et al.*, 1998). La formació de fibril·les, per part de les formes més patogèniques del pèptid β A, dona lloc a una acumulació de APP soluble (sAPP α) (Van Nostrand *et al.*, 2002), i aquesta cascada de processos serà determinant per induir el tipus de mort apoptòtica descrita en aquest model (Davis *et al.*, 1999).

Cal tenir en compte el diferent comportament del pèptid β A en cèl·lules HLSCM i HBS, comparativament a l'extens efecte neurotòxic descrit per aquest pèptid. En cultius neuronals, a diferència del cultiu de cèl·lules vasculares de musculatura llisa, cal que el β A hagi estat prèviament agregat formant fibril·les per tal de produir efectes neurotòxics (Howlett *et al.*, 1995). Per altra banda, diversos autors han descrit l'important paper de

l'estrès oxidatiu en la degeneració neuronal induïda per β A (Behl, 1997; Butterfield *et al.*, 1999). En canvi, tant en pericits com en cèl·lules de múscul llis, sembla ser que aquest tractament no induïx la producció de radicals lliures (Jung i Van Nostrand, 2002) i la coincubació amb antioxidants no té cap efecte sobre la toxicitat induïda pel β A en aquests tipus cel·lulars (Jung i Van Nostrand, 2002; Rensink *et al.*, 2002; Mok *et al.*, 2002). Així doncs, totes aquestes dades suggereixen que el mecanisme de toxicitat induït per β A és un procés diferent en cèl·lules musculars cerebrovasculars o en neurones, fet que podria explicar la diferència observada en els dipòsits de β A en vasos cerebrals i en parènquima.

En el cas de la toxicitat del pèptid β A en cèl·lules endotelials, diferents estudis també han descrit com la mutació HCHWA-D del pèptid β A₁₋₄₀, soluble o prèviament agregat, incrementa la toxicitat en aquest tipus cel·lular (Eisenhauer *et al.*, 2000; Miravalle *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002). Així mateix, s'ha observat que aquesta forma mutada del pèptid forma agregats sobre la superfície de la cèl·lula endotelial (Eisenhauer *et al.*, 2000), tal i com està descrit pel HLSMC i HBS. Una diferència molt important respecte la toxicitat induïda pel β A en cèl·lules endotelials és la capacitat de revertir la degeneració cel·lular a través d'antioxidants (Blanc *et al.*, 1997), com la vitamina E (Muñoz *et al.*, 2002), suggerint una important contribució de l'estrès oxidatiu en aquest tipus de mort.

3.4. Models animals de CAA

Diversos models animals han estat utilitzats per l'estudi de CAA. Així, tant gossos com primats no humans s'ha descrit que desenvolupen CAA amb l'envelliment (Walker, 1997). Malgrat tot, els models de ratolins transgènics (Tg) són els models animals més utilitzats per l'estudi d'aquest desordre.

En aquest sentit, cal esmentar dos models d'animals transgènics utilitzats per l'estudi de la malaltia d'AD, els quals van desenvolupar una severa CAA. Així doncs, el ratolí Tg APP23, el qual sobreexpressava la proteïna APP portant la doble mutació *Swedish* sota el promotor neuronal Thy-1 (Calhoun *et al.*, 1999), i el ratolí Tg APP/Ld, sobreexpressant l'APP humà amb la mutació *London* sota el promotor Thy-1 (Van Drome *et al.*, 2000), mostraven plaques amiloides en parènquima similars a les descrites en pacients d'AD. Però per altra banda, aquests ratolins també desenvolupaven CAA,

preferentment en arterioles i capil·lars, suggerint que la producció de β A neuronal era suficient per generar dipòsits fibril·lars a nivell de vasculatura.

Recentment, s'han generat ratolins transgènics específics per l'estudi de CAA. En primer lloc, es va publicar la generació de línies de ratolins Tg-SwDI, els quals sobreexpressaven l'APP humana amb la doble mutació vasculotrópica *Dutch/Iowa* i la mutació *Swedish* sota el control del promotor neuronal de ratolí Thy1.2 (Davis *et al.*, 2004). Les mutacions *Dutch/Iowa* E693Q/D694N produeixen el doble mutant del pèptid β A *Dutch/Iowa* E22Q/D23N en cervell, i per la seva banda, la mutació *Swedish* K670N/M671L en aquest gen, potencia el processament de l'APP i la producció de pèptid β A. Aquests ratolins Tg, tot i no presentar nivells elevats d'APP humana, es caracteritzen per mostrar una severa acumulació de β A fibrilar microvascular, especialment a nivell de tàlam i subiculum. A part de l'acumulació de β A en vasos, també presenten plaques difuses de β A en parènquima, tal i com està descrit en pacients amb HCHWA-D. Així mateix, els Tg-SwDI mostren trets neuroinflamatoris, com la presència d'astròcits i microglia reactiva associada a microvasos amb dipòsits de β A fibril·lar i un augment significatiu en els nivells de IL-1 β cerebral (Miao *et al.*, 2005). No obstant, cal esmentar que aquest model experimental no reproduïx completament tots els efectes patològics observats en pacients amb CAA, probablement degut a que la triple mutació en l'APP sobreexpressat no representa cap de les situacions descrites en humans.

A diferència d'altres models de ratolins Tg, on es requeria una sobreexpressió de l'APP i un major processament d'aquest per tal de mostrar CAA en edat avançada, els ratolins Tg-SwDI presenten dipòsits de β A en vasos més prematurament (al voltant dels 6 mesos d'edat) (Davis *et al.*, 2004). Aquests resultats demostren que la sobreexpressió de l'APP no és necessària per l'acumulació de β A en cervell de ratolí, i suggereixen que, mentre el pèptid β A salvatge és transportat ràpidament del cervell al plasma, el doble mutant *Dutch/Iowa* es diposita principalment en vasos. Una possible explicació és la seva inefectivitat en creuar la barrera hematoencefàlica en capil·lars (Davis *et al.*, 2005), probablement degut a les propietats altament fibril·logèniques del pèptid β A *Dutch* i *Iowa* (Van Nostrand *et al.*, 2001).

Un altre molt bon model animal de CAA ha estat creat per Herzig *et al.*, 2004. En aquest cas, els ratolins Tg sobreexpressen l'APP amb la mutació *Dutch* sota el promotor neuronal Thy 1.2. En aquest cas, l'aparició de dipòsits de β A es dona en edats més avançades (als 23 mesos) que en els ratolins Tg-SwDI, però resulta ser un model més pròxim a la patologia humana de HCHWA-D, ja que s'observen importants dipòsits de β A sobretot en vasos leptomeningis i corticals associats a la degeneració de cèl·lules de múscul llis. Altres característiques que el fan un bon model de HCHWA-D són la presència de certes plaques difoses de β A en parènquima i la reacció neuroinflamatòria com a conseqüència dels dipòsits de β A en vasos.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

A partir d'estudis anteriors del nostre grup de recerca, en els quals es descrivia la presència de la proteïna SSAO (*Semicarbazide Sensitive Amino Oxidase*) en vasos cerebrals (Castillo *et al.*, 1998), el primer objectiu d'aquest treball ha estat caracteritzar l'expressió i l'activitat de la SSAO en aquest sistema, tant en condicions fisiològiques com patològiques.

El nostre estudi s'ha basat en la possible contribució d'aquest enzim en la malaltia d'Alzheimer. La vinculació dels desordres vasculars associats a la malaltia d'AD, la important prevalença d'Angiopatia Cerebral Amiloide (CAA) i la degeneració microvascular (Kudo *et al.*, 2000; Grammas, 2000; Kalaria, 2002; de la Torre, 2002; Jellinger, 2002; Zlokovic, 2005), així com la contribució de l'estrès oxidatiu, la peroxidació lipídica i la formació de productes AGE en aquesta malaltia (Behl, 1997; Markesbery i Carney, 1999; Vardarajan *et al.*, 2000; Gibson i Huang, 2005), han portat a suggerir un possible paper de la SSAO en AD. En aquest sentit, la SSAO és un enzim que s'expressa en cèl·lules vasculars i l'oxidació dels seus substrats genera productes potencialment tòxics. Així doncs, l'alteració dels seus nivells d'expressió i activitat poden contribuir a un augment de l'estrès oxidatiu i l'entrecreament proteic i lipídic en malalties associades a desordres vasculars, com la patologia d'AD amb CAA. Per tant, un dels objectius principals d'aquest treball ha estat l'anàlisi de la possible alteració de la SSAO cerebrovascular en pacients d'AD amb CAA respecte casos control.

Per altra banda, donat que s'ha descrit l'augment dels nivells de la forma soluble de la SSAO en plasma de pacients amb certes malalties (Boomsma *et al.*, 2003), moltes d'elles vinculades a desordres vasculars, un altre dels objectius d'aquest treball ha estat estudiar la possible alteració d'aquesta proteïna en plasma de malalts d'AD. D'aquesta manera, també s'ha intentat establir una possible relació entre les alteracions de la SSAO lligada a membrana vascular i la forma plasmàtica en aquesta malaltia.

Per tal de poder suggerir una possible contribució de la SSAO en el dany cel·lular associat a CAA, un altre dels objectius d'aquest treball ha estat demostrar que l'oxidació

de certs substrats de la SSAO, i concretament els productes de la seva catàlisi, són capaços d'induir citotoxicitat en un model de cèl·lules de musculatura llisa *in vitro*. Aquest objectiu s'ha plantejat en dues etapes; en primer lloc, s'ha estudiat l'efecte de l'oxidació d'un dels substrats endògens de la SSAO, la metilamina, per acció de l'enzim soluble, i en segon lloc, per efecte de l'enzim associat a la membrana cel·lular. Donat que les cèl·lules de múscul llis en cultiu perden l'expressió de la proteïna present *in vivo*, per portar a terme aquesta segona part de l'estudi ha calgut generar línies cel·lulars que expressin establement la proteïna SSAO/VAP-1 humana.

Paral·lelament, i en el context de la recerca dels mecanismes moleculars pels quals la SSAO es pogués veure alterada en la malaltia d'AD associada a CAA *in vivo*, s'ha intentat estudiar l'implicació d'aquest enzim en un model de CAA *in vitro*, en cèl·lules de musculatura llisa cerebral (Davis i Van Nostrand, 1995). També s'ha estudiat la possible alteració de l'expressió de la SSAO en un model d'animal transgènic amb característiques de CAA (Davis *et al.*, 2004).

Per últim, un altre dels objectius principals d'aquest treball ha estat estudiar la modulació de les diferents formes de la SSAO, ja que la seva regulació pot ser un punt clau a l'hora d'entendre la funció d'aquest enzim tant en situacions fisiològiques com patològiques. Concretament, i com una continuació de treballs previs del nostre del nostre grup de recerca (Dalfó *et al.*, 2003), el nostre estudi s'ha centrat en el fenomen d'activació de l'activitat SSAO per un component del plasma humà.

En resum, els objectius d'aquest treball es poden sintetitzar en els punts següents:

- 1) Estandardització d'un mètode de preparació de microvasos i meninges humanes per tal d'obtenir preparacions altament pures amb un elevat rendiment en quant als nivells de proteïna SSAO.
- 2) Caracterització bioquímica i immunohistoquímica de la SSAO del sistema cerebrovascular humà, tant en situacions fisiològiques com en pacients amb la malaltia d'AD associada a CAA.

- 3) Estudi de la possible alteració de la SSAO soluble present en el plasma humà de pacients amb diferents graus de severitat d'AD.
- 4) Estudi de l'efecte de l'oxidació de substrats catalitzats per la SSAO soluble en models cel·lulars de múscul llis en cultiu, tals com la línia cel·lular A7r5 i el cultiu primari de cèl·lules de múscul llis procedents d'aorta humana. Així mateix, caracteritzar el tipus de mort cel·lular i estudiar l'expressió i l'activació de certs marcadors apoptòtics. Per altra banda, utilitzant aquest mateix model cel·lular, estudiar l'efecte directe dels productes catalítics de la SSAO; formaldehid, peròxid d'hidrogen i amoni, i caracteritzar el tipus de mort cel·lular induïda per aquests.
- 5) Generació de línies cel·lulars de múscul llis (A7r5) que expressin establenent la proteïna SSAO/VAP-1 humana, per tal d'estudiar l'efecte de l'oxidació de la metilamina per l'acció catalítica de la SSAO lligada a membrana.
- 6) Estudi de la possible implicació de la SSAO en un model cel·lular *in vitro* de CAA, basat en la inducció de mort apoptòtica pel pèptid β -amiloide contenint la mutació *Dutch* (HCHWA) en cèl·lules de múscul llis procedents de vasos leptomeningis humans.
- 7) Estudi de la possible alteració de l'expressió SSAO en un model d'animal transgènic de CAA, basat en la sobreexpressió neuronal de la proteïna APP humana contenint les mutacions *Swedish*, *Dutch*, *Iowa*.
- 8) Estudi del fenomen d'activació, induït per un component del plasma humà, sobre l'activitat SSAO i cerca de possibles entitats moleculars, presents en plasma, candidates a regular l'activitat SSAO *in vitro*.

MATERIAL I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. Tipus cel·lulars

En aquest treball s'han utilitzat diferents tipus cel·lulars de musculatura llisa. En primer lloc, s'ha treballat amb la línia cel·lular A7r5 procedent d'aorta de rata. Paral·lelament, s'han estandarditzat diferents cultius primaris a partir de teixits humans, tals com el cultiu de cèl·lules de múscul llis procedents d'aorta humana (HASMC; *Human Aortic Smooth Muscle Cells*) i procedents de vasos leptomeníngis cerebrals humans (HLSMC; *Human leptomeningeal Smooth Muscle Cells*).

1.1.1. Línia cel·lular A7r5

La línia cel·lular A7r5 és una línia de cèl·lules de musculatura llisa procedents d'aorta de rata (*Rattus norvegicus*), la qual es va obtenir de l'ATCC (The American Type Culture Collection). Són cèl·lules adherents i amb una morfologia típica de fibroblasts. Aquesta línia cel·lular creix normalment en medi *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamina (Gibco BRL) i 10% de sèrum fetal boví (FCS, Gibco BRL) en una atmosfera de 95% aire/ 5% CO₂ a 37°C. La taxa de subcultiu és de 1:3-4 cada setmana, canviant el medi cada 2-3 dies, i es recomana treballar amb aquesta línia fins al passatge 30.

1.1.2. HASMC: Cèl·lules de musculatura llisa d'aorta humana

L'estandardització d'aquest cultiu primari s'ha realitzat seguint el mètode per explants prèviament descrit (Ross *et al.*, 1980). Les aortes humanes es van obtenir gràcies al Servei de Trasplantaments de l'Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona.

1.1.2.1. Protocol d'obtenció del cultiu d'HASMC

Sota una campana de flux estèril, es talla una part d'aorta d'una llargada de 5 cm aproximadament i es renta generosament amb PBS estèril (50 ml PBS 10X (Sigma-Aldrich), 10 ml glucosa al 30%, 10 ml mescla antibiòtica: penicil·lina 1000 U/ml i estreptomicina 10 mg/ml (PAN Biotech) i 430 ml d'aigua miliQ). Amb unes tisores de dissecció s'obre l'aorta per la meitat i amb l'ajuda d'una espàtula es rasca i es descarta la capa *intima* endotelial. Amb unes pinces es separa la capa corresponent a la *tunica media* de la resta, i a continuació, es reserva en una placa de 100 mm de diàmetre amb una mica de medi complet de creixement (DMEM, 10% sèrum fetal boví, 2 mM glutamina, 50 unitats/ml de penicil·lina, 0.05 mg/ml estreptomicina). Amb l'ajuda d'un bisturí, es talla la capa de múscul llis fent quadrats petits de 0.5 cm² aproximadament (explant) i es van col·locant separadament en un flasc de 75 cm² buit (uns 30 explants per flasc). És important assegurar-se que la cara més interna és la que queda enganxada al plàstic del flasc. Com que el teixit està lleugerament humit de medi, els diferents explants de teixit queden enganxats i suficientment separats uns dels altres dins el flasc. A continuació, es gira el flasc cap per avall, s'afegeixen 5 ml de medi complet i, en aquesta posició, es diposita el flasc dins l'incubador (en una atmosfera de 95% aire/ 5% CO₂ a 37°C). Al dia següent, es gira el flasc amb molta cura, de manera que el teixit queda lleugerament cobert de medi. Es deixa el flasc dins l'incubador, i al cap de dues setmanes aproximadament, es pot observar com les cèl·lules de musculatura llisa s'han anat dividint i expandint sobre el plàstic del flasc al voltant de cada explant. Quan ja hi ha un nombre de cèl·lules considerable sobre el flasc, es retiren els explants i s'afegeix 15 ml de medi complet per tal que el cultiu vagi creixent. Quan s'arriba a un 70-80% de confluència, es procedeix al subcultiu rutinari. La taxa de subcultiu recomanada és de 1:2-3 cada setmana, canviant el medi cada 2-3 dies, i els passatges de treball per aquest tipus cel·lular són del 3 al 8.

1.1.3. HLSCM: Cèl·lules vasculars humanes de musculatura llisa procedents de vasos leptomeningis

Per a du a terme l'estandardització d'aquest cultiu primari s'ha seguit el protocol de Van Nostrand *et al.* (1994). Les mostres de cervell humà (6-12 h. *post-mortem*) s'han obtingut de l'Institut Anatòmic Forense de l'Hospital Clínic de Barcelona.

1.1.3.1. Protocol d'obtenció del cultiu d'HLSMC

Sota una campana de flux estèril, s'extreuen les membranes de l'espai leptomeningi i es dipositen en una placa amb PBS estèril sobre gel. Es van separant els vasos de la membrana i es van posant en una altra placa, la qual també conté PBS estèril, per tal d'anar retirant les restes de sang. Seguidament, un cop es tenen els vasos separats i nets, es dipositen en una altra placa de 100 mm de diàmetre que conté 10 ml d'una solució estèril de DMEM amb 0.1% colagenasa tipus II (Worthington), 0.05% elastasa (Sigma-Aldrich), 50 unitats/ml de penicil·lina i 0.05 mg/ml d'estreptomicina. Es trossegueu els vasos en aquesta solució i es deixa la placa a 4°C durant 2 hores per permetre la difusió de les proteases al teixit. Seguidament, es diposita la placa en un incubador a 37°C durant 90 minuts. Un cop passat aquest temps, es trosseja el teixit acuradament fent passades amb una pipeta (unes 30 vegades) i es centrifuga la solució durant 5 minuts a 1000 rpm en una centrifuga Jouan B3.11. Es resuspèn el *pellet* en 10 ml de medi de creixement i es fan unes 30 passades amb una pipeta per acabar de disgregar mecànicament les cèl·lules del teixit. Per últim, es deixa aquesta suspensió en un flascó de 75 cm² en un incubador en atmosfera humida amb un 5% CO₂ a 37°C durant tota la nit. El dia següent, es canvia el medi per treure les restes cel·lulars i les cèl·lules adherides al flascó es deixen créixer fins a quasi confluència (aproximadament 15 dies) abans del primer passatge. La taxa de subcultiu recomanada és de 1:2-3 cada setmana, canviant el medi cada 2-3 dies, i els passatges de treball per aquest tipus cel·lular són del 3 al 8.

1.1.4. Caracterització dels cultius primaris

Per tal de determinar la presència de cèl·lules de musculatura llisa en el cultiu primari es realitza una immunocitoquímica (veure Material i Mètodes 3.6) utilitzant l'anticòs monoclonal de ratolí anti- α -actina de múscul llis conjugat a fluoresceïna (Sigma-Aldrich). Per veure l'enriquiment del cultiu en cèl·lules de musculatura llisa, es realitza, juntament amb la immunocitoquímica, una tinció nuclear amb Hoetchst 33258. D'aquesta manera, tenint en compte els nuclis totals del cultiu i les cèl·lules amb tinció positiva per α -actina es pot determinar la puresa del cultiu.

En el cas de les cèl·lules HLSCM, és necessari descartar la presència d'astròcits en el cultiu. En aquest cas, s'utilitza el marcatge amb l'anticòs de ratolí anti-GFAP (proteïna àcida gliofibrilar) (Dako Cytomation) diluït 1:1000, tant d'un cultiu primari d'astròcits de rata (com a control positiu) com del cultiu primari d'HLSCM. Així mateix, per descartar la presència de fibroblast, s'utilitza el marcatge amb l'anticòs de ratolí anti-Fibroblast Surface Human Protein (clone 1B10) (Sigma-Aldrich) diluït 1:500, tant d'un cultiu de la línia cel·lular de fibroblast MRC-5 (com a control positiu) com del cultiu primari de HLSCM.

1.2. Manteniment del cultiu

Els diferents tipus cel·lulars (A7r5, HASMC i HLSCM) es mantenen en creixement en medi complet: DMEM, 10% FCS, 2 mM glutamina, 50 unitats/ml de penicil·lina, 0.05 mg/ml estreptomina, en un incubador en atmosfera humida amb un 5% CO₂ a 37°C. Es canvia el medi tres vegades a la setmana rutinàriament fins que les cèl·lules arriben a confluència. Un cop les cèl·lules estan confluents es procedeix a la tripsinització.

1.3. Subcultiu

Per dur a terme el subcultiu de les cèl·lules es procedeix a un procés de tripsinització per tal de desenganxar les cèl·lules del substrat i sembrar-les a una densitat adequada en una altra placa. Abans de la tripsinització, es fan dos rentats amb PBS. Seguidament, s'afegeixen 35 µl de tripsina/ cm² (tripsina-EDTA (1×), Gibco BRL) i s'incuba a 37°C durant 5 minuts. Es para l'acció de la tripsina amb un volum de medi complet tres vegades superior i es centrifuga la suspensió durant 5 minuts a 1000 rpm. Es resuspèn el *pellet* en medi complet i es procedeix al contacte cel·lular mitjançant el principi d'exclusió del colorant vital Blau de Tripà en una cambra de Neubauer. Una vegada es coneix el nombre de cèl·lules, es dilueix la suspensió inicial per tal d'obtenir la densitat cel·lular adequada per sembrar les noves plaques.

1.3.1. Contacte cel·lular

Pel realitzar el contacte cel·lular, es dilueix una mostra de la suspensió cel·lular amb Blau de Tripà 1:2. Es vorteja la solució i es fan entrar per capil·laritat uns 20 µl de la

mescla a un dels costats de la cambra. Es conten les cèl·lules viables (cèl·lules amb la membrana plasmàtica intacta i que exclouen el colorant) dels quatre quadrants externs de la cambra. L'àrea d'un quadrant equival a una superfície de 1 mm^2 , i com que l'alçada entre el cobreobjectes i la cambra és de 0.1 mm, resulta un volum per quadrant de 0.1 μl . Per tant, el nombre de cèl·lules per ml s'obté en multiplicar per 10^4 la mitjana de cèl·lules contades per cada quadrant. Tenint en compte la dilució realitzada inicialment en afegir el colorant i el volum de suspensió, es determina el nombre de cèl·lules per ml de la mostra i el nombre total de cèl·lules obtingudes.

1.4. Emmagatzematge de cèl·lules

La preservació de les cèl·lules es realitza satisfactòriament congelant les cèl·lules a -80°C (per períodes no superiors a tres mesos) o en nitrogen líquid, i en presència d'un agent crioprotector com el DMSO (Sigma-Aldrich). Aquest protegeix les cèl·lules del dany físic degut a la formació de cristalls de gel i de l'alteració osmòtica provocada per l'increment de la concentració de sals en el medi extracel·lular. En general, es recomana que la congelació es faci de manera paulatina per evitar la formació de cristalls de gel intracel·lulars, mentre que la descongelació s'ha de fer manera brusca, per tal d'augmentar la supervivència de les cèl·lules.

El protocol de congelació/descongelació s'ha seguit pels diferents tipus cel·lulars; A7r5, HASMC i HVSMC.

1.4.1. Congelació

El procediment general a seguir és el següent:

1. Les cèl·lules es fan créixer en medi complet i es tripsinitzen com en el subcultiu rutinari.
2. Es fa el recompte cel·lular en una cambra de Neubauer abans de centrifugar les cèl·lules.
3. Un cop es coneixen el nombre de cèl·lules del qual es parteix, es centrifuga la suspensió inicial durant 5 minuts a 1000 rpm.

4. Mentre es realitza la centrifugació, es prepara el medi per a congelar. Aquest consisteix en DMEM amb un 20% de FCS i un 10% de crioprotector (DMSO). Com que el DMSO genera calor quan es dissol en solucions aquoses, no es recomanable afegir-lo directament a les cèl·lules. Preferiblement, es prepara prèviament una solució amb DMSO 20% i FCS 20%, la qual es diluirà a la meitat posteriorment.
5. Es resuspenen les cèl·lules en un volum de medi amb 20% FCS i sense DMSO. Aquest volum ha de ser l'adequat per tal que quedi una densitat cel·lular del doble de la que es vol congelar (es congela a una densitat de 1 milió de cèl·lules/ml), ja que després s'haurà de diluir aquesta suspensió amb la solució de conté DMSO.
6. Quan hagin passat uns minuts, després de la preparació del medi amb 20% FCS i 20% DMSO, s'afegeix el mateix volum d'aquesta solució al volum de suspensió de cèl·lules. D'aquesta manera, les cèl·lules quedaran en un medi amb una concentració final de 20% FCS i 10 % DMSO.
7. S'ha de deixar un període d'equilibrat per tal que el crioprotector entri a les cèl·lules. Ha de ser d'almenys 15-20 minuts, però no més de 30 minuts abans de començar el procés de congelació.
8. Es preparen aliquotes d'1.5 ml que es dipositen en criotubs de 2 ml de capacitat.
9. Un cop passat el període d'equilibrat, es col·loquen els criotubs en una caixa amb un sistema de congelació amb alcohol isopropílic al congelador de -80°C , d'aquesta manera s'aconsegueix congelar les cèl·lules a una taxa de descens de la temperatura d'1-3 $^{\circ}\text{C}$ /minut. Es deixa a -80°C durant un període de 3 mesos com a màxim. Per períodes més llargs, i passades un mínim de 24 hores a -80°C , es porten els criotubs al tanc de nitrogen líquid.

1.4.2. Descongelació

Per portar a terme el procés de descongelació, s'extreuen els criotubs del tanc de nitrogen i s'introdueixen ràpidament en un bany a 37°C , sense submergir-los del tot. Un cop descongelada la suspensió cel·lular, es transfereix el contingut del criotub a una placa de 100 mm de diàmetre que conté 9 ml de medi complet prèviament atemperat a 37°C . Després de 24 hores, es canvia el medi per eliminar el DMSO i les possibles restes cel·lulars. A partir d'aquest punt, les cèl·lules es mantenen normalment.

1.5. Tractaments dels cultius cel·lulars

Es sembren les cèl·lules a una densitat cel·lular de 50.000 cel/ml en les plaques adequades per cada experiment. Es deixen assentar les cèl·lules durant 24 o 48 hores en medi complet abans del tractament. Els assajos rutinaris de viabilitat cel·lular, es realitzen en plaques de 24 pous i es sembren en un volum final de 500 µL per pou. El tractament posterior es realitza en un volum final de 300 µL per pou. Per altres tipus d'experiment, on cal sembrar les cèl·lules en altres tipus de placa, es conservarà aquesta relació entre la superfície de la placa (cm²) i el volum de sembra i de tractament.

1.5.1. Tractaments amb Sèrum Boví (BS)/ substrats de la SSAO/ inhibidors de la SSAO

Pels tractaments amb Sèrum Boví (BS) (Biosystems), substrats de la SSAO: metilamina, tiramina i benzilamina (Sigma-Aldrich), i inhibidors de la SSAO: semicarbazida (Sigma-Aldrich) i MDL72974A ((*E*)-2-(4-fluorophenethyl)-3-fluoroallylamine hydrochloride) (obsequi del Dr. P.H. Yu, University of Saskatchewan, Saskatchewan, Canadà) s'han utilitzat les cèl·lules A7r5 i HASMC. Els tractaments es realitzen dissolent les solucions dels reactius en medi complet sense FCS per tal d'obtenir les concentracions finals desitjades.

Cada vial individual de BS es dissol en 5 ml d'aigua destil·lada i s'esterilitza per filtració amb filtres de 0.2 µm. Les concentracions finals de BS en els tractaments són de 5, 10 i 15 % (v/v). Els substrats es preparen en solucions stock de 10 o 100 mM amb aigua destil·lada i s'esterilitzen per filtració. L'inhibidor semicarbazida es prepara en un solució stock de 10 mM amb aigua destil·lada i s'esterilitza per filtració. La concentració final de semicarbazida que s'utilitza rutinàriament pel tractament de les cèl·lules és de 1 mM. L'inhibidor MDL72974A es prepara en un solució stock de 1 mM amb aigua destil·lada i s'esterilitza per filtració. El rang de concentració final de MDL72974A utilitzat rutinàriament pel tractament de les cèl·lules és de 0.1-10 µM.

També s'han realitzat tractaments amb substrats i inhibidors de la SSAO en cèl·lules A7r5 transfectades transitòriament i establiment amb VAP-1 (veure Materials i Mètodes 4 i 5) a les mateixes condicions prèviament descrites.

1.5.2. Tractaments amb peròxid d'hidrogen/ formaldehid/ amoni

Els tractaments amb peròxid d'hidrogen, formaldehid i amoni (carbonat d'amoni) (Sigma-Aldrich) s'han realitzat sobre cèl·lules A7r5. Prèviament al tractament, es depriven les cèl·lules amb medi amb 0.2% FCS durant 12 hores aproximadament. Es preparen separadament solucions estoc de peròxid d'hidrogen, formaldehid i amoni amb aigua destil·lada de 100 mM i s'esterilitzen per filtració. Els tractaments es fan en un rang de concentració final de 0.1 a 1 mM en medi amb 0.2% FCS.

1.5.3. Tractaments amb beta-amiloide (βA_{1-40} HCHWA-D)

El pèptid utilitzat per aquest tipus de tractament ha estat el pèptid $A\beta_{1-40}$ contenint la mutació *Dutch* E22Q (HCHWA-D; *Hereditary Cerebral Hemorrhage With Amyloidosis-Dutch type*), obsequi del Dr. W.E. Van Nostrand (SUNY, Stony Brook, NY, USA). El pèptid liofilitzat (1 mg) es dissol en 940 μ l d'aigua destil·lada estèril per obtenir una solució de 250 μ M i es conserva al·lquotat a -80°C . Els tractaments es realitzen sempre amb la forma soluble del pèptid $D\beta A_{1-40}$.

Els tractaments amb $D\beta A_{1-40}$ s'han realitzat en cèl·lules A7r5, HASMC i HLSCM prèviament deprivades durant 12 hores aproximadament. En el cas dels cultius primaris, s'utilitza un medi complet sense FCS (0%), en canvi per la línia A7r5 s'utilitza medi complet amb 0.2% de FCS. El tractament amb el pèptid es realitza dissolent la solució stock en medi de deprivació (1:10) per obtenir una concentració final de 25 μ M.

2. PREPARACIÓ I OBTENCIÓ DE MOSTRES

2.1. Preparació de microsomes

2.1.1. Microsomes de pulmó boví

Els pulmons bovins s'han obtingut de l'escorxador de Sabadell i immediatament són transportats al laboratori i conservats a -20°C fins al moment del seu ús.

En primer lloc, s'extrau la membrana que rodeja el teixit i es procedeix a trossejar el teixit amb l'ajuda d'unes tisores de dissecció, descartant les zones amb alt contingut en teixit conjuntiu. Els trossos obtinguts es renten amb una solució de NaCl (0,9% p/v) per tal d'eliminar la sang com a font plasmàtica d'amino oxidasa contaminant. Es pesa i es dissol el teixit en tampó Tris-HCl 10 mM, pH 7.2, amb 0.25 M de sacarosa, seguint una relació 1:10 (p/v). A continuació, el teixit s'homogeneïtza en una picadora, en volums de 250 ml, durant un minut a intervals de 10 segons y 5 segons de descans. Seguidament, es filtra a través de una doble gasa quirúrgica per tal d'extreure les restes de teixit conjuntiu. A continuació, aquest homogenat es sotmet a una sèrie de centrifugacions diferencials utilitzant una centrifuga d'alta velocitat Kontron. L'obtenció de les diferents fraccions subcel·lulars d'homogenat de pulmó boví s'han realitzat segons l'esquema presentat a la figura 1.

Les dues primeres centrifugacions a 10000 g durant 10 minuts es realitzen per descartar nuclis, cèl·lules senceres i fragments de gran tamany (*pellet* 1) i eliminar la fracció cel·lular mitocondrial (*pellet* 2). A continuació, s'afegeix el CaCl_2 sòlid al sobrenedant postmitocondrial fins a una concentració final de 10 mM i s'agita durant 15 minuts 4°C . Seguidament, després d'una centrifugació a 25000 g durant 30 minuts, s'obté un sobrenedant (la fracció citosòlica), que es descarta, i el *pellet* (la fracció microsomal) es renta i es resuspèn manualment en tampó fosfato potàssic 50mM, pH 7.2, amb KCl 150 mM. Es centrifuga a 25000 g durant 30 minuts i el *pellet* microsomal obtingut es resuspèn en TPK 50 mM, pH 7.2. Després d'ajustar la concentració de proteïna desitjada, les mostres s'emmagatzemen en alíquotes d'1 ml i es mantenen a -20°C fins al moment del seu ús.

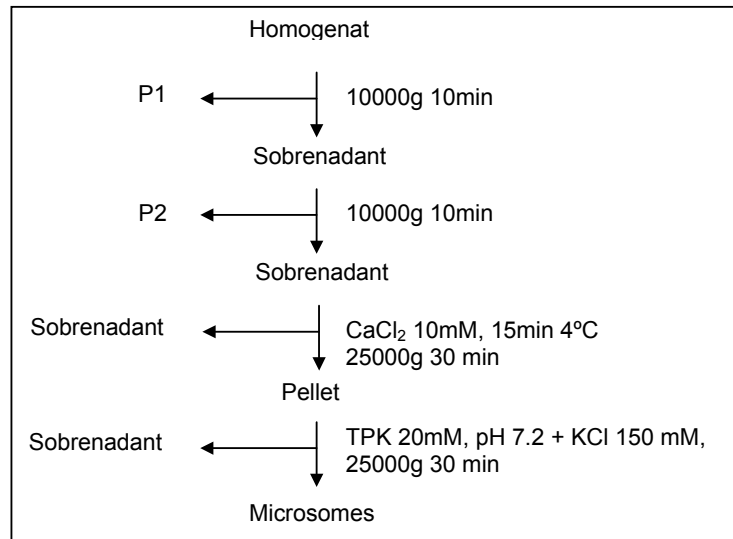


Figura 1. Obtenció de microsomes de pulmó boví per precipitació amb calci. Protocol extret de Lizcano *et al.*, 1998.

2.1.2. Microsomes de pulmó humà

El pulmó humà s'obté del Servei Anatòmic Forense de l'Hospital Clínic Provincial de Barcelona, i immediatament és transportat al laboratori i conservat a -20°C fins al moment del seu ús. El procediment per a preparar els microsomes de pulmó humà és el mateix que el descrit anteriorment per a la preparació de microsomes de pulmó boví (veure Material i Mètodes 2.1.1).

2.2. Meninges i microvasos cerebrals humans

Les mostres de cervell humà s'han obtingut de l'Institut Anatòmic Forense de l'Hospital Clínic de Barcelona. Les mostres de cervells patològics de pacients amb Alzheimer associat a Angiopatia Amiloide Cerebral i les corresponents mostres de cervells de pacients control, s'han obtingut del Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic de Barcelona.

2.2.1. Preparació de meninges cerebrals

Un cop extretes les meninges, es dipositen en un vas de precipitats que conté tampó HBSS (*Hanks' Balance Salt Solution*) (0.4 g/L KCl, 0.06 g/L KH_2PO_4 , 8.0 g/L NaCl, 0.35 g/L NaHCO_3 , 0.048 g/L NaHPO_4 , 1 g/L D-glucosa) mantenint una relació 1:20 entre grams de teixit i volum de tampó. A continuació, el teixit es trosseja i s'homogeneïtza amb l'ajuda d'un polytron durant 20 segons a una velocitat de 6000 rev/min. L'homogenat final s'aliquota i es guarda a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2. Preparació de microvasos cerebrals

2.2.2.1. Preparació mitjançant centrifugació en gradient de sacarosa

Un cop separades les meninges, s'extreuen aproximadament 10 grams de còrtex cerebral i es dipositen en un volum de 200 ml de tampó Ringer 1% BSA (9 g/L NaCl, 0.4 g/L KCl, 0.25 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L NaHCO_3 , 2.6 g/L Hepes, 10 g/L BSA). Després de trossejar el teixit, s'homogeneïtza en un Potter a 1000 rpm (5 vegades) i es sotmet a una sèrie de centrifugacions seguint el mètode descrit per Mrsulija *et al.*, 1976, esquematitzat a la figura 2.

Les diferents fraccions s'obtenen mitjançant l'ús d'una centrifuga d'alta velocitat Kontron amb rotor A8.24 i una ultracentrifuga Sorvall amb rotor Ti-45. Després de centrifugar dues vegades a 1500 g, el *pellet* (P2) es resuspèn en un volum total de 100 ml de sacarosa 0.25 M. En paral·lel, i 90 minuts abans de la seva utilització, es preparen a la cambra freda ($4\text{ }^\circ\text{C}$) els tubs d'ultracentrifuga amb un gradient discontinu de sacarosa (20 ml de sacarosa 1 M i 20 ml de sacarosa 1.5 M). Sobre cada un d'ells es diposita amb molta cura 16.5 ml de la suspensió P2 i es centrifuga a 58000 g durant 30 minuts. El *pellet* final, la fracció de microvasos, es resuspèn en aproximadament 10 ml de tampó HBSS. Per últim, es fa una última centrifugació per acabar de rentar la preparació a 4000 rpm durant 15 minuts en una centrifuga Ependorf 5810R. El *pellet* es resuspèn en un volum final d'aproximadament 5 ml d'HBSS, s'homogeneïtza la suspensió de microvasos manualment amb un Potter de 5 ml, s'aliquota i es guarda a $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

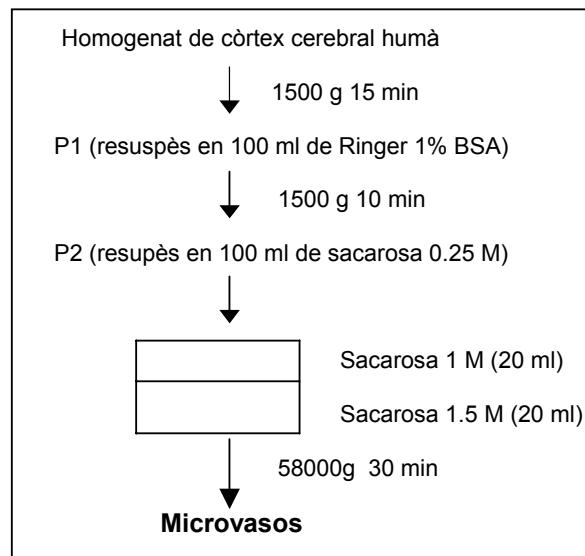


Figura 2. Preparació de microvasos cerebrals humans mitjançant centrifugació en gradient de sacarosa (Mrsulija *et al.*, 1976).

2.2.2.2. Preparació mitjançant filtració diferencial a través de malles de nylon

S'ha optimitzat un mètode de preparació de microvasos humans a partir dels protocols de Dallaire *et al.*, 1991, i Grammas *et al.*, 1991, degut a la facilitat metodològica respecte el mètode anterior. El protocol definitiu està esquematitzat a la figura 3.

Un cop separades les meninges, s'extreuen aproximadament 10 grams de còrtex cerebral i es dipositen en un volum de 60 ml de tampó HBSS. Seguidament es trosseja el teixit i s'homogeneïtza en un Potter a 350 rpm (20 vegades) i s'afegeix a l'homogenat el mateix volum d'una solució de HBSS contenint un 26% (p/v) de dextrans T-70. Es centrifuga a 2500 g durant 10 minuts en una centrifuga d'alta velocitat Kontron amb rotor A8.24 i el *pellet* es resuspèn en 10 ml d'HBSS. A partir d'aquí, es procedeix a la filtració de la solució per diferents malles de nylon. En primer lloc, es filtra per una malla de 210 μm (1 vegada) i es renta la malla amb 20 ml d'HBSS. En aquest punt, es descarta la fracció retinguda i es centrifuguen els 30 ml obtinguts a 2500 g durant 10 minuts. El *pellet* es resuspèn en 10 ml d'HBSS i la solució es filtra per una malla de 53 μm . En aquest cas, la part retinguda serà la fracció de microvasos. Es recull amb molta cura i

amb l'ajuda d'una espàtula, i es resuspèn en 2 ml d'HBSS. Finalment, s'homogeneïtza la suspensió de microvasos manualment amb un Potter de 5 ml, s'aliqüota i es guarda a -80°C .

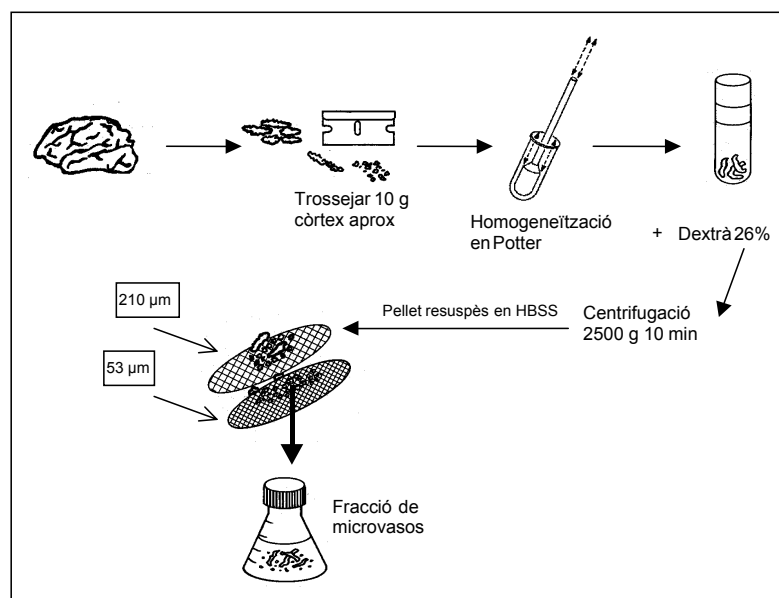
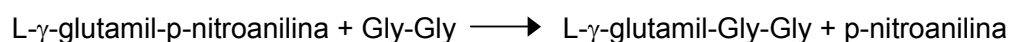


Figura 3. Preparació de microvasos cerebrals mitjançant filtració diferencial a través de malles de nylon (Dallaire *et al.*, 1991 & Grammas *et al.*, 1991).

2.2.2.3. Caracterització de la fracció de microvasos amb marcadors enzimàtics

2.2.2.3.1. Assaig de l'activitat γ -Glutamil Transpeptidasa

Un dels enzims utilitzats com a marcador de la purificació de capil·lars sanguinis és la γ -glutamil transpeptidasa. El seu substrat és la L- γ -glutamil-p-nitroanilina, l'acceptor la glicilglicina, i l'activitat enzimàtica es determina a partir de la mesura de la p-nitroanilina alliberada durant la transpeptidació. Es realitza una determinació a 37°C espectrofotomètricament i de manera continua a 410 nm. El mecanisme de reacció és el següent:

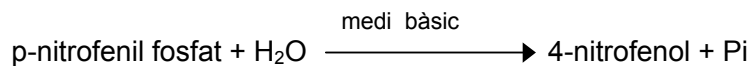


Per seguir la reacció, es prepara la següent mescla de reacció en una cubeta d'espectròmetre d'1 ml: 0.59 ml de Tampó Tris-HCl 100 mM (pH 8.0) , 0.20 ml de L- γ -glutamil-p-nitroanilina 5 mM (pH 8.0), 0.20 ml de Glicilglicina 0.1 M (pH 8.0) i 0.10 ml de proteïna. La reacció s'inicia en afegir la proteïna després de deixar atemperar la cubeta a 37°C durant 5 minuts. La mesura es determina utilitzant un espectròmetre Lambda 2 (Perkin Elmer).

El càlcul d'activitat es determina a partir de l'equació de Lambert-Beer, on el volum total de reacció és de 10^{-3} L, la longitud de la cubeta (l) d'1 cm i el coeficient d'absorció molar per la p-nitroanilina a 410 nm (ϵ) és de $8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ UDO}$.

2.2.2.3.2. Assaig de la Fosfatasa Alcalina

Un altre enzim utilitzat com a marcador de la purificació de microvasos és la fosfatasa alcalina. La determinació consisteix en seguir espectrofotomètricament a 405 nm la producció de 4-nitrofenol, provinent de la hidròlisi del substrat p-nitrofenil fosfat. La reacció es mesura d'una manera continua i a 37°C. El mecanisme de reacció és el següent:



Per seguir la reacció, es prepara la següent mescla de reacció en una cubeta d'espectròmetre d'1 ml: 0.89 ml de Tampó Glicina-NaCl 100 mM (pH 9.0), 0.10 ml de p-nitrofenil fosfat 100 mM i 0.10 ml de proteïna.

La reacció s'inicia en afegir la proteïna després de deixar atemperar la cubeta a 37°C durant 5 minuts. La mesura es determina utilitzant un espectròmetre Lambda 2 (Perkin Elmer). El càlcul d'activitat es determina a partir de l'equació de Lambert-Beer, on el volum total de reacció és de 10^{-3} L, la longitud de la cubeta (l) d'1 cm, i el coeficient d'absorció molar pel 4-nitrofenol a 405 nm (ϵ) és de $18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ UDO}$.

2.3. Plasma Humà

Les mostres de plasma humà de malalts d'Alzheimer s'han obtingut del centre d'assistència ACE de Barcelona (Fundació ACE, Institut Català de Neurociències Aplicades). Les mostres de sang s'han recollit per venopunció en tubs estèrils que contenen una solució de citrat sòdic de 0.129 mol/L. Després d'una centrifugació a 2500g durant 20 minuts, s'han obtingut les mostres de plasma, les quals s'aliquoten i congelen a -80°C pel seu posterior ús.

Les mostres de plasma humà, utilitzades rutinàriament al laboratori per experiments d'activació de la SSAO, s'han obtingut del Servei d'Hematologia de l'Hospital General de la Vall d'Hebron de Barcelona. Aquestes mostres de plasma humà es conserven aliquotades a -20 °C fins al moment del seu ús.

2.4. Preparació de llisats cel·lulars

2.4.1. Llissats cel·lulars per a la determinació de l'activitat SSAO

Per mesurar l'activitat SSAO de cèl·lules en cultiu, es llisen les cèl·lules amb el tampó amb el qual es realitzarà la determinació d'activitat enzimàtica posterior. Així doncs, després d'un tractament donat, es dipositen les plaques de cultius a llisar sobre gel i es renten dues vegades amb PBS. Seguidament, s'afegeix un volum determinat de tampó Tris-HCl 100 mM pH 9.0 amb Cocktail d'inhibidors de proteases (1:100) (Sigma-Aldrich) a la placa sense medi i, després d'estar 10 minuts en gel, es recullen les cèl·lules en aquest volum. Si es llisen cèl·lules sembrades en una placa de 100 mm de diàmetre, s'utilitza un volum de tampó de 200-300 µl. Es fa una lleu sonicació de la suspensió i es guarda a -80 °C fins a la posterior utilització. El mètode de mesura de l'activitat SSAO s'explica posteriorment a l'apartat de Material i Mètodes 3.3.

2.4.2. Llissats cel·lulars per a Western-Blot

Per mesurar l'expressió d'una proteïna per Western-blot, després de fer dos rentats amb PBS, es llisen les cèl·lules amb un volum determinat de tampó de llisi constituït per 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Tritó X-100, 10 mM EDTA i cocktail d'inhibidors de proteases

(1:100). Si es llisen cèl·lules sembrades en una placa de 100 mm o de 150 mm de diàmetre, s'utilitza un volum de tampó de llisi de 200 µl o 500 µl respectivament. Si les cèl·lules estan sembrades en una placa de 6 pous, es recullen en 100 µl de tampó de llisi per pou. Després d'estar 10 minuts en gel, es recullen les cèl·lules i es centrifuga la suspensió durant 15 minuts a 11.000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5810R. Es recull el sobrenedant i es guarda a -80°C fins a la posterior utilització. Es mesura la quantitat de proteïna total de la mostra recollida pel mètode de Bradford (veure Material i Mètodes 3.2), i es procedeix a la realització del Western-blot seguint la metodologia explicada posteriorment (veure Material i Mètodes 3.5).

2.4.2.1. Fraccionament subcel·lular per a la separació de la fracció mitocondrial i la citosòlica

En el cas de mesurar l'expressió d'una proteïna per Western-blot en la fracció citosòlica o mitocondrial específicament, caldrà realitzar un fraccionament subcel·lular de les cèl·lules després del tractament. Així doncs, es dipositen les plaques de cultiu sobre gel, es fan un parell de rentats amb PBS fred i s'afegeixen 250 µl de tampó A fred (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitòl, cocktail d'inhibidors de proteases (1:100) i 250 mM sacarosa). Després d'incubar les cèl·lules durant 10 minuts en el tampó A i sobre gel, es llisen mitjançant un homogeneïtzador de 7 ml Weathon douncer (10 vegades per mostra). A continuació i després d'una centrifugació a 800 g durant 10 minuts a 4°C, els sobrenedants es centrifuguen a 20000 g durant 40 minuts a 4 °C. Els sobrenedants obtinguts són els extractes citosòlics i es conserven a -80°C. Els *pellets*, els quals corresponen a la fracció mitocondrial, es llisen amb 100 µl de tampó B (50 mM Hepes (pH 7.4), 1% (v/v) Nonidet P-40 (NP-40), 10% (v/v) glicerol, 1 mM EDTA, 2 mM ditiotreitòl i cocktail d'inhibidors de proteases (1:100)) i s'incuben durant 20 minuts en gel. Les restes cel·lulars són centrifugades a 14000 g durant 40 minuts a 4°C i el sobrenedant obtingut es conserva com a fracció mitocondrial a -80°C.

3. MÈTODES GENERALS

3.1. Viabilitat Cel·lular

3.1.1. Mètode d'MTT

Aquest assaig implica la conversió de l'MTT (*3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich) en sals de formazà mitjançant les deshidrogenases mitocondrials de les cèl·lules. La formació del precipitat insoluble és una mesura indirecta de la proliferació-mort cel·lular (Hansen *et al.*, 1989). L'MTT es dissol a una concentració estoc de 2.5 mg/mL en aigua destil·lada, s'esterilitza per filtració i s'emmagatzema a 4 °C protegit de la llum. S'afegeix el volum de la solució estoc a cada pou de la placa de cultiu per a obtenir una concentració final de 0.5 mg/mL i s'incuba durant 90 minuts a 37 °C. Passat aquest temps, s'aspira el medi i es dissol el precipitat en DMSO. Es llegeix l'absorbància del precipitat a 560 i 620 nm en un lector de plaques ELISA (Labsystems multiskan RC). La diferència entre les absorbàncies ens permet restar possibles interferències. Les unitats d'absorbància obtingudes s'expressen en tant per cent respecte la viabilitat del control.

3.1.2. LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity

El LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes) permet mesurar la viabilitat cel·lular de cèl·lules en cultiu. El *kit* inclou dues sondes, calceina AM i l'homodimer d'etidi-1, les quals permeten mesurar dos paràmetres de viabilitat cel·lular; l'activitat esterasa intracel·lular i la integritat de la membrana plasmàtica. La calceina AM és un substrat de l'activitat esterasa que es hidrolitza intracel·lularment donant lloc a un producte fluorescent verd, la calceina. D'aquesta manera, la fluorescència verda serà un indicador de les cèl·lules vives (emet a 515 nm.). L'homodimer d'etidi-1 dóna lloc a una tinció fluorescent vermella dels àcids nucleics. Només es tenyiran amb aquesta sonda els nuclis d'aquelles cèl·lules que han perdut la integritat de membrana, així doncs, la tinció fluorescent vermella serà indicador de les cèl·lules mortes (emet a 635 nm.).

Per realitzar aquest assaig, es prepara una solució de 10 ml de medi DMEM (sense FCS), 2 µl de calceina AM i 2 µl d'homodimer d'etidi-1. Es retira el medi de les cèl·lules, s'afegeix la solució amb la mescla dels components del *kit* i es reserva la placa de cultiu durant 15 minuts a 37°C. Seguidament es pot procedir a l'observació de les mostres en un microscopi de fluorescència invertit Olympus IX70.

Per un recompte adequat de cèl·lules vives i mortes després d'un tractament determinat, es conten les cèl·lules verdes i vermelles de 3 camps diferents per pou i un total de 3 pous per tractament. Es sumen les cèl·lules vives i mortes de cada camp, i es calcula el percentatge de cèl·lules mortes respecte el total en aquell camp.

3.2. Determinació de proteïna pel mètode de Bradford

Aquest mètode (Bradford *et al.*, 1976) està basat en el desplaçament que experimenta el màxim d'absorció d'una solució àcida de Coomassie Brilliant Blue G-250, des de 465 a 595 nm, quan aquest reactiu s'uneix a l'enllaç peptídic de les proteïnes.

Es prepara una recta patró de concentracions de 0.05, 0.1, 0.15, 0.3 i 0.5 mg/ml a partir de BSA (Sigma-Aldrich) 1 mg/ml, i es preparen les mostres a una dilució adequada per tal que la seva concentració estigui dins el rang de la recta patró. Es dipositen 10 µl de cada un dels patrons i de les mostres (per duplicat) en una placa de 96 pouets i s'afegeixen 200 µl de reactiu de Bradford (Bio-Rad Laboratories) diluït 1:5. Després de 5 minuts, es procedeix a la lectura en un lector de plaques Elisa Labsystems Multiskan RC a 595 nm.

3.3. Mètode de detecció de l'activitat SSAO

3.3.1. Mètode radiomètric

En la determinació radiomètrica de l'activitat de les diferents amino oxidases es fan servir diversos substrats marcats amb ^{14}C . Aquest mètode s'utilitza per la seva elevada sensibilitat, que depèn de la radioactivitat específica del substrat utilitzat a l'assaig.

El mètode consisteix en la incubació de l'enzim i el substrat durant un temps donat, després del qual la reacció es finalitza amb l'addició d'àcid cítric 2 M. El temps d'incubació ha d'estar dins el rang on la metabolització del substrat és lineal amb el temps. El producte de la reacció, l'aldehid format, es separa del substrat, i la seva concentració es determina per contatge en centelleig líquid. L'assaig radiomètric utilitzat és una modificació del mètode d'Otsuka i Kobayashi (1964); s'extreuen els productes de la reacció en un solvent orgànic a pH àcid, al qual passen com a conseqüència de no tenir càrrega, mentre que l'amina (substrat que no ha estat oxidat i que té càrrega a aquest pH) roman a la fase aquosa on s'ha produït la reacció (Fowler *et al.*, 1981).

Per a la determinació de l'activitat SSAO, s'utilitza rutinàriament la benzilamina com a substrat. Degut a que la benzilamina també és substrat de la MAO B, cal una preincubació de la mescla de reacció amb un inhibidor d'aquesta amino oxidasa, el L-deprenil, a una concentració final de 1 μM , a la qual només s'inhibeix específicament aquesta forma enzimàtica (Johnston, 1968). D'aquesta manera, en addicionar el substrat, podem estar segurs que serà metabolitzat únicament per la SSAO.

3.3.1.1. Procediment general

L'assaig es realitza en minivials de plàstic de fons pla amb una capacitat de 5 ml i la incubació es du a terme a 37°C en un bany en agitació constant. La mescla d'incubació conté també Tris-HCl 100 mM pH 9, 20 μl de L-deprenil 10 μM (Sigma-Aldrich) i proteïna, fins a arribar a un volum final de 200 μl . La quantitat de proteïna ha d'estar dins el rang on la metabolització del substrat és lineal amb la quantitat de proteïna. Després de preincubar la mostra durant 30 minuts amb L-deprenil a 37°C, s'inicia la reacció afegint 25 μl de substrat. Finalment, s'atura afegint 100 μl d'àcid cítric 2 M després d'un temps determinat d'incubació amb el substrat. Els blancs de cada assaig s'obtenen afegint l'àcid cítric abans que el substrat.

Per extreure el producte de la reacció, s'afegeixen 4 ml d'una solució toluè: etilacetat 1:1 (v/v), que conté 0.6% (p/v) de 2,5-difeniloxazol (PPO) com a compost fluorescent. Seguidament, es tapen els minivials i s'agiten durant 1 minut per tal que el producte format en la fase aquosa d'incubació passi a la fase orgànica. Els minivials es dipositen durant 20 minuts a -80 °C, de manera que es congela solsament la fase aquosa, mentre

que la orgànica s'obté fàcilment per decantació. La radioactivitat que conté aquesta darrera fase es mesura en un comptador de centelleig líquid Pharmacia model Wallac 1409, utilitzant el programa corresponent per a ^{14}C i un temps de contatge d'1 minut per vial.

Els substrats utilitzats han estat: la 7- ^{14}C -*Benzylamine hydrochloride* (55 mCi/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) per a la determinació de l'activitat MAO-B i la SSAO, i la 5-(2- ^{14}C)-*hydroxytryptamine binoxalat* (45.9 mCi/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc.) per a la determinació de l'activitat MAO-A. Per a preparar la dilució de treball, l'amina marcada es dilueix adequadament amb la corresponent amina freda i es guarda a -20°C .

3.3.1.2. Tractament amb inhibidors específics

Per tal d'inhibir selectivament l'activitat SSAO i assegurar que és aquesta l'activitat enzimàtica que es troba afectada, es preincuba l'enzim amb semicarbazida (Sigma-Aldrich) 1 mM durant 30 minuts a 37°C abans de l'addició del substrat. Les activitats MAO-A i MAO-B s'inhibeixen preincubant la mescla de reacció amb clorgilina 1 mM durant 30 minuts a 37°C , mentre que l'activitat de la MAO-B, és inhibida selectivament preincubant les preparacions durant 30 minuts amb L-deprenil (Sigma-Aldrich) 1 μM , abans de l'addició del substrat.

3.3.1.3. Assajos d'inhibició

S'utilitza el mètode radiomètric de la benzilamina per a la determinació de corbes IC_{50} (% activitat vs $\log [I]$) de diferents inhibidors de la SSAO. Aquests estudis s'han realitzat amb la SSAO microsomal (de pulmó boví) i la SSAO plasmàtica (de sèrum boví). Els inhibidors utilitzats han estat la semicarbazida i el MDL72974A.

El procediment general és el mateix que s'ha vist anteriorment (veure Material i Mètodes 3.3.1.1). En un bany a 37°C , i després de la prèvia inhibició amb L-deprenil 1 μM , la concentració de proteïna adequada s'incuba sense i amb diferents concentracions d'inhibidor (10^{-3} – 10^{-9} M) i tampó fosfat 50 mM pH 7.4 durant diferents temps (0 i 30

minuts). Seguidament, s'afegeixen 25 µl de ¹⁴C-Benzilamina i després del temps d'incubació adequat, s'atura la reacció amb l'addició de 100 µl d'àcid cítric 2 M.

Les corbes d'IC50 es realitzaran a partir de la representació gràfica del percentatge d'activitat enzimàtica obtinguda a cada concentració d'inhibidor respecte l'activitat obtinguda sense inhibidor, enfront al logaritme de la concentració d'inhibidor.

3.3.1.4. Càlcul de l'activitat enzimàtica

Per a calcular l'activitat específica de la SSAO en pmol/min·mg proteïna, a partir de les dpm obtingudes, s'utilitza la següent equació:

$$\text{cpm} \cdot (100/ X) \cdot Y \cdot (1/\text{min}) \cdot (1/\mu\text{l prot}) \cdot (1000/ P) = \text{pmol/ min mg}$$

Essent X el quocient d'extracció de benzaldehyd en la fase orgànica (86.8 %, Fowler & Orelan, 1980), Y el factor de conversió de dpm a pmol, i P la concentració de proteïna utilitzada expressada en mg/ml. El factor de conversió Y depèn de l'activitat del substrat (µCi/ µmol), i es calcula mitjançant la següent equació:

$$Y = (\mu\text{mol/ } \mu\text{Ci}) \cdot (1 \mu\text{Ci} / 2.22 \cdot 10^6 \text{ dpm}) \cdot (10^6 \text{ pmol/ } 1 \mu\text{mol}) = \text{pmol/dpm}$$

Seguint aquest mètode radiomètric s'han realitzat tots els posteriors experiments per determinar l'activitat SSAO de les diferents mostres a analitzar. Concretament, en la majoria d'experiments d'aquest treball, s'ha utilitzat una benzilamina de 100 µM amb una activitat específica de 2 µCi/µmol (Y = 0.22).

3.3.2. Mètode espectrofotomètric

L'oxidació de la benzilamina també pot ser monitoritzat espectrofotomètricament, seguint l'aparició de benzaldehyd a 250 nm (Tabor *et al.*, 1954). S'utilitza un espectrofotòmetre termostatitzat de doble feix Perkin-Elmer, model Lambda 2, amb un carro automàtic per 12 mostres.

3.3.2.1. Procediment general

La mescla de reacció es realitza en cubetes de quars i consisteix en: TPK 50 mM, pH 7.2 i benzilamina (Sigma-Aldrich), o el substrat desitjat, a la concentració final adequada. Després de preincubar 5 minuts a 37 °C, la reacció s'inicia afegint la quantitat de proteïna adequada obtenint un volum final de 3 ml. Per cada mostra es realitza un blanc sense substrat.

3.3.2.2. Càlcul de l'activitat enzimàtica

El càlcul d'activitat es determina a partir de l'equació de Lambert-Beer, on el volum total de reacció és de 3 ml, la longitud de la cubeta (l) d'1 cm i el coeficient d'absorció molar pel benzaldehid a 250 nm (ϵ) és de $13800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{UDO}$.

Activitat enzimàtica (pmol/ min) =

Velocitat de la reacció (UDO/ min) $\cdot 1 / \epsilon \cdot 1 / l \cdot 1 / V_{\text{total}} \cdot 10^6$ pmol/mol

3.4. Electroforesi

En aquest treball s'ha utilitzat el mètode de Laemli (1970) que és una modificació del mètode clàssic de Weber & Osborn (1969). L'electroforesi es porta a terme en un sistema de minigel vertical Mini-protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad) on les plaques que contenen el gel estan submergides en el tampó d'electroforesi (3.03 g Tris, 14.4 g Glicina, 1 g SDS en 1 L d'aigua mili-Q, de manera que queda ajustat a un pH de 8.3). La font d'alimentació utilitzada és una LKB 2002. El gel concentrador es prepara a diferents percentatges d'acrilamida segons la proteïna a analitzar, mentre que el separador es prepara a un percentatge del 4% d'acrilamida-bisacrilamida.

Les mostres es preparen diluint adequadament un tampó de mostra preparat 4x (62.5 ml de Tris 1 M pH 6.8, 50 ml d' SDS al 20%, 100 ml de glicerol i 12.5 ml d'aigua mili Q). Abans d'afegir-lo a la mostra, s'afegeix el volum adequat de β -mercaptoetanol per tal que quedi al 10% en el tampó de mostra. Les mostres, abans de ser carregades al gel, han de ser bullides 3 minuts i centrifugades. Les condicions d'electroforesi són 150 V durant 60 minuts.

3.4.1. Tinció de Commassie

Una vegada finalitzada l'electroforesi, es submergeix el gel en 100 ml de solució colorant (62.5 ml de Coomassie brilliant blue R250 a l'1%, 250 ml de metanol, 50 ml àcid acètic glacial i 500 ml d'aigua miliQ). S'incuba una hora a temperatura ambient, i a continuació, es traspasa el gel a la solució decolorant (250 ml de metanol, 50 ml àcid acètic glacial, 5 ml de glicerol i 500 ml d'aigua miliQ). Es deixa el gel destenyint durant tota la nit, cobert i en agitació constant. Es seca el gel utilitzant un assecador de gels (Gel Dryer, 543, Bio-Rad).

3.5. Tècnica de Western-blot

3.5.1. Transferència de proteïnes a membrana de nitrocel·lulosa

Per tal de transferir proteïnes del gel d'electroforesi a una membrana de nitrocel·lulosa, es diposita el gel sobre una membrana en un sandvitx cobert amb tampó de transferència i situat entre dos elèctrodes. Aleshores s'aplica un voltatge perpendicular al gel, amb la qual cosa es provoca la migració de les proteïnes del gel a la membrana de nitrocel·lulosa (0.45 µm, Bio-Rad).

La transferència es realitza en un sistema Mini-Transblot de Bio-Rad i el tampó de transferència utilitzat consta de 14.4 g de glicina, 3 g Tris en 200 ml metanol i 800 ml d'aigua destil·lada. Es prepara el sistema segons el protocol detallat pel proveïdor (Bio-Rad). Un cop preparada la unitat de transferència, es connecta a la font d'alimentació a un voltatge de 100 V durant 1.5 hores.

3.5.2. Procediment general

El protocol general a seguir és:

1. Es realitza l'electroforesi en SDS-PAGE de les diferents mostres a analitzar.
4. Es procedeix a la transferència del gel a la membrana de nitrocel·lulosa.

5. Es bloqueja la membrana submergint-la en solució de bloqueig (solució de llet desnatada al 5% en TTBS (8 g Tris, 2.42 g NaCl, 0.1% Tween 20, en 1 L d'aigua destil·lada, pH 7.5)) durant una hora en agitació constant.
6. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari a la dilució adequada en solució de bloqueig durant tota la nit a 4 °C en agitació constant.
7. Es fan tres rentats de 10 minuts amb TTBS en agitació constant.
8. S'incuba la membrana amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa a la dilució adequada en solució de bloqueig durant una hora a temperatura ambient i en agitació constant.
9. Es fan tres rentats de 10 minuts amb TTBS en agitació constant.
10. Es procedeix al revelat de la membrana pel mètode quimioluminiscent d'ECL[®] (Amersham Pharmacia Biotech) que conté una solució de luminol i una altra de peròxid estable.

3.5.3. *Stripping* de membranes

En cas de voler reutilitzar la membrana per tal d'incubar-la amb un altre anticòs primari, es segueix el següent protocol d'*Stripping*:

1. Es fan tres rentats de 10 minuts amb TTBS en agitació constant.
2. Es col·loca la membrana en un recipient tancat amb tampó d'*stripping* (100 mM β -mercaptoetanol, 2% (p/w) SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) en un bany a 50°C durant 30 minuts.
3. Es fan tres rentats de 10 minuts amb TTBS en agitació constant.
4. S'incuba la membrana amb l'anticòs primari i es segueix el procediment anterior.

3.5.4. Anticossos utilitzats

Els anticossos primaris comercials utilitzats per realitzar la tècnica de Western-blot han estat: rabbit anti-PARP (Upstate Biotechnology, Inc.), mouse anti-Cytochrome c (BD Biosciences Pharmingen), mouse anti- β -actin (Sigma Aldrich), anti-APP P-2-1 (Obsequi del Dr. Van Nostrand, SUNY, Stony Brook, NY, USA).

Per determinar la SSAO pel mètode immunològic de Western-blot, s'ha utilitzat l'anticòs policlonal de ratolí anti-SSAO de pulmó boví preparat anteriorment al nostre laboratori (Lizcano *et al.*, 1998) 1:1000, i l'anticòs policlonal anti-SSAO de pulmó boví recentment purificat a partir de sang de conill immunitzat 1:1500 (veure Material i Mètodes 7.1) o l'anticòs goat anti-VAP-1 E-19 (Santa Cruz Biotech).

Els anticossos secundaris utilitzats han estat: HRP anti-rabbit IgG (BD Biosciences Pharmingen), HRP anti-mouse IgG (Dako Cytomation), HRP anti-goat IgG (Santa Cruz Biotech).

3.6. Immunocitoquímica

Per tal de realitzar la immunocitoquímica, s'han de sembrar les cèl·lules sobre cobreobjectes. Es preparen plaques de 12 pous amb 1 cobreobjectes per cada pou, prèviament activats amb polilisina (10 µg/ml). Es sembren les cèl·lules a la densitat desitjada i es deixen créixer durant 48 hores abans del tractament.

3.6.1. Tinció de Hoechst 33258

Per tal de determinar el nombre total de cèl·lules o la puresa del cultiu, es combina la tinció immunocitoquímica amb la tinció de nuclis utilitzant Hoechst 33258.

El Hoechst 33258 o bisbenzimidazol (2-[4-hidroxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5-bi-1H-benzimidazol) (Sigma-Aldrich) és un colorant fluorescent permeable a les membranes cel·lulars i que s'uneix al DNA. La concentració utilitzada és d' 1µg/ml i el procediment per la tinció de les cèl·lules es realitza com un pas posterior a la immunocitoquímica.

La tinció amb Hoechst també ha estat utilitzada per la detecció de cèl·lules apoptòtiques, ja que aquest tipus de tinció nuclear permet distingir els nuclis refringents i la cromatina condensada, típica dels nuclis apoptòtics.

3.6.2. Procediment general per la immunocitoquímica i tinció de Hoechst 33258

El protocol general a seguir és:

1. Es renten les cèl·lules amb PBS tres vegades.
2. Es fixen amb paraformaldhèid 4% durant 30 minuts a temperatura ambient (es dissolen 4 g de paraformaldhèid en 100 ml TPK 0.1 M (pH 7.4) a 70°C).
3. Es fan dos rentats de 10 minuts amb TBS glicina 0.1 M.
4. Pel procés de permeabilització, es realitzen dues incubacions de 10 minuts a temperatura ambient en TTBS.
5. El bloqueig de la preparació es realitza amb la incubació d'una solució TTBS amb BSA 1% (solució de bloqueig) durant 30 minuts a temperatura ambient.
6. S'incuba amb l'anticòs primari a la dilució adequada en solució de bloqueig durant tota la nit a 4 °C.
7. Es fan tres rentats de 10 minuts amb la solució de bloqueig.
8. S'incuba amb l'anticòs secundari (si és necessari) a la dilució adequada en solució de bloqueig durant una hora a temperatura ambient.
9. Es fan tres rentats de 10 minuts amb la solució de bloqueig.
10. S'incuba la preparació amb Hoeschst (1µg/ml) dissolt en la solució de bloqueig durant 5 minuts a temperatura ambient.
11. Es fan tres rentats de 10 minuts amb la solució de bloqueig.
12. Es procedeix al muntatge del cobreobjectes sobre un portaobjectes utilitzant medi de muntatge per a fluorescència Dako Cytomation.

L'observació de les preparacions es realitza mitjançant un microscopi de fluorescència Leica DMRD amb un software Leica DC viewer. El Hoeschst emet a 430 nm., la fluoresceïna a 520 nm. i la rodamina a 580 nm.

En el cas del contacte cel·lular per Hoeschst, la quantificació es realitza contant els nuclis amb immunotinció positiva respecte als nuclis totals en imatges captades amb l'objectiu 10X. Es conten un mínim de 200 nuclis per cada camp. El contacte es realitza en tres camps aleatoris per cada cobreobjectes, essent dos cobreobjectes per tractament. Així es garanteix un recompte d'unes 1200 cèl·lules per tractament.

3.6.3. Anticossos utilitzats

Els anticossos primaris utilitzats per realitzar la tècnica de immunocitoquímica han estat: rabbit anti-cleaved caspase-3 (Cell Signaling) 1:500, monoclonal rabbit anti- α -actin smooth muscle (Sigma-Aldrich) conjugat a fluoresceïna 1:200, rabbit anti-GFAP (Dako Cytomation) 1:1000, rabbit anti-Fibroblast Surface Human Protein (clone 1B10) (Sigma-Aldrich) 1:500.

Els anticossos secundaris conjugats a cromòfors fluorescents utilitzats són: Alexa Fluor[®] 594 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes) 1:1000, Texas Red[®] goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) 1:1000, Alexa Fluor[®] 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) 1:1000.

3.7. Immunohistoquímica

3.7.1. Procediment general per a mostres parafinades

Les mostres s'han obtingut del Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic de Barcelona. Les seccions de les mostres fixades en parafina es processen utilitzant el *kit* DAKO LSAB[®]+Kit, Peroxidase (Dako Cytomation). Es desparafinen les seccions en xilol durant 10 minuts (3 vegades) i seguidament s'hidraten fent-les passar per una sèrie de solucions en ordre decreixent d'etanol (etanol absolut, 95%, 70% i 50%) durant 2 minuts per solució. A continuació, es fa un tractament de les seccions amb tampó citrat; es bullen les mostres en una solució àcid cítric/ citrat sòdic (1.9 g d'àcid cítric i 12.05 g de citrat sòdic en 500 ml d'aigua destil·lada, pH 6.0) durant 20 minuts. Un cop refredades, es bloqueja la peroxidasa endògena amb la solució 1 del LSAB[®]+Kit (peroxide block: 3% de peròxid d'hidrogen en aigua (v/v)). Després de tres rentats de 5 minuts amb tampó TBS-0.5% tritó, s'incuben les seccions amb 10% de sèrum normal de cavall en TBS-0.5% tritó (solució de bloqueig) durant 30 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es procedeix a l'incubació amb l'anticòs primari, diluït adequadament en solució de bloqueig, durant tota la nit a 4°C en una cambra humida. Al dia següent, després de tres rentats de 5 minuts amb TBS-0.5% tritó, s'incuben les seccions amb la solució 2 del LSAB[®]+Kit (Biotinylated Link: IgG anti-rabbit, anti-mouse i anti-goat biotinilitzades) durant 15 minuts a temperatura ambient. A continuació, es fan uns altres tres rentats

amb TBS-0.5% tritó i es procedeix a l'incubació amb la solució 3 del LSAB[®]+Kit (Streptavidin-HRP: Streptavidina conjugada a peroxidasa) durant 15 minuts a temperatura ambient. Per a la visualització de la reacció de la peroxidasa, s'utilitza una solució que conté 0.05% de diaminobenzidina i 0.01 % de peròxid d'hidrogen en TB.

Pel doble marcatge immunohistoquímic, es segueix un protocol en dues etapes. En primer lloc les seccions s'incuben amb el primer anticòs primari i la immunoreacció es visualitza amb diaminobenzidina i peròxid d'hidrogen, com s'ha descrit anteriorment. A continuació, les seccions s'incuben amb l'altre anticòs primari. En aquest cas, la immunoreacció es visualitza amb una solució que conté 0.01% de benzidina, 0.025% nitroferrocianat sòdic en un tampó fosfat sòdic 0.01 M (pH 6.0) i 0.005% de peròxid d'hidrogen. D'aquesta manera, es pot reconèixer el primer anticòs amb la presència d'un precipitat homogeni de color marronós, i el segon anticòs, amb la presència d'un precipitat granulat de color blau fosc.

Es fa un contrast de nuclis amb hematoxilina durant 2 minuts. Abans del muntatge amb DPX, es deshidraten les mostres fent-les passar per una sèrie de solucions de concentració creixent d'etanol (50 %, 70%, 95% i etanol absolut) i 5 minuts en xilol (3 vegades). L'observació de les preparacions es realitza mitjançant un microscopi Nikon Eclipse 90i amb un software Nikon ACT-1 versió 2.63.

3.7.1.1. Anticossos utilitzats

Els anticossos primaris utilitzats per les tincions immunohistoquímiques han estat: anticòs policlonal de conill anti-SSAO de pulmó boví preparat anteriorment pel nostre laboratori (Lizcano et al., 1998) 1:500, l'anticòs policlonal anti-SSAO de pulmó boví recentment purificat a partir de sang de conill inunitzat 1:500 (veure Material i Mètodes 7.1), anti- β A4 amiloide (Boehringer-Mannheim) 1:10, mouse anti-Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) (Novocastra) 1:50.

3.7.2. Procediment general per a mostres congelades i fixades amb acetona

Aquest capítol s'ha realitzat en el laboratori del Dr. Van Nostrand (SUNY, Stony Brook, NY, USA) i les mostres s'han obtingut de seccions de cervells ratolins *wild types* i

transgènics (Tg-SwDI) que expressen la proteïna APP amb la mutació Swedish K670N/M671L i Dutch/Iowa E693Q/D694N sota el control del promotor de ratolí Thy1.2 (Davis *et al.*, 2004).

Les seccions es descongelen sota un assecador d'aire suau, es fan tres rentats amb PBS i es bloquegen amb tampó de bloqueig (Invitrogen) durant 30 minuts a temperatura ambient. Després de 3 rentats amb PBS, s'incuba amb l'anticòs primari a la dilució adequada en PBS durant tota la nit a 4°C. Al dia següent, es fan 3 rentats més amb PBS i es procedeix a l'incubació amb l'anticòs secundari conjugat a peroxidasa durant 1 hora a temperatura ambient. A continuació, i després dels corresponents rentats amb PBS, es visualitza la immunotinció mitjançant la incubació amb una solució de diaminobenzidina estable (Invitrogen) durant 5-15 minuts a temperatura ambient. Un cop passat el temps adequat, la reacció s'atura amb aigua destil·lada. A continuació, es procedeix al contrast nuclear amb tinció amb hematoxilina. Abans del muntatge final de les seccions, es deshidraten les mostres amb una bateria de concentració creixent d'etanol (80%, 95% i absolut) i xilol.

3.7.2.1. Anticossos utilitzats

Els anticossos utilitzats per aquest tipus de seccions han estat: goat anti-VAP-1 E-19 i goat anti-VAP-1 S-13 (Santa Cruz Biotech) 1:25, anticòs monoclonal 66.1 que reconeix els residus 1-5 del pèptid A β humà conjugat a HRP 1:100, anti-goat IgG HRP 1:200 (Santa Cruz Biotech).

4. TRANSFECCIÓ TRANSITÒRIA DE LA LÍNIA CEL·LULAR A7r5

4.1. Plasmidis utilitzats

Per dur a terme experiments de transfecció transitòria en cèl·lules A7r5 s'ha utilitzat: el vector pEGFP-C3 (BD Biosciences Clontech) i el vector pCMV-SPORT6 que conté el cDNA de la VAP-1, obtingut de l'ATCC (Image Clone ID: 6193046, GenBank ID: BC050549).

4.2. Amplificació de plasmidis

4.2.1. *E. Coli*: soca, medis i sistemes de cultiu

S'ha utilitzat la soca d'*Escherichia coli* DH5 α per la manipulació i amplificació de plasmidis degut a la seva elevada eficiència de transformació. Els medis de cultiu utilitzats han estat: LB líquid (5 g/L d'extracte de llevat, 5 g/L NaCl, 10 g/L peptona, pH 7.2) i sòlid (LB líquid, 12 g/L agar). Per a la selecció de clons, que hagin incorporat plasmidis que els hi ofereixin resistència a algun antibiòtic, s'han emprat medis selectius amb ampicilina (50 μ g/ml) o kanamicina (30 μ g/ml) segons correspongués.

Els cultius d'*E. Coli* s'han realitzat en erlenmeyers de 50 ml i en càpsules de Petri amb 20-30 ml de medi LB sòlid. La soca s'ha mantingut en càpsules de Petri amb 20-30 ml de LB sòlid, cultivades després de la inoculació durant 18 h a 37°C i, posteriorment, conservades a 4°C. És recomanable fer un subcultiu cada mes. Es conserven també cultius estoc glicerinat d'1.5 ml en medi LB líquid al 15-20% de glicerol a -80 °C.

4.2.2. Transformació

Per a la transformació de cèl·lules bacterianes competents amb el plasmidi d'interès, s'afegeixen 2 μ l del plasmidi a 50 μ l de cèl·lules DH5 α (de l'estoc a -80°C) i es reserven en gel durant 30 minuts. A continuació es realitza un shock tèrmic de 45 segons a 42°C i, posteriorment, es deixa en gel durant 2 minuts. S'afegeixen 250 μ l de SOC (20 g/L triptona, 5 g/L extracte de llevat, 0.5 g/L NaCl, 19 g/L MgCl₂, 4 g/L glucosa) i es manté en agitació constant durant 1 hora a 37 °C.

4.2.3. Creixement i selecció de colònies

En dues plaques amb medi LB sòlid amb el corresponent antibiòtic de selecció segons el plasmidi, es sembren 50 μ l de cèl·lules transformades i es deixen a 37 °C durant tota la nit. L'endemà, es seleccionen les colònies aïllades obtingudes i es fan créixer en tubs estèrils amb 5 ml de medi LB líquid i l'antibiòtic corresponent en agitació constant a 37°C durant tota la nit. El dia següent, amb els 5 ml obtinguts, s'inoculen 200 ml de medi

líquid LB i l'antibiòtic corresponent en un erlenmeyer de 500 ml i s'incuba durant tota la nit a 37 °C en agitació constant.

4.2.4. Extracció i purificació del material genètic

Segons la quantitat de DNA final a purificar i del material de partida, s'ha fet ús de diferents tipus de columnes contingudes en dos *kits*: QIAprep®Spin Miniprep Kit i QIAGEN®Plasmid maxi kit (Quiagen) seguint les especificacions dels proveïdors.

4.2.5. Quantificació de la concentració de DNA

La concentració de DNA s'obté a partir de la lectura de l'absorció a 260 nm ([DNA] (ng/μl) amb un espectrofotòmetre (Shimadzu UV-160A). S'ha de tenir en compte la dilució que s'ha realitzat prèviament. En el nostre cas, realitzem una dilució de 1:25 (192 μl aigua destil·lada estèril i 8 μl de DNA). La puresa de la mostra es determina per la relació (A_{260}/A_{280}) i el valor obtingut haurà d'estar dins el rang 1.8 - 2.

4.3. Protocol de transfecció amb Fugene6

En aquest treball, s'ha fet ús del reactiu Fugene6 (Roche) per transferir DNA dins les cèl·lules eucariotes A7r5. Aquest reactiu està constituït per una mescla de lípids que s'acomplexen i transporten el DNA dins la cèl·lula eucariota.

Les transfeccions transitòries s'han portat a terme rutinàriament en plaques de cultiu de 6 pous (9.5 cm²/pou). Les cèl·lules es sembren a una densitat de 40.000 cel/ml i es deixen assentar durant 24 hores. Passat aquest temps, es canvia el medi de les cèl·lules (medi complet) i es procedeix a preparar el medi de transfecció. Sota la campana de flux laminar, es preparen tantes mescles de transfecció com pous o plaques a transfectar. Per cada pou d'una placa de 6 pous, es preparen 97 μl de medi Optimem (Gibco) i 3 μl de reactiu Fugene6 i es deixen durant 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament, s'afegeix el volum corresponent a 1-2 μg de DNA i, passats 15 minuts, s'addiciona la mescla al medi de cultiu. Després 48 hores, es procedeix al tractament o llistat de les cèl·lules corresponent.

5. OBTENCIÓ DE LÍNIES ESTABLES VAP-1/SSAO EN CÈL·LULES A7r5

L'objectiu d'aquesta part del treball ha consistit en transfectar establement el gen de la VAP-1/SSAO humà en cèl·lules A7r5. En aquest sentit, ha calgut la construcció d'un vector recombinant que contingués el gen d'interès i oferís dos punts de selecció diferent.

5.1. Construcció del vector recombinant

Per a la construcció del vector recombinant s'ha partit del vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen), que ofereix resistència a 2 antibiòtics diferents (ampicilina i neomicina), i s'hi ha clonat el gen VAP-1, el qual estava contingut en el vector pCMV-SPORT6 obtingut de l'ATCC.

5.1.1. Digestió

El vector pcDNA3.1(+) es digereix amb *EcoI* i *NotI* (Roche), i el vector pCMV-SPORT6 amb l'inserit de la VAP-1 amb *EcoRI*, *NotI* i *Scal* (Roche). El procés de digestió es du a terme incubant 1-3 µl d'DNA, 1 µl de cada enzim de restricció, 5 µl de tampó corresponent als enzims utilitzats, i aigua estèril fins a arribar a 50 µl de volum final, durant 1.5 hores a 37°C. Al producte digerit, s'hi afegeixen 10 µl de tampó de càrrega (Sigma-Aldrich) i es conserva a 4°C fins al seu ús.

5.1.2. Separació del material genètic per electroforesi en gels d'agarosa

Els àcids nucleics es separen mitjançant l'electroforesi en gels d'agarosa en tampó TAE (Tris 40 mM, àcid acètic 20 mM i EDTA 2 mM, pH 8.1).

Les mostres digerides, i amb tampó de càrrega, es carreguen en un gel d'agarosa 0.8% (0.8 g d'agarosa, 100 ml TAE i 5 µl de bromur d'etidi (d'un estoc 1 mg/ml)). Es carreguen 10 µl de mostra per pou i 15 µl de marcadors de pes molecular (1Kb DNA ladder, Invitrogen) i es fa córrer el gel a 90 V durant 1.5 hores. Les bandes de DNA es visualitzen amb un transil·luminador d'UV Uvatom-70 (Atom) i les fotografies obtingudes dels gels s'han realitzat amb una càmera Polaroid DS43.

5.1.3. Purificació de les bandes de DNA

Els fragments de DNA es recuperen tallant la banda d'interès i purificant-la amb columnes *QIAquick gel extraction kit* (Qiagen) seguint les especificacions del proveïdor. En el nostre cas, la digestió del vector buit de pcDNA3.1(+) dóna lloc a una banda de 5.4 Kb que és la corresponent al vector obert. Per altra banda, la digestió del vector pCMV-SPORT6 amb l'inserit de la VAP-1 dóna lloc a tres bandes diferents, i en aquest cas, la banda d'interès és la de 4072 pb que correspon a l'inserit del gen de la VAP-1.

5.1.4. Lligació

Un cop purificades les bandes d'interès, es procedeix al procés de lligació fent servir el *Rapid DNA ligation Kit* (Roche) seguint les indicacions del proveïdor, a temperatura ambient durant tota la nit.

5.1.5. Amplificació i comprovació del vector obtingut

Un cop obtingut el producte de lligació, s'amplifica el vector transformant en cèl·lules DH5 α i seleccionant colònies resistents (veure Material i Mètodes 4.2). A continuació, s'extrau i es purifica el DNA amb el *kit* QIAprep[®] Spin Miniprep Kit. Per tal de comprovar que el procés de lligació s'ha realitzat correctament i s'ha obtingut el vector d'interès, cal digerir una part del DNA obtingut del clon seleccionat i fer-lo córrer en un gel d'agarosa. En el nostre cas, es realitza una digestió amb *EcoRI*, *NotI* i *SpeI* (Roche) i s'obtenen 4 bandes en un gel d'agarosa 0.8%, les quals confirmen l'obtenció del vector pcDNA3.1(+) amb l'inserit de la VAP-1.

5.2. Procediment general per a l'obtenció de línies estables VAP-1/SSAO en cèl·lules A7r5

Per a la obtenció de les línies estables es transfecten les cèl·lules A7r5 amb el vector pcDNA3.1(+) amb l'inserit de la VAP-1. Per a la selecció de transfectants s'utilitza medi complet amb un compost anàleg a gentamicina, el G418 (Invitrogen), a una concentració final de 400 μ g/ml.

El G418 és un aminoglicòsid d'estructura similar a la neomicina, gentamicina i kanamicina, i per tant, els clons que hagin incorporat el plasmidi transfectat seran resistents a aquest antibiòtic. Prèviament, s'ha de realitzar una corba de toxicitat per tal de confirmar que els clons control, no transfectats, no sobreviuen al medi de selecció.

La transfecció amb el reactiu Fugene6 (veure Material i Mètodes 4.3) es realitza en una placa de 100 mm de diàmetre, i després d'una setmana (amb canvi de medi complementat amb G418 cada 3-4 dies), les cèl·lules es tripsinitzen i es sembren en una nova placa de 100 mm de diàmetre diluïdes 1:100. Passades 24 hores, es torna a afegir l'antibiòtic de selecció G418 a 400 µg/ml, i es deixen créixer les colònies durant dues setmanes més. A continuació, es repiquen 15 colònies aïllades mitjançant cilindres de clonatge (Bel-Art Products), i es sembren separatament en pous de plaques de 6 pous. Després de 24 hores, s'addiciona G418 a una concentració de 100 µg/ml al medi i es deixen créixer els clons durant un altre mes (amb canvi de medi complementat amb G418 cada 3-4 dies). Passat aquest temps, es tripsinitzen els clons, es dilueixen a la meitat sembrant-los en plaques de 6 pous, i es deixen créixer seguint el subcultiu rutinari.

5.3. Caracterització i amplificació de les línies estables

Per tal de comprovar que els clons obtinguts expressen la proteïna d'interès, es llisen les cèl·lules (veure Material i Mètodes 2.4.2) i se'n detecta l'expressió de la VAP-1 per Western-blot (veure Material i Mètodes 3.5). Així mateix, per comprovar que l'expressió és estable, es llisen cèl·lules d'un mateix clon a diferents passatges (1,3 i 5) i se'n detecta l'expressió per Western-blot. Per altra banda, es determina l'activitat SSAO (veure Material i Mètodes 3.3) dels llisats cel·lulars (veure Material i Mètodes 2.4.1) per observar que la proteïna expressada és enzimàticament activa.

Tots els clons positius, és a dir, que sobreexpressen la VAP-1, es fan créixer amb medi complet suplementat amb G418 (100µg/ml) en flascs de 150 cm² per a la posterior congelació i preservació de la línia cel·lular.

6. EXPERIEMENTS D'ACTIVACIÓ DE LA SSAO

6.1. Activació per plasma humà

Es determina radiomètricament l'activitat SSAO plasmàtica, SSAO de microsomes de pulmó boví, de microsomes de pulmó humà, de preparacions de microvasos o de meninges humanes segons el mateix mètode explicat anteriorment (veure Material i Mètodes 3.3) amb ^{14}C -benzilamina 100 μM , 2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ com a substrat, però en aquest cas el tampó utilitzat és TPK 50 mM, pH 7.2. L'experiment d'activació consisteix en preincubar la mescla de reacció a 37 °C amb una quantitat de plasma determinada durant 30 minuts.

6.2. Component activador del plasma humà

Es parteix de 200 ml de plasma que es concentren sota pressió de nitrogen fins a un volum de 40 ml mitjançant concentradors (Amicon) amb membranes de 40 kDa de porus. Seguidament es recull el filtrat i es concentra amb centrífons amb porus de 10 kDa de diàmetre (Millipore), fins a un volum de 2 ml. Es recull el filtrat final i es liofilitza durant tota la nit, resuspenent-lo en 0.5 ml de TPK 50 mM, pH 7.2.

A continuació, i tal i com s'ha descrit anteriorment pel plasma humà, s'assagen diferents volums d'aquest filtrat respecte una quantitat determinada de preparació enzimàtica. S'ha de realitzar una preincubació de 30 minuts abans d'incubar amb el substrat.

6.3. Activació per Lisofosfatidilcolina

En els experiments d'activació de la SSAO per diferents quantitats de lisofosfatidilcolina (Tipus V de cervell boví, Sigma-Aldrich), es segueix el mateix procediment de preincubació d'aquest compost amb una determinada quantitat de teixit durant 30 minuts. El rang de concentració final de lisofosfatidilcolina utilitzat és de 5-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En aquest cas, també cal la prèvia preincubació amb L-deprenil 10 μM durant 30 minuts més per inhibir la MAO-B.

6.4. Activació per un component del medi DMEM

Dins d'aquest apartat, es segueix el mateix procediment descrit per tots els experiments d'activació de la SSAO. Els components que s'han assajat són; medi DMEM D6546 (Sigma-Aldrich), DMEM D6046 (Sigma-Aldrich), DMEM D5671 (Sigma-Aldrich), DMEM F-12 21331020 (Gibco BRL), BME (PAN Biotech), M199 (Gibco BRL), complex vitamínic MEM 6895 (Sigma-Aldrich), complex d'aminoàcids M5550 i M7145 (Sigma-Aldrich), glutamina (Sigma-Aldrich), fenol roig (Sigma-Aldrich), i diferents sals, tals com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2 \cdot H_2O$, $Fe(NO_3)_2$, $NaHCO_3$ i NaH_2PO_4 .

7. PURIFICACIÓ D'ANTICÒS ANTI-SSAO AMB COLUMNA DE PROTEÏNA A

El sèrum immunitzat contra la proteïna SSAO purificada a partir de pulmó boví s'ha obtingut d'anteriors treballs del nostre laboratori (Lizcano *et al.*, 1998). Diferents alíquotes d'antisèrum, conservades a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, han estat testades mitjançant Western-blot (veure Material i Mètodes 3.5) utilitzant mostres de microsomes pulmó boví (1 μg de proteïna total). Tots aquells sèrums utilitzats en els immunoblots, en els quals s'ha observat reconeixement de la proteïna SSAO, s'ajunten i es dilueixen amb PBS (1:4) fins a obtenir un volum final de 100 ml. Abans de la purificació a través de la columna de proteïna A, es filtra el sèrum inicial i diluït amb filtres de 0.2 μm i se'n determina la concentració de proteïna total pel mètode de Bradford (veure Material i Mètodes 3.2).

7.1. Utilització de la columna de proteïna A

El procés de purificació es porta a terme mitjançant una columna *HiTrap rProteinA FF* d'1 ml (Amersham). Abans de la seva utilització, es fan rentats de la columna amb 10 volums de PBS a un flux de 1 ml/min mitjançant una bomba peristàltica P1 (Pharmacia) prèviament calibrada. Seguidament, es fa passar el sèrum inicial 3 vegades al mateix flux anterior. Per retirar la proteïna que no s'ha unit específicament, es fan rentats de la columna amb tampó que conté PBS i 0.4 M NaCl. Es va mesurant la concentració de proteïna del rentats pel mètode de Bradford, i una vegada s'ha retirat tota la proteïna que no s'ha unit a la columna, es procedeix al procés d'elució mitjançant l'aplicació del tampó d'elució (50 mM glicina pH 2.5). Les fraccions d'eluït es recullen en tubs

ependorf de 1.5 ml que contenen 200 µl de Tris 1 M pH 8.0, dels quals se'n determina la concentració de proteïna. Seguidament, s'ajunten totes aquelles fraccions que contenen una major concentració de proteïna total (aproximadament 5 ml) i es guarden a 4 °C durant tota la nit per a la renaturalització de l'anticòs. L'endemà, es realitza una diàlisi en front a 3 L de PBS, 150 mM NaCl (2 canvis de 1.5 hores) i s'aliquoten i guarden a -20 °C. La columna es renta amb 10 volums de PBS i les fraccions d'eluit amb menys quantitat de proteïna s'ajunten i es tornen a passar per la columna seguint tot el procés, de manera que s'obtenen dues purificacions consecutives. La columna es regenera fent passar en aquest ordre: 20 volums d'urea 2 M, aigua destil·lada, 20 volums de LiCl 2 M i aigua destil·lada. La columna es guarda amb 20% d'etanol a 4 °C.

7.2. Comprovació de l'eficiència i puresa dels anticossos obtinguts

S'ha comprovat l'eficiència dels anticossos mitjançant Western-blot (veure Material i Mètodes 3.5) utilitzant mostres de microsomes pulmó boví (1 µg de proteïna total) i meninges de cervell humà (30 µg de proteïna) diluint l'anticòs purificat 1:1500. Així mateix, s'ha realitzat una immunohistoquímica (veure Material i Mètodes 3.7.1.) amb seccions parafinades de cervell humà diluint l'anticòs purificat 1:500. Per determinar el grau de purificació i de puresa de les preparacions, s'ha realitzat una electroforesi (veure Material i Mètodes 3.4) en un gel (10%) en condicions reductores i se n'han visualitzat les bandes obtingudes mitjançant la tinció de Comassie (veure Material i Mètodes 3.4.1).

8. TRACTAMENT DE DADES

Els resultats s'expressen com la mitjana \pm error estàndard (SEM). Quan es realitza la comparació de dos grups de dades independents, es realitza un test *t*. Quan la comparació de dades es realitza entre més de dos grups, es realitza un test ANOVA d'un factor seguit d'un test de *Dunnnett* o de *Newman-Keuls*. Les diferències s'accepten com a significatives si el nivell de significació és inferior a 0.05 ($p < 0.05$). L'anàlisi estadístic de les dades i les representacions gràfiques s'han obtingut mitjançant el programa GraphPad Prism 3.0.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

RESULTATS I DISCUSSIÓ CAPÍTOL 1:

**LA SSAO EN EL SISTEMA CEREBROVASCULAR HUMÀ EN CONDICIONS
FISIOLÒGIQUES I EN MALALTS D'ALZHEIMER AMB ANGIOPATIA
CEREBRAL AMIOLIDE**

RESULTATS CAPÍTOL 1:

LA SSAO EN EL SISTEMA CEREBROVASCULAR HUMÀ EN CONDICIONS FISIOLÒGIQUES I EN MALALTS D'ALZHEIMER AMB ANGIOPATIA CEREBRAL AMIOLIDE

A partir de resultats previs del nostre grup de treball, on es descrivia la presència de la SSAO en el teixit cerebrovascular humà (Castillo *et al.*, 1998), l'objectiu principal del present estudi va ser caracteritzar aquesta amino oxidasa, i les possibles funcions de la seva activitat enzimàtica, en aquest teixit, en condicions fisiològiques, i especialment, en condicions patològiques associades a desordres vasculars, com la malaltia d'Alzheimer (AD) associada a l'Angiopatia Amiloide Cerebral (CAA).

1.1. Caracterització bioquímica de microvasos d'origen humà en condicions fisiològiques

En aquest treball, es van dur a terme dos mètodes diferents de preparació de microvasos. En els dos casos, degut a la pròpia naturalesa del teixit, l'extracció prèvia de la membrana meníngica va ser indispensable pel posterior i correcte aïllament dels microvasos cerebrals. Aquestes membranes van ser homogeneïtzades i guardades en alíquotes a -80°C fins la seva utilització.

El primer mètode de preparació de microvasos va ser a partir dels protocols establerts per Dallaire *et al.* (1991) i Grammas *et al.* (1991) (veure Material i Mètodes 2.2.2.2). En aquest cas, la centrifugació diferencial amb dextrà T-70 separa el material neuronal i glial donant lloc a un primer *pellet* format per capil·lars, eritròcits, contaminants proteics, nuclis i restes cel·lulars. La filtració d'aquesta fracció a través d'una membrana de nylon permet la separació entre els microvasos cerebrals i aquells vasos amb un diàmetre superior a $210\ \mu\text{m}$. La segona filtració per una membrana de $53\ \mu\text{m}$ permet recollir la fracció de microvasos deixant eluir els contaminants proteics.

El segon mètode de preparació de microvasos es va basar en el protocol de Mrsulija *et al.* (1976) (veure Material i Mètodes 2.2.2.1). En aquest cas, la centrifugació amb el

gradient discontinu de sacarosa permet separar el material vascular. Concretament, la fracció de microvasos és el *pellet* final després de la centrifugació a 58.000 g durant 30 minuts.

1.1.1. Determinació de la puresa dels microvasos cerebrals mitjançant l'ús de marcadors enzimàtics

Les cèl·lules endotelials associades a cervell expressen elevats nivells de l'enzim γ -glutamil transpeptidasa (GGTP; EC 2.3.2.2) (Albert *et al.*, 1966), i aquest fet, va permetre utilitzar aquesta proteïna com a marcador enzimàtic per monitoritzar el procés de purificació dels microvasos. Un altre enzim addicional que s'utilitza com a marcador del procés de purificació, és la fosfatasa alcalina, degut a que es troba localitzada preferentment en capil·lars (Manocha S.L., 1970).

El valor d'activitat específica de la γ -glutamil transpeptidasa de la fracció de microvasos obtinguts a partir del primer mètode de preparació (filtració per malles de nylon) va ser de 60.23 ± 3.41 nmol/min·mg. Aquest valor és del mateix ordre que l'obtingut per Dallaire (1991). En canvi, el valor obtingut a partir del segon mètode (gradient de sacarosa) va ser de 11.75 ± 0.75 nmol/min·mg, és a dir, 5.1 vegades inferior a l'anterior (Taula 1.1).

En el cas de la fosfatasa alcalina, el valor d'activitat específica del microvasos obtinguts mitjançant el mètode de filtració a través de les malles de nylon va ser de 78.38 ± 4.86 nmol/min·mg, i amb el mètode del gradient de sacarosa va ser de 16.85 ± 2.26 nmol/min·mg. Per tant, en aquest cas també es va obtenir un valor d'activitat específica de 4.6 vegades superior usant el primer mètode respecte el segon.

1.1.2. Comparació dels dos mètodes de preparació de microvasos

Amb el mètode de la filtració a través de les malles de nylon, tot i ser més curt i més senzill metodològicament, s'obtenia un escàs rendiment en quant a la proteïna total. És a dir, a partir de 10 g de còrtex de cervell humà, tan sols es recollia 1 mg total de fracció de microvasos. En canvi, utilitzant el mètode del gradient de sacarosa, a partir de la mateixa quantitat de mostra, s'obtenien 18 mg de proteïna total (Taula 1.1). Tot i així,

basant-nos en els marcadors enzimàtics utilitzats per determinar la puresa dels microvasos, fosfatasa alcalina i γ -glutamil transpeptidasa, els microvasos preparats a partir de la modificació del mètode de Dallaire *et al.* (1991), resultaven aproximadament 5 vegades més purs que els preparats a partir del mètode de Mrsulija *et al.* (1976). A més, l'activitat específica de la SSAO de la fracció de microvasos, expressada en pmol/min·mg proteïna, obtinguda amb el primer mètode també era 3.5 vegades més elevada (Taula 1.1).

Així doncs, els microvasos obtinguts amb el primer mètode proporcionaven molta menys proteïna, però un grau de purificació més elevat i un enriquiment en SSAO. Degut a això, en aquest estudi es van haver de preparar microvasos seguint els dos mètodes depenent de la quantitat de mostra de la qual es partia. En general, es va usar el mètode d'aïllament de Dallaire *et al.* (1991) i Grammas *et al.* (1991), donat l'interès en tenir una activitat específica SSAO més elevada. En algunes parts del treball però, quan es van realitzar estudis de mostres de cervells patològics, es va optar per preparar els microvasos a partir del mètode de Mrsulija *et al.* (1976), ja que la dificultat en l'obtenció de mostres patològiques requeria un màxim rendiment en quant a la proteïna total.

	Concentració Proteïna (mg/ml)	Proteïna Total (mg)	Volum (ml)	γ -Glutamil Transpeptidasa (nmol/min mg)	Fosfatasa Alcalina (nmol/minmg)	SSAO (pmol/minmg)
Filtració per malles de nylon	0.3	0.9	3	60.23 \pm 3.41	78.38 \pm 4.86	25.27 \pm 2.29
Gradient de sacarosa	3.6	18	5	11.75 \pm 0.75	16.85 \pm 2.26	7.06 \pm 0.12

Taula 1.1. Comparació entre els dos mètodes de preparació de microvasos utilitzats a partir de 10 g de còrtex de cervell humà: filtració per malles de nylon (Dallaire *et al.*, 1991, i Grammas *et al.*, 1991) i utilitzant el gradient de sacarosa (Mrsulija *et al.*, 1976). Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat.

1.2. Caracterització de la SSAO en microvasos i vasos leptomeningis de malalts d'Alzheimer amb Angiopatia Cerebral Amiloide

Una vegada caracteritzada la SSAO en teixit cerebrovascular humà en situacions fisiològiques, es va procedir a l'estudi del comportament de l'esmentat enzim en condicions patològiques. Concretament, es va caracteritzar la SSAO en la malaltia d'AD associada a CAA. El fet que la SSAO estigui àmpliament localitzada en vasos (Precious i Lyles, 1988), i la degeneració vascular estigui estretament relacionada amb la malaltia d'AD (Vinters *et al.*, 1996; de la Torre, 2002), va suggerir la possible contribució d'aquesta amino oxidasa a aquesta patologia. Per altra banda, la implicació de l'estrès oxidatiu amb l'AD (Behl, *et al.* 1994; Markesbery i Carney, 1999), i concretament, amb desordres vasculars associats a aquesta patologia (Thomas *et al.*, 1996; Suo *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 2002), plantejava la possibilitat que els productes generats per l'acció catalítica de la SSAO pugessin intervenir en l'esmentat estrès oxidatiu associat a la malaltia.

Es van obtenir les mostres patològiques i els corresponents controls del Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic de Barcelona. La preparació de microvasos, tant de pacients d'AD com de mostres controls, es va realitzar mitjançant el mètode del gradient de sacarosa (Mrsulija *et al.*, 1976), ja que d'aquesta manera, en obtenir un major rendiment en quant a la proteïna total, permetia extreure més informació per cada preparació.

1.2.1. Constants cinètiques de la SSAO procedent de preparacions de microvasos i meninges de mostres control i pacients d'AD amb CAA

En primer lloc, es van determinar les constants cinètiques de la SSAO de les preparacions de microvasos i meninges control i de pacients d'AD amb CAA. Es va realitzar una corba Michaelis-Menten on es va analitzar la velocitat de la reacció a diferents concentracions de benzilamina; 5, 10, 25, 50 i 100 μM (2 mCi/ mmol). En els dos casos, es va realitzar una preincubació de 30 minuts amb L-deprenil 1 μM per tal d'inhibir la possible MAO-B. Les constants cinètiques obtingudes es presenten a la taula 1.2.

En primer lloc, els resultats obtinguts (Taula 1.2), mostraven clares diferències enzimàtiques en el valor de V_{max} entre la SSAO de meninges i la de microvasos, mentre que el valor de K_m es mantenia pràcticament constant en els dos casos. Així doncs, s'observava una major eficiència catalítica, expressada en termes de V_{max}/K_m , en el cas de la SSAO present en meninges respecte a la de microvasos, i per tant, podríem estar parlant de dues espècies activament diferents.

En comparar l'activitat SSAO entre mostres AD i mostres control (Taula 1.2), en el cas de la preparació de meninges humanes, els resultats no van permetre concloure diferències prou significatives ni en el valor de K_m ni en el de V_{max} . En canvi, en el cas de la preparació de microvasos, s'obtenia un augment en el valor de V_{max} ; essent de 18.590 ± 2.043 pmol/min·mg proteïna en el cas de mostres de pacients d'AD ($n=4$), comparat amb el valor de 11.198 ± 2.043 pmol/min·mg proteïna en el cas de mostres control ($n=4$). En quant al valor de K_m , no es van detectar diferències estadísticament diferents entre la SSAO de microvasos de pacients d'AD comparat amb les mostres control.

	K_m (μM)	V_{max} (pmol/ min · mg)
Microvasos Control (n= 4)	11.408 ± 0.527	11.198 ± 2.043
Microvasos AD (n = 4)	13.855 ± 2.179 (NS)	18.590 ± 2.043 (**)
Meninges Control (n= 2)	16.545 ± 1.155	452.650 ± 85.750
Meninges AD (n= 4)	19.253 ± 5.894 (NS)	$391.675 \pm 87,850$ (NS)

Taula 1.2. Constants cinètiques de la SSAO de microvasos i meninges de pacients control i pacients d'AD amb CAA utilitzant benzilamina com a substrat (0, 5, 10, 50 i 100 μM). (**) $p < 0.01$; (NS) no significatiu ($p > 0.05$), comparant els valors cinètics de les preparacions de pacients d'AD respecte els corresponents controls, segons el test One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*.

1.2.2. Anàlisi de l'expressió SSAO en preparacions de meninges i microvasos cerebrals de mostres control i pacients d'AD amb CAA

Per tal de confirmar que l'augment en el valor de Vmax correspongués a un augment en l'expressió de la proteïna SSAO, es van analitzar les mostres de microvasos i meninges de mostres de pacients d'AD amb CAA (n=2) i mostres control (n=2) per tècniques immunològiques utilitzant anticossos policlonals anti-SSAO de pulmó boví preparats pel nostre laboratori (Lizcano *et al.*, 1998). Els resultats obtinguts (Fig. 1.1) mostraven una sobreexpressió de la SSAO tant a nivell de microvasos com de meninges en malalts d'AD respecte els controls. En el cas de les preparacions de microvasos, l'anàlisi densitomètric de les bandes obtingudes en les dues mostres analitzades posava de manifest que la mitja de l'augment de l'expressió SSAO en el cas dels dos pacients d'AD era significativament més elevada, quadruplicant el percentatge respecte la mostra control analitzada paral·lelament. Així mateix, en el cas de les preparacions de meninges, la mitjana de l'augment de l'expressió SSAO es veia incrementada en dues vegades respecte l'expressió basal observada en els individus control.

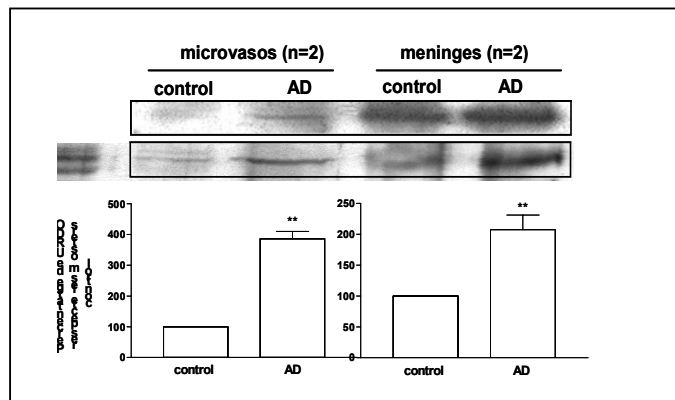


Figura 1.1. Western-blot anti-SSAO de preparacions de microvasos (50 µg) i meninges (30 µg) cerebrals humanes de mostres de pacients control (n = 2) i pacients d'AD amb CAA (n = 2). Anàlisi densitomètric (Unitats Relatives de Densitat Òptica) del percentatge d'expressió SSAO de les mostres de pacients d'AD respecte els controls. (**) $p < 0.05$ segons un test *t*.

1.2.3. Anàlisi immunohistoquímic de l'expressió SSAO de mostres control i pacients d'AD amb CAA

Per tal de confirmar la sobreexpressió de la SSAO en la patologia d'AD, es va procedir a l'anàlisi immunohistoquímic de 10 mostres de pacients d'AD i 8 mostres control (mostres obtingudes de del Banc de Teixits Neurològics de l'Hospital Clínic de Barcelona). Els pacients d'AD eren 5 homes i 3 dones, amb edat d'entre 68 a 82 anys i tots ells cursaven una demència progressiva associada a AD. Els 8 casos control estaven dins del mateix rang d'edat i no patien malalties neurològiques ni desordres metabòlics crònics. Després d'un examen neuropatològic complet, els casos d'AD van ser classificats en un estadi de III (3 casos) i VI (7 casos) en l'escala de Braak i Braak (Braak i Braak, 1991). Els cervells control no mostraven anormalitats, exceptuant la presència d'algunes plaques de β -amiloide en l'hipocamp de 2 casos. Aquesta part del treball es va realitzar al laboratori del Dr. I. Ferrer (Institut de Neuropatologia, Hospital Prínceps d'Espanya, L'Hospitalet del Llobregat, Barcelona).

Es va realitzar una tinció de les seccions utilitzant anticossos policlonals anti-SSAO de pulmó boví preparats pel nostre laboratori (Lizcano *et al.*, 1998). A la figura 1.2 es poden observar els resultats obtinguts, i en primer lloc, es poden corroborar estudis anteriors (Castillo *et al.*, 1999) de localització de SSAO en el cervell, on s'observa clarament l'expressió de la SSAO en vasos cerebrals humans de pacients control (Fig. 1.2A i 1.2B). L'esmentada expressió de la SSAO augmentava significativament en vasos de malalts d'AD (Fig 1.2D-F), augmentant la immunoreactivitat SSAO, especialment localitzada entre les capes íntima i muscular de les artèries amb angiopatia amiloide. Més concretament, a la figura 1.2F es pot apreciar la tinció de SSAO en cèl·lules musculars localitzades a la paret del vas.

Les seccions corresponents a pacients AD mostraven una forta tinció anti- β A (Fig. 1.2C) en vasos. En realitzar una doble immunotinció, utilitzant anticossos anti-SSAO (tinció marró) i anti- β A (tinció blau fosc), s'observa que la tinció dels dipòsits de β A anava acompanyada de l'augment en l'expressió de SSAO (Fig. 1.2G i 1.2H). Aquesta doble tinció permetia observar com els dipòsits de β A es trobaven localitzats a la perifèria dels dipòsits de SSAO (Fig. 1.2H), o en alguns casos, colocalitzats amb l'augment

d'expressió SSAO (Fig. 1.2G). En els vasos en els que no es detectava la presència de dipòsits de β A, la immunoreactivitat SSAO era comparable a la de els mostres control.

Per altra banda, en aquest treball també es va poder observar un increment en la immunoreactivitat de la Cu/Zn superòxid dismutasa I (SOD-I) associada a dipòsits d'amiloide en vasos de mostres d'AD (Fig. 1.2I). L'activació de mecanismes contra l'estrès oxidatiu suggerien una implicació d'aquest tipus de dany associat als vasos cerebrals en aquesta malaltia.

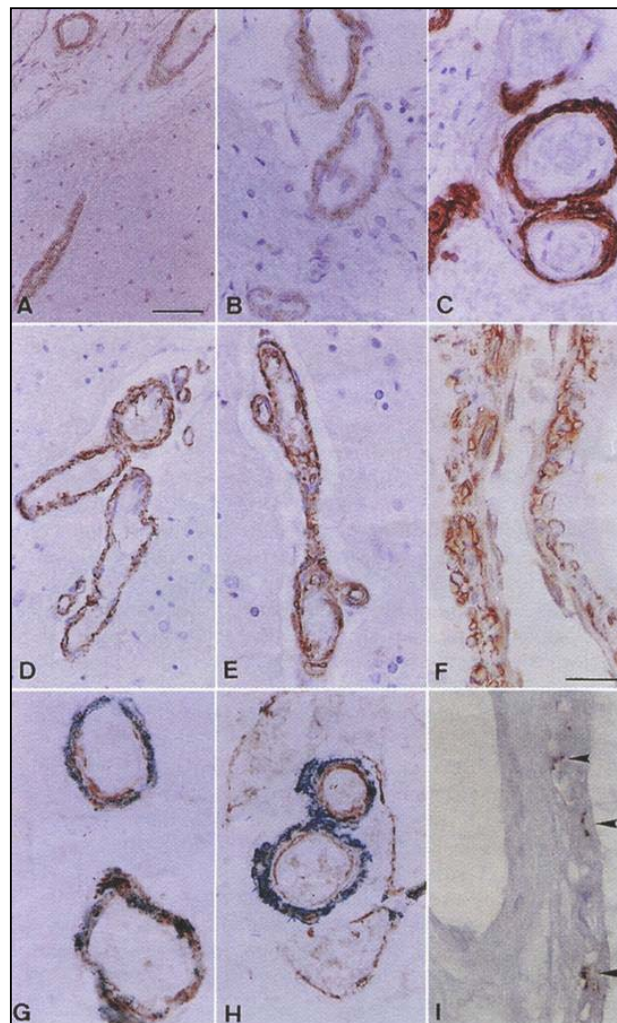


Figura 1.2. Immunoreactivitat SSAO en vasos cerebrals de pacients control (A, B) i pacients amb AD (D-F). Tinció de β A4 en vasos de pacients amb AD (C). Doble marcatge immunohistoquímic SSAO (tinció marró) i dipòsits de β A (tinció blau fosc) (G-H). Immunoreactivitat Cu/Zn SOD1 (fletxes) en vasos de pacients amb CAA associat a AD. Escala de les barres = 100 μ m (A), 50 μ m (B-E, G-I), 25 μ m (F).

DISCUSSIÓ CAPÍTOL 1

Un dels objectius principals d'aquest treball va ser aprofundir en l'estudi de la funció de l'activitat SSAO en teixit cerebrovascular humà, tant en condicions fisiològiques com patològiques, relacionades amb malalties neurodegeneratives. En primer lloc, es van posar a punt dos mètodes diferents per a la preparació de microvasos cerebrals.

Concretament, l'estandardització d'un mètode de preparació de microvasos mitjançant malles de nylon, modificació dels protocols de Dallaire *et al.*(1991) i Grammas *et al.* (1991), va permetre obtenir una preparació més pura i més enriquida en la proteïna SSAO que el mètode utilitzat anteriorment per Mrsulija *et al.* (1976). Aquest mètode de preparació de microvasos va resultar d'una gran utilitat en estudis que es presentaran en els següents capítols. En canvi, en estudis amb cervells patològics, donada la dificultat d'obtenir aquest tipus de mostres, es va optar per utilitzar el mètode clàssic mitjançant el gradient de sacarosa (Mrsulija *et al.*, 1976), ja que s'obtenia un major rendiment en quant a la proteïna total.

Estudis previs del nostre grup ja havien demostrat la presència de la SSAO en el teixit cerebrovascular humà (Castillo *et al.*, 1998). En aquest cas, el nostre objectiu d'estudi va ser esbrinar la possible alteració de l'activitat i l'expressió d'aquesta amino oxidasa en la Angiopatia Amiloide Cerebral (CAA) lligada a la demència tipus Alzheimer (AD).

Diferents evidències bibliogràfiques van portar a pensar que la SSAO podria tenir una implicació en aquest tipus de patologia. En primer lloc, diferents estudis suggereixen un important component vascular en la malaltia d'AD (Kudo *et al.*, 2000; Grammas, 2000; Kalaria, 2002; Zlokovic, 2005). Una de les evidències més significatives ve donada per la presència de lesions vasculars associades a la malaltia, com la degeneració estructural i funcional de la microvasculatura (de la Torre, 2002) o la important incidència de CAA en pacients d'AD (Jellinger, 2002). El fet que la SSAO sigui un enzim que es troba localitzat en cèl·lules endotelials, i majoritàriament en cèl·lules de múscul llis, de vasos sanguinis, i per altra banda, el fet que els dipòsits anòmals de β A i el deteriorament de la vasculatura es correlacionin amb la malaltia d'AD, suggerien que

l'expressió i l'activitat catalítica de l'enzim es podrien trobar alterades en aquest tipus de patologia a nivell vascular.

Cal tenir present que la SSAO, mitjançant la seva acció catalítica, genera productes considerats com a font potencial de dany vascular. Els aldehids generats com a conseqüència de l'oxidació d'amines endògenes per part de la SSAO, el formaldehid en el cas de l'oxidació de metilamina, i el metilglioxal en el cas de l'oxidació de l'aminoacetona, són productes altament reactius, capaços de formar entrecreuament covalent amb proteïnes i DNA (Yu *et al.*, 1997), i potencialment inductors de dany vascular. L'H₂O₂, un dels altres productes de la desaminació oxidativa de la SSAO, donada la seva contribució a l'estrès oxidatiu, també ha estat considerada una font de neurotoxicitat i de dany vascular. En aquest sentit, l'AD és una malaltia multifactorial, on l'estrès oxidatiu hi juga un paper molt important. Diferents revisions confirmen aquesta relació (Behl, 1997; Markesbery i Carney, 1999; Vardarajan *et al.*, 2000; Gibson i Huang, 2005), i concretament s'ha descrit la implicació directa de l'H₂O₂ en la citotoxicitat induïda per β A (Behl *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 2002).

En el nostre estudi, en primer lloc, es van determinar les constants cinètiques de la SSAO present en microvasos i en meninges aïllades del teixit cerebrovascular humà. Cal destacar que la preparació de microvasos està altament enriquida en cèl·lules endotelials, en comparació amb l'elevada presència de múscul llis de la preparació de meninges. La diferent localització cel·lular de l'enzim podria implicar importants canvis cinètics. De fet, es va observar una eficiència catalítica de 30 vegades superior en el cas de la SSAO provinent de la preparació de meninges en comparació a la SSAO de microvasos cerebrals humans. Aquests resultats suggereixen que la SSAO, expressada constitutivament en meninges, tindria una funció principalment metabòlica, mentre que la SSAO endotelial, mitjançant un procés de regulació més fi, podria tenir un paper més important en la senyalització intracel·lular. De fet, anteriors treballs (Jaakkaola *et al.*, 1999) ja descriuen diferències estructurals i funcionals de la SSAO/VAP-1 depenent de la seva expressió en cèl·lules endotelials o en cèl·lules de múscul llis.

En comparar les constants cinètiques de la SSAO de preparacions de pacients d'AD amb CAA i els seus respectius controls, es va poder apreciar que la Vmax de la SSAO procedent de teixit patològic era significativament superior en el cas de la preparació de

microvasos. En canvi, el valor de Km en aquesta mateixa preparació no es veia alterat en comparació a la SSAO de mostres control. Aquestes dades suggerien que l'enzim de la microvasculatura en pacients d'AD era catalíticament més actiu, almenys en experiments *in vitro*. Contràriament, la SSAO provinent de la preparació de meninges presentava els mateixos valors de Km i Vmax en el cas de mostres de pacients d'AD com de mostres controls.

Cal tenir en compte que la SSAO/VAP-1 endotelial s'indueix en situacions d'inflamació (Salmi *et al.*, 1993), en canvi, la proteïna expressada en múscul llis sembla que no s'induiria sota aquests estímuls (Jaakkaola *et al.*, 1999). Així doncs, donada l'elevada implicació dels processos inflamatoris en la malaltia d'AD (Stuchbury i Munch, 2004), podria ser que l'enzim endotelial fos més susceptible a patir canvis en els seus nivells d'expressió i activitat que l'enzim constitutivament present en les cèl·lules de múscul llis. Aquests arguments podrien explicar l'increment d'activitat de la SSAO en la preparació de microvasos de pacients d'AD en comparació a les mostres control, i el fet de no haver obtingut diferències significatives en quant als valors de Vmax de les preparacions de meninges. Tot i així, en tractar-se de mostres humanes, s'obté una variabilitat important en quant a l'activitat SSAO entre els diferents individus, i per tant, caldria un nombre més elevat de mostres per completar l'estudi a nivell bioquímic.

A continuació, es va analitzar l'expressió de la proteïna en les mateixes preparacions, i els Western-blots van revelar un augment d'expressió SSAO en les preparacions procedents de pacients d'AD amb CAA comparativament als controls, tant a nivell de microvasos com de meninges. L'anàlisi densitomètric va revelar com l'augment en l'expressió SSAO era quatre vegades superior en les mostres d'AD en el cas de la preparació de microvasos, i dues vegades superior en el cas de la preparació de meninges. Degut a la dificultat en l'obtenció i el processament de mostres humanes, només es van poder realitzar l'anàlisi de les preparacions de dos pacients d'AD amb CAA i dos corresponents controls. Caldria augmentar el nombre de mostres per tal de poder obtenir un valor quantitatiu més acurat en el percentatge d'augment de l'expressió SSAO en aquesta malaltia. Tot i l'augment quantitatiu de l'expressió SSAO en el sistema cerebrovascular humà en AD, cal tenir en compte la possible falta de correlació entre l'expressió de la proteïna i la seva activitat. En el cas de la preparació de meninges, tot i que els nivells de proteïna SSAO eren superiors en pacients d'AD,

l'activitat no es veia incrementada. En canvi, en el cas de la preparació de microvasos procedents de pacients d'AD, on el percentatge en l'augment de l'expressió de la proteïna era major, aquest es correlacionava amb un augment en el valor Vmax de la SSAO.

El fet de no poder establir una correlació directa en tots els casos, entre el percentatge d'activitat i d'expressió SSAO, suggereix que es pugui tractar d'un mecanisme de regulació molt més fi i complicat, en el qual es podrien veure implicades modificacions post-traduccionals de l'enzim o en el que es requerís d'algun modulador que es perd durant el procés de preparació de la mostra. Per últim, i com ja s'ha comentat anteriorment, la variabilitat en l'activitat SSAO en els diferents mostres humanes, així com el temps emprat en aconseguir les mostres *post-mortem*, serien unes altres variables a tenir en compte a l'hora d'extreure conclusions sobre els resultats d'activitat SSAO obtinguts.

Per tal de confirmar els nivells d'expressió de la SSAO a nivell de cerebrovasculatura, es van realitzar anàlisis immunohistoquímics de cervells *postmortem* de 10 pacients amb la malaltia d'AD associada a CAA i 8 casos controls. Els resultats van permetre confirmar un increment en els nivells de proteïna SSAO en aquesta patologia. A més, es va observar que l'increment d'immunoreactivitat SSAO anava associat als dipòsits de β A, és a dir, que l'augment d'expressió de la proteïna es donava en aquells vasos afectats per CAA, la qual cosa suggeria la possibilitat que la SSAO pogués contribuir a la toxicitat en vasos induïda pels dipòsits de β A.

En conjunt, els resultats presentats suggerien que l'increment de SSAO en la patologia d'AD associada a CAA podia tenir una possible implicació en el dany vascular de la malaltia. L'augment d'expressió i d'activitat SSAO ferien augmentar els nivells dels productes catalítics, contribuint al deteriorament de la vasculatura cerebral. En primer lloc, els aldehids generats, el formaldehid i el metilglioxal, entre d'altres, s'han descrit com a forts inductors de la peroxidació lipídica i la formació de productes AGE (Yu *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1998; Mathys *et al.*, 2002). L'acumulació de productes AGE ha estat implicada en diverses patologies associades a complicacions vasculares com diabetis, arteriosclerosi i hipertensió (Brownlee, 2000). També s'ha descrit que aquests productes altament glicocilats poden afectar a les funcions cel·lulars a través de la unió al seu

receptor, RAGE. Concretament, en la patologia d'AD, diferents estudis han mostrat un augment en l'expressió d'aquest tipus de receptor (Yan *et al.*, 1998; Lue *et al.*, 2005), associat a un augment en l'estrès oxidatiu i la disfunció vascular. A més, l'acroleïna, un aldehyd que també pot ser generat per la desaminació oxidativa de la SSAO, ja s'ha identificat com un producte de peroxidació lipídica acumulat en la patologia d'AD (Calingasan *et al.*, 1999), corroborant la hipòtesi que la oxidació de proteïnes pot tenir un paper crucial en aquesta malaltia.

Per altra banda, en el nostre estudi també es va detectar una activació dels mecanismes contra l'estrès oxidatiu, expressat per l'increment en la immunoreactivitat de la proteïna SOD-I associada a dipòsits d'amiloide en vasos de mostres AD, suggerint una implicació del dany per estrès oxidatiu en aquest teixit. Així doncs, l'H₂O₂ generat per l'acció catalítica de la SSAO també podria ser una de les fonts d'estrès que contribuirien a l'angiopatia lligada a la patologia d'AD (Yu, 2001).

RESULTATS I DISCUSSIÓ CAPÍTOL 2:

**LA SSAO SOLUBLE PRESENT EN PLASMA HUMÀ EN LA MALATIA
D'ALZHEIMER**

RESULTATS CAPÍTOL 2:**LA SSAO SOLUBLE PRESENT EN PLASMA HUMÀ EN LA MALATIA D'ALZHEIMER**

Degut als resultats descrits anteriorment sobre l'estudi de la SSAO cerebrovascular relacionada amb la malaltia d'Alzheimer (AD), on es va observar una sobreexpressió de l'enzim, es va procedir a l'estudi de l'activitat SSAO plasmàtica de pacients amb aquesta malaltia, per tal de determinar si l'increment de la SSAO tissular anava acompanyat d'un increment en l'activitat de la forma soluble en aquesta patologia. Per altra banda, en el laboratori del Dr. Paul Szabo (Weill Medical College of Cornell University, New York, USA) es van analitzar els nivells de β - amiloide (β A) dels plasmes dels mateixos pacients, per tal de determinar la seva possible correlació amb la severitat de la malaltia i l'activitat SSAO plasmàtica dels diferents pacients. La immunoreactivitat de β A (40-42) en les mostres de plasmes es va determinar mitjançant la modificació del mètode de Du *et al.* (2001).

Les mostres de plasma humà es van obtenir del centre d'assistència Fundació ACE, Institut Català de Neurociències Aplicades de Barcelona. L'estudi es va realitzar amb un total de 104 mostres de pacients (35 homes i 69 dones) que no patien cap desordre metabòlic crònic. Les seves edats estaven compreses en un rang de 65 a 94 anys i la mitja d'edat corresponent als diferents grups es troba especificada a la taula 2.1. Els pacients patien demència tipus Alzheimer esporàdic segons el criteri NINCDS-ADRA (*National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke -Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*) (McKhann *et al.*, 1984) i es van dividir en 5 grups seguint l'escala GDS (*Global Deterioration Scale*) (Reisberg *et al.*, 1982): controls ($n=23$), els quals no presentaven desordres neurològics, AD lleu ($n=33$, GDS=3-4), moderat ($n=14$, GDS=5), moderat-sever ($n=15$, GDS=6) i sever ($n=19$, GDS=7). A la taula 2.1 es mostren les característiques dels casos analitzats, la seva activitat SSAO plasmàtica i els nivells de $A\beta$, distribuïts en els diferents grups.

	<i>n</i>	Sexe h/d	Edat ± SEM	Activitat SSAO ± SEM	<i>n</i>	β-amiloid ± SEM
	<i>N_t</i> = 104				<i>N_t</i> = 37	
Control	23	13/10	73.5 ± 1.3	3.368 ± 0.217	8	478 ± 63.08
LLeu	33	11/22	75.2 ± 0.9	3.269 ± 0.141	7	642.79 ± 100.24
Moderat	14	3/11	77.3 ± 1.5	3.755 ± 0.234	4	809.28 ± 209.23
Moderat Sever	15	6/9	79.5 ± 1.6	4.717 ± 0.235	11	621.28 ± 123.10
Sever	19	2/17	80.4 ± 1.5	4.553 ± 0.296	7	884.61 ± 241.57

Taula 2.1. Característiques demogràfiques, activitat específica SSAO plasmàtica (pmol/min·mg) i concentració de Aβ (pg/ml).

2.1. Relació entre l'activitat SSAO plasmàtica i la severitat de la malaltia d'AD

En analitzar estadísticament les dades obtingudes (One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*), l'activitat SSAO plasmàtica dels casos control no presentava diferències respecte el grup classificat com AD lleu i moderat. Tanmateix, s'observava un clar augment en l'activitat SSAO en els plasmes dels pacients dels grups AD moderat-sever i sever respecte els casos control i AD lleu ($p < 0.001$). L'activitat SSAO plasmàtica dels pacients AD moderat també presentava canvis significatius comparat amb els pacients moderat-severs i severs ($p < 0.05$) (Fig. 2.1). Aquests resultats permetien concloure un augment de l'activitat SSAO només en pacients amb un grau avançat de demència tipus AD.

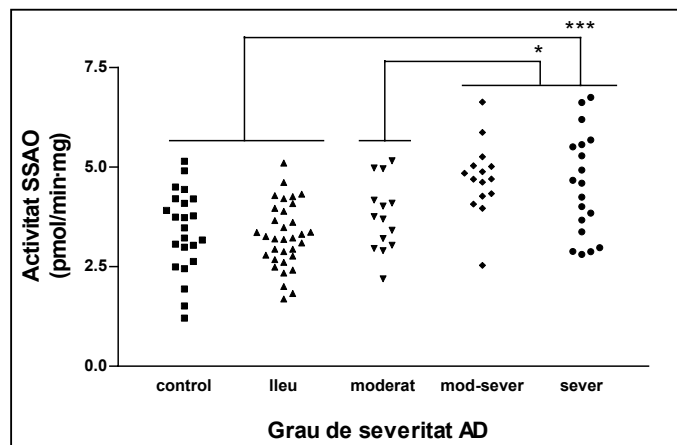


Figura 2.1. Activitat específica de la SSAO plasmàtica dels casos control ($n=23$) i dels grups amb diferent grau de demència AD (criteri GDS); lleu ($n=33$), moderat ($n=14$), moderat-sever ($n=15$) i sever ($n=19$). Les diferències significatives es mostren com: (***) $p < 0.001$, (*) $p < 0.05$ segons el test One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*.

2.2. Relació entre l'edat, l'activitat SSAO plasmàtica i la severitat de la malaltia d'AD

Tot i que tots els individus de l'estudi superaven l'edat de 65 anys, es va analitzar la correlació entre l'edat i la severitat de la demència. Els resultats mostraven que no hi havia diferències estadísticament significatives entre la mitjana d'edat dels grups control, AD lleu i moderat. En canvi, i tal i com calia esperar, els pacients amb AD moderat ($p < 0.05$) i sever ($p < 0.01$) eren més ancians que el grup control (Fig. 2.2A). En conseqüència, per descartar que l'increment d'activitat SSAO observat era degut a l'augment en l'edat dels pacients, es va comparar l'activitat SSAO del grup control amb l'edat (Fig. 2.2B). Els resultats no permetien establir cap relació entre aquests dos paràmetres (r Pearson = 0.326, $p = 0.130$), demostrant que l'edat era un factor independent en aquest estudi. Per altra banda, l'anàlisi de les dades també permetia concloure que no existia una relació directa entre el gènere dels pacients i la seva activitat SSAO plasmàtica, ja que l'activitat no variava en els homes i dones de cap dels grups analitzats ($p < 0.05$, t -test) (dades no mostrades).

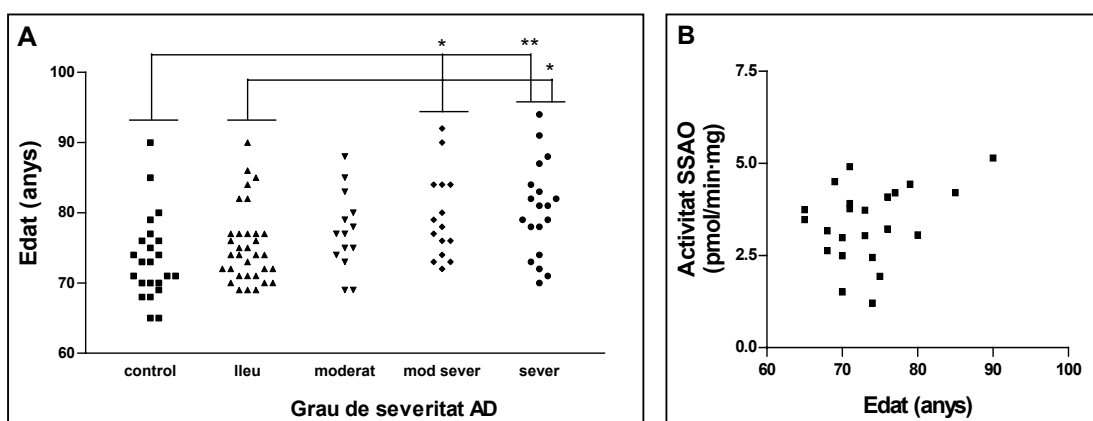


Figura 2.2. A. Distribució d'edat dels casos control ($n=23$) i dels grups amb diferent grau de demència AD (criteri GDS); lleu ($n=33$), moderat ($n=14$), moderat-sever ($n=15$) i sever ($n=19$). Les diferències significatives es mostren com: (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$ segons el test One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*. **B.** No s'estableix correlació entre l'edat i l'activitat SSAO plasmàtica dins el grup control ($n=23$) (Pearson $r=0.326$, $p=0.130$).

2.3. Relació entre els nivells de A β (40-42), activitat SSAO plasmàtica i severitat de la malaltia d'AD

En comparar la concentració de A β (40-42) en plasma i l'activitat específica SSAO plasmàtica dels diferents pacients, no es va aconseguir establir cap correlació entre els dos paràmetres (r Pearson= 0.246, p = 0.428) (Fig. 2.3A). Així mateix, quan es van comparar els nivells de pèptid en plasma i la severitat de la malaltia, semblava que existia una tendència a augmentar amb el grau de severitat, però els resultats no permetien concloure cap correlació estadísticament significativa entre ells (Fig. 2.3B). Per tant, els nivells de A β (40-42) en plasma no van mostrar cap correlació amb els paràmetres analitzats en aquest estudi.

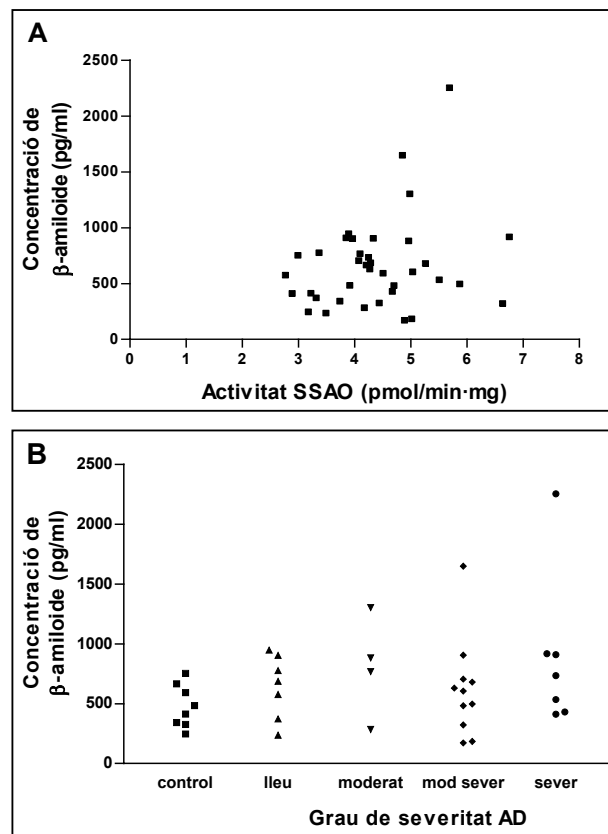


Figura 2.3. A. No s'estableix correlació entre la concentració de β A (40-42) (pmg/ml) i l'activitat SSAO plasmàtica de tots els pacients analitzats ($n=37$) (Pearson $r= 0.246$, $p= 0.428$). **B.** Concentració de β A (40-42) (pmg/ml) dels casos control ($n=8$) i dels grups amb diferent grau de demència AD (criteri GDS); lleu ($n=7$), moderat ($n=4$), moderat-sever ($n=11$) i sever ($n=7$). No existeixen diferències significatives ($p > 0.05$) segons el test One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*

DISCUSSIÓ CAPÍTOL 2

Els resultats presentats en el capítol anterior d'aquest treball mostraven un increment en l'expressió SSAO lligada a membrana en el teixit cerebrovascular de pacients amb la malaltia d'AD. En aquest sentit, i donat que s'ha descrit un augment d'activitat SSAO plasmàtica en certes patologies associades a complicacions vasculars, es va procedir a analitzar l'activitat SSAO soluble en aquesta patologia, per tal d'establir una possible relació entre l'increment de l'expressió de la SSAO tissular i la forma circulant en plasma en AD.

Es va realitzar la determinació de l'activitat SSAO plasmàtica de 104 individus classificats amb diferents graus de demència tipus Alzheimer esporàdic seguint l'escala GDS (*Global Deterioration Scale*) (Reisberg *et al.*, 1982): controls ($n=23$), AD lleu ($n=33$, GDS=3-4), moderat ($n=14$, GDS=5), moderat-sever ($n=15$, GDS=6) i sever ($n=19$, GDS=7). L'anàlisi estadístic de les dades va permetre establir una correlació entre SSAO plasmàtica i la severitat de la demència, obtenint-se un increment d'aquesta activitat en el plasma d'aquells pacients classificats com AD moderat-sever i sever. Tot i així, donat que aquesta activitat no es veia alterada en plasmes de pacients amb AD lleu o moderat, l'activitat SSAO plasmàtica no semblava ser un bon marcador per un diagnòs precoç d'aquesta malaltia neurodegenerativa. Malgrat tot, l'increment de l'activitat SSAO en plasma podria ser d'utilitat a l'hora de monotoritzar el curs i la gravetat de la malaltia.

Donat que està àmpliament descrit que l'edat és un dels factors de risc independents de la malaltia d'AD (Barranco-Quintana *et al.*, 2005), es va estudiar si l'activitat SSAO plasmàtica es veia alterada segons l'edat dels pacients analitzats. L'activitat SSAO present en plasma del grup de mostres control no es veia correlacionada amb l'edat dels pacients, tots ells majors de 65 anys. Aquest resultat ja s'havia mostrat en altres estudis, en els quals s'observava que la mesura de l'activitat SSAO plasmàtica era un paràmetre relativament constant, que no variava amb el temps, l'edat, i el sexe, en situacions fisiològiques (Kurkijarvi *et al.*, 1998, 2000, Salmi *et al.*, 2002; Boomsma *et al.*, 2003). Així doncs, en la correlació establerta entre l'increment en l'activitat SSAO i la severitat de la malaltia AD, l'edat dels individus resultava ser un factor independent dins l'anàlisi.

També es va analitzar si els nivells de pèptid A β circulants en plasma podien correlacionar-se amb el grau de severitat de la malaltia, donat el gran interès en trobar marcadors bioquímics en plasma que permetin realitzar un diagnòstic de la malaltia. Els nostres estudis no van permetre establir cap relació entre els nivells del pèptid A β i la malaltia d'AD. De fet, aquests resultats recolzen altres estudis on es demostra que la concentració de pèptid A β (40), forma predominant en plasma, no varia en pacients amb AD esporàdic (Fukumoto *et al.*, 2003, Mayeux *et al.*, 2003). Per altra banda, tampoc es va poder observar cap correlació entre l'activitat SSAO circulant i la concentració de pèptid A β en plasma de pacients d'AD.

L'augment d'expressió SSAO lligada a membrana observada en vasos de malalts d'AD, descrit prèviament, juntament amb l'augment de SSAO soluble en plasma de pacients amb demència tipus AD sever, suggereix que la forma soluble de l'enzim, mitjançant un mecanisme encara desconegut, podria provenir de la forma tissular en aquesta patologia. És a dir, que la sobreexpressió tissular a nivell de vasos grans cerebrals, podria ser la responsable de l'augment d'activitat SSAO circulant en plasma. Recents estudis utilitzant models de ratolins transgènics, els quals expressen condicionalment la SSAO en múscul llis (Gokturk *et al.*, 2003) o en endoteli (Stolen *et al.*, 2004b), demostren que una sobreexpressió de la SSAO a nivell vascular provoca augments de la forma soluble de la SSAO. A més, quan s'administren inductors de diabetis als ratolins transgènics amb una sobreexpressió de la SSAO en endoteli, s'observa un increment encara més pronunciat de proteïna i activitat SSAO en plasma (Stolen *et al.*, 2004b). Per tant, aquestes dades recolzen el fet que la sobreexpressió de la proteïna a nivell vascular pugui desencadenar un major alliberament de la proteïna soluble en situacions patològiques *in vivo*, com seria el cas de la malaltia d'AD.

En aquest context, una altra dada rellevant és que altres estudis *in vitro* demostren com la SSAO soluble prové de la SSAO cel·lular per un procés de proteòlisi depenent de l'activitat de metal·loproteases de matriu (MMP) (Abella *et al.*, 2004). En aquest sentit, s'ha implicat les MMP en diversos processos de neuroinflamació, com esclerosi múltiple o infeccions virals (Leppert *et al.*, 2001). Concretament, s'ha trobat un augment de MMP-9 en plasma de pacients d'AD (Lorenzl *et al.*, 2003) i en líquid cefaloraquídi de pacients amb demència vascular (Adair *et al.*, 2004). Per tant, podria ser que l'augment en l'activitat MMP en plasma en AD, provoqués un augment de la proteòlisi de la SSAO

l·ligada a membrana tissular, augmentant els nivells de proteïna SSAO circulant en aquesta malaltia.

Per confirmar que l'increment d'activitat SSAO plasmàtica observat és conseqüència d'un procés de proteòlisi de la forma tissular caldria, en primer lloc, comprovar que l'augment d'activitat SSAO plasmàtica en AD va associada a un augment dels nivells proteïna soluble, tal i com s'ha descrit en altres patologies, com la diabetis (Salmi *et al.*, 2002) o malalties inflamatòries de fetge (Kurkijarvi *et al.*, 1998, 2000). No es pot descartar però, que l'augment d'activitat sigui induïda parcialment per algun modulador present en plasma, capaç de regular la proteïna sota certs estímuls patològics, i per tant, no sigui conseqüència únicament dels nivells de proteïna circulant.

El fet que els nivells d'activitat SSAO només es presentin augmentats en els casos més severos d'AD, suggereix que aquest increment de l'activitat sigui una conseqüència dels processos patològics generats per la malaltia, com per exemple el deteriorament vascular o el procés inflamatori. Tot i així, els augments d'activitat SSAO podrien contribuir al dany vascular associat al procés patològic, ja que s'ha descrit que l'acció catalítica de la SSAO plasmàtica humana és capaç d'induir toxicitat a cèl·lules endotelials en cultiu (Yu i Zuo, 1993). De manera, que un increment de l'activitat SSAO plasmàtica en AD, juntament amb un augment en l'expressió de la SSAO tissular en vasos, podria potenciar i accelerar el dany de cèl·lules vasculares a través dels productes de la seva acció catalítica.

Per altra banda, l'augment de SSAO plasmàtica podria incrementar les propietats d'adhesió de la VAP-1 endotelial, afavorint la migració dels limfòcits als òrgans limfoides i l'acumulació dels leucòcits a l'endoteli, contribuint així, a la microangiopatia vascular (Kurkijarvi *et al.*, 1998).

Cal tenir en compte que, tot i que l'activitat SSAO plasmàtica s'ha trobat augmentada en certs desordres metabòlics associats a complicacions vasculares, no totes les malalties vasculares presenten aquest increment en l'activitat plasmàtica (Boomsma *et al.*, 2003). Així mateix, aquest increment d'activitat SSAO, també descrit en certes patologies inflamatòries relacionades amb el fetge, no s'ha pogut establir per altres desordres inflamatoris, com l'artritis reumatoïda o malalties inflamatòries d'intestí (Kurkijarvi *et al.*,

1998). Per tant, l'augment en l'activitat d'aquesta proteïna sembla ser un procés específic de certs processos patològics, com seria el cas de pacients amb un grau de demència avançat tipus AD. Tampoc es pot descartar que pacients amb altres tipus de demències, com la demència vascular, també mostrin un increment en l'activitat SSAO plasmàtica.

RESULTATS I DISCUSSIÓ CAPÍTOL 3:

**L'ACCIÓ CATALÍTICA DE LA SSAO SOLUBLE INDUEIX CITOTOXICITAT EN
CÈL·LULES DE MUSCULATURA LLISA EN CULTIU**

RESULTATS CAPÍTOL 3:

L'ACCIÓ CATALÍTICA DE LA SSAO SOLUBLE INDUEIX CITOTOXICITAT EN CÈL·LULES DE MUSCULATURA LLISA EN CULTIU

Donat que la forma soluble de la SSAO es troba augmentada en certes patologies (Boosmsa *et al.*, 1995; Boosmsa *et al.*, 1997; Garpenstrand *et al.*, 1999; Boosmsa *et al.*, 1999; Kurkijarvi *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2003), i concretament en demència tipus Alzheimer greu (veure Resultats Capítol 2), l'objectiu d'aquesta part del treball va ser estudiar el possible efecte tòxic de l'acció catalítica de la SSAO soluble en cèl·lules vasculars de musculatura llisa en cultiu, per tal de correlacionar aquest resultat amb la implicació de l'esmentat enzim en aquesta patologia.

Com a font d'enzim soluble, es va utilitzar un sèrum boví (BS) amb una elevada activitat específica de l'enzim SSAO (67 pmol/min·mg proteïna). Així doncs, pels diferents tractaments de les cèl·lules, es va substituir el FCS de creixement del cultiu per l'esmentat BS.

3.1. Efecte de la SSAO soluble en cèl·lules A7r5

3.1.1. Característiques de la línia cel·lular A7r5

La línia cel·lular A7r5 és una línia de cèl·lules de musculatura llisa procedents d'aorta de rata. Són cèl·lules adherents i, tot i que presenten una morfologia típica de fibroblasts, expressen el marcador de múscul llis, α -actina (Fig. 3.1). L'actina muscular i no muscular difereixen molt bioquímicament, de manera que els anticossos produïts contra l'actina nativa de musculatura llisa només tenyeixen els feixos filamentosos de les cèl·lules de múscul llis i no els de fibroblast o cèl·lules endotelials (Chamley-Campbell *et al.*, 1979). A la micrografia de la figura 3.1 s'observa la tinció de les fibres ininterrompuda al llarg dels eixos longitudinals.

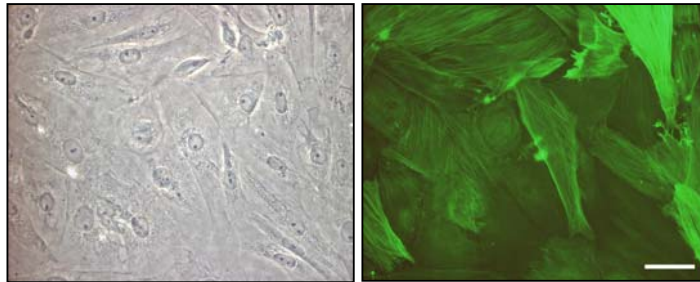


Figura 3.1. **A.** Contrast de fase de cèl·lules A7r5. **B.** Immunocitoquímica d'α-actina. Escala de barres = 50 μm en A i B.

Està àmpliament descrit que la SSAO s'expressa en múscul llis (Hysmith i Boor, 1987; Clarke *et al.*, 1982; Yu *et al.*, 1994, Andrés *et al.*, 2001) i es considera que les cèl·lules de musculatura llisa són la principal font de l'enzim en teixits vascularitzats (Lyles i Singh, 1985). Tot i així, i tal i com succeeix en altres tipus de cèl·lules de múscul llis (El Hadri *et al.*, 2002) i endoteli (Yu *et al.*, 1993), la línia cel·lular A7r5 no presenta activitat SSAO ni expressió de la proteïna. Aquest fet, va permetre estudiar l'efecte net de la forma soluble de la SSAO en front a diferents substrats en aquesta línia cel·lular. Per altra banda, cal remarcar que les cèl·lules A7r5 presenten certa activitat MAO-A (100 pmol/min·mg proteïna) determinada radiomètricament per l'oxidació de serotonina, però en canvi no presenten activitat MAO-B determinada en front a benzilamina com a substrat.

3.1.2. L'oxidació de la metilamina per la SSAO indueix citotoxicitat en cèl·lules A7r5

En primer lloc, es va estudiar l'efecte de l'oxidació del substrat fisiològic de la SSAO, la metilamina (MA) en la línia cel·lular A7r5. Donat que la MA és substrat tant de la forma plasmàtica bovina com de la SSAO plasmàtica humana (Blaschko *et al.*, 1962), l'efecte del seu metabolisme per la SSAO es pot extrapolar a la forma humana de l'enzim. S'ha descrit que la MA es troba augmentada en certes patologies, tals com diabetis, inflamació o desordres renals (Baba *et al.*, 1984, Yu *et al.*, 1998).

Es van tractar les cèl·lules A7r5 amb concentracions creixents de BS (5, 10, 15 % (v/v), corresponents a una activitat SSAO de $3 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$ i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml respectivament) i MA (0.1, 1, 10 mM), i se'n va determinar la viabilitat cel·lular mitjançant el mètode de reducció de l'MTT. Els tractaments amb BS (5, 10, 15 % (v/v)) i 1 mM MA no presentaven cap efecte per ells mateixos. En canvi, quan s'incubaven conjuntament BS i MA durant 24 hores, s'observava una davallada en la reducció de l'MTT depenent de les dosis (Fig. 3.2A) i del rang de temps estudiat (6, 12 i 24 hores) (Fig. 3.2B). Amb el tractament de 0.1 mM de MA i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble s'obtenia una reducció en la viabilitat cel·lular del 25 %, mentre que en augmentar la concentració de MA fins a 1 mM s'obtenia una reducció del 70%. Aquestes condicions van ser les escollides per posteriors experiments. El tractament amb MA 10 mM durant 24 hores va resultar ser lleugerament tòxic per ell mateix, i és per això que es va descartar aquesta concentració pels següents experiments.

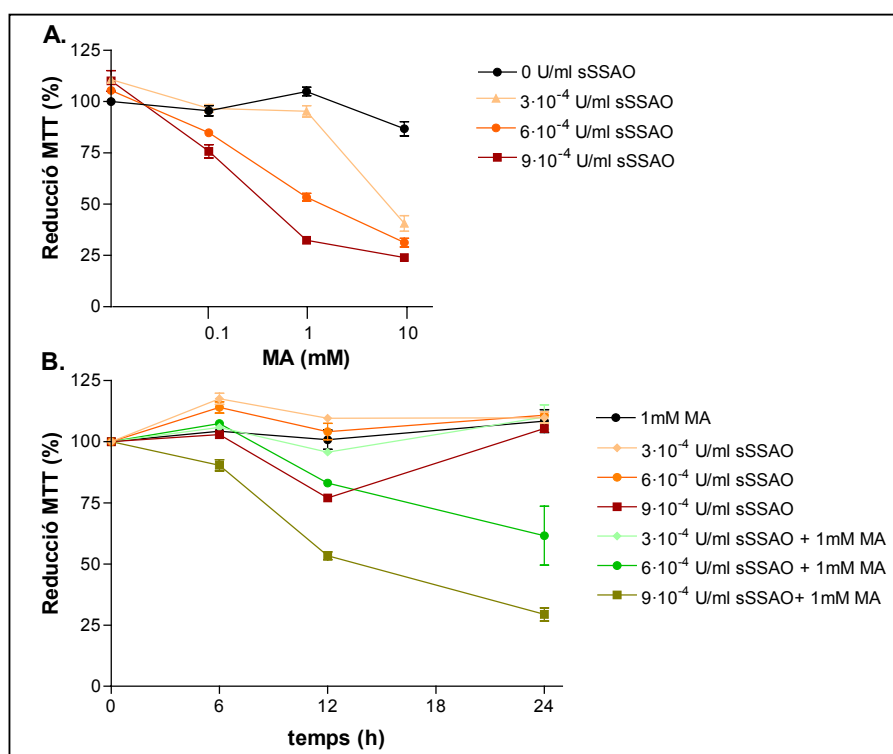


Figura 3.2. Citotoxicitat induïda per l'oxidació de la MA per la SSAO soluble expressada en percentatges de reducció d'MTT. Incubació de cèl·lules A7r5 amb: **(A)** 0.1, 1, 10 mM MA i $3 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$ i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble durant 24 hores, i **(B)** $3 \cdot 10^{-4}$, $6 \cdot 10^{-4}$ i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble i 1 mM MA durant 6, 12 i 24 hores. Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat.

Per tal de confirmar que la pèrdua de viabilitat cel·lular observada era deguda a l'acció catalítica de la SSAO soluble continguda en el BS, es va dur a terme l'experiment utilitzant inhibidors específics de la SSAO; semicarbazida i MDL-72974A. Prèviament, va caldre realitzar les corbes d'inhibició corresponent de la SSAO continguda en el BS amb aquests dos inhibidors (Fig. 3.3). Els valors d' IC_{50} obtinguts van ser de $3.73 \cdot 10^{-6}$ M per la semicarbazida i $1.29 \cdot 10^{-7}$ M per l'MDL-72974A.

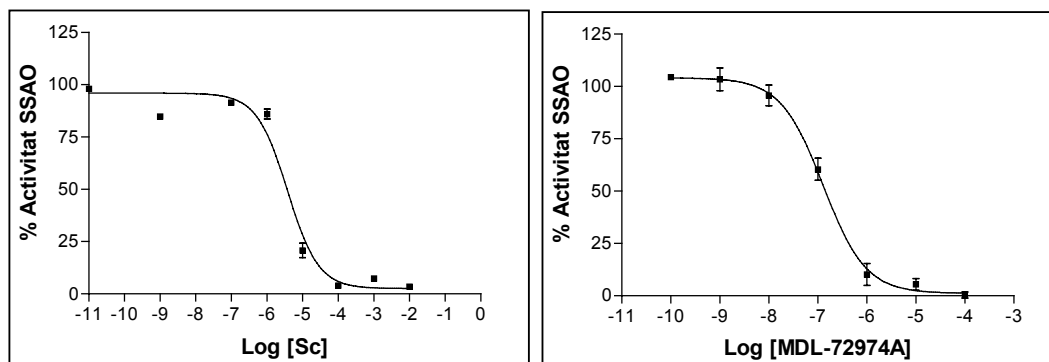


Figura 3.3. Corbes d'inhibició de la SSAO soluble en BS amb (A) semicarbazida i (B) MDL-72974A. Es va realitzar una preincubació de 30 minuts amb els inhibidors i es va portar a terme l'assaig utilitzant el mètode radiomètric amb benzilamina $100 \mu\text{M}$ $2 \text{ mCi}/\text{mmol}$ com a substrat.

La SSAO s'inhibeix completament amb 1 mM de semicarbazida (Lewinshon *et al.*, 1978) i $10 \mu\text{M}$ de MDL-72974A (Yu i Zuo, 1992), concentracions que no presentaven cap efecte en la viabilitat cel·lular de les cèl·lules A7r5 per elles mateixes (resultats no mostrats). Quan s'incubaven les cèl·lules amb $9 \cdot 10^{-4} \text{ U}/\text{ml}$ de SSAO soluble, 1 mM MA i en presència de 1 mM semicarbazida o $10 \mu\text{M}$ MDL-72974A, s'observava que els inhibidors de la SSAO eren capaços de revertir totalment la pèrdua de viabilitat obtinguda amb l'oxidació de la MA per la SSAO soluble (Fig. 3.4). Aquest fet demostrava que la citotoxicitat observada era deguda exclusivament a l'acció catalítica de l'amino oxidasa continguda en el BS, i descartava la possibilitat que hi hagués algun altre enzim en el sèrum utilitzat que fos capaç de metabolitzar MA per donar lloc a productes tòxics.

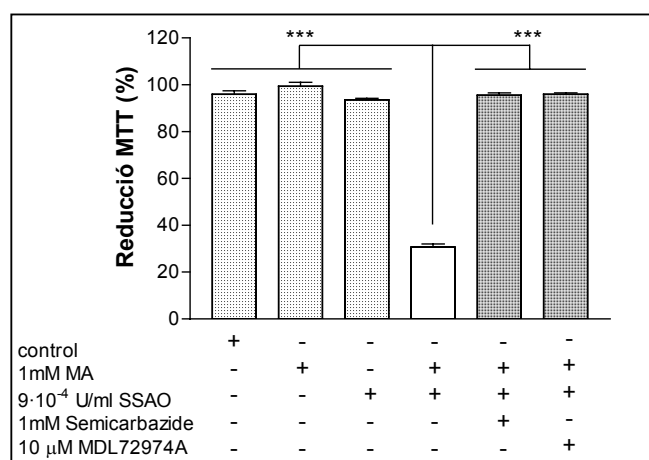


Figura 3.4. Viabilitat cel·lular expressada en percentatges de reducció d'MTT. Incubació de cèl·lules A7r5 amb 1mM MA, $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble i inhibidors de la SSAO, 1mM semicarbazida i 10 μ M MDL-72974A durant 24 hores. Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat. (***) $p < 0.001$ segons el test One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*.

3.1.3. Efecte de l'oxidació de la benzilamina i la tiramina per la SSAO soluble en cèl·lules A7r5

A continuació, es van assajar altres substrats de la SSAO per tal d'estudiar-ne l'efecte dels productes de la seva oxidació en aquesta línia cel·lular. El tractament amb tiramina (TYR) presentava un comportament tòxic superior a l'obtingut amb MA (Fig. 3.5). La incubació de les cèl·lules amb 1 mM de TYR i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble durant 24 hores induïa una citotoxicitat del 90% expressada com a percentatge de reducció d'MTT, i aquest efecte es veia pràcticament revertit per l'acció dels inhibidors de la SSAO a les mateixes concentracions assajades anteriorment, 1 mM semicarbazida i 10 μ M MDL-72974A. Donat que la TYR és una amina aromàtica que també és substrat de les dues isoformes de la MAO, no es pot descartar que el lleu percentatge (de l'ordre del 20%) de citotoxicitat no revertida per inhibidors de la SSAO fos degut als efectes tòxics de l'acció catalítica de la MAO-A present en les cèl·lules A7r5, ja que com s'ha comentat anteriorment, aquesta línia cel·lular no presenta activitat MAO-B. Tot i així, el màxim efecte tòxic observat per l'oxidació de la TYR es pot atribuir a l'acció dels productes generats per l'acció catalítica de la SSAO soluble continguda en el BS.

Contràriament, el substrat no fisiològic benzilamina (BZ), donava lloc a un lleu efecte tòxic per ell mateix i no s'observaven canvis significatius en la viabilitat cel·lular quan s'incubava en presència de $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble durant 24 hores (Fig. 3.5). Si s'assumeix que l'oxidació de la benzilamina presenta la mateixa estequiometria que la resta de substrats, i per tant, es genera el mateix nombre de mols de H_2O_2 , i donat que està descrit que la BZ és millor substrat de la SSAO bovina plasmàtica que la MA (Yu i Zuo, 1993), el fet que el tractament amb BZ no induís citotoxicitat, suggeria que el màxim responsable de la mort cel·lular observada era l'aldehid generat.

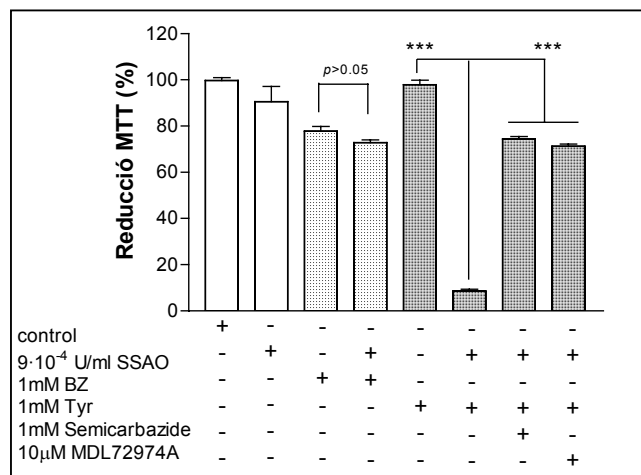


Figura 3.5. Viabilitat cel·lular expressada en percentatges de reducció d'MTT. Incubació de cèl·lules A7r5 amb 1 mM BZ, 1 mM TYR, $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble i inhibidors de la SSAO, 1 mM semicarbazida i 10 µM MDL-72974A durant 24 hores. Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat. (***) $p < 0.001$ segons el test one-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*.

3.1.4. L'oxidació de la MA per SSAO indueix apoptosi en cèl·lules A7r5

A continuació, es va avaluar si la citotoxicitat observada responia a una mort cel·lular de tipus apoptòtic. En primer lloc, es va determinar l'activació de la principal caspasa executora de la mort cel·lular, la Caspasa-3, ja que la seva proteòlisi per donar lloc a la forma activa, es considerada com un clàssic marcador apoptòtic. Així doncs, es va realitzar una immunocitoquímica de la forma activa de la Caspasa-3, juntament amb una tinció de Hoechst 33258. Aquest tipus de tinció nuclear permet confirmar els canvis morfològics, i per tant, distingir nuclis condensats, refringents, segmentats o fragments, típics de cèl·lules apoptòtiques.

La figura 3.6 (D, E i F) mostra com els tractaments amb 1 mM MA, $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble o 1mM SC separadament no donaven lloc a cèl·lules amb tinció positiva per la forma activa de la Caspasa-3. En canvi, la incubació amb 1 mM MA juntament amb $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble, durant 24 hores, resultava en gran nombre de cèl·lules tenyides positivament en vermell per la Caspasa-3 activa en el citoplasma (Fig. 3.6B). En el detall de la micrografia 2B, s'observa com aquesta tinció positiva coincideix amb els nuclis condensats tenyits amb Hoechst 33258. Quan la incubació de les cèl·lules contenia 1 mM MA, $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble i semicarbazida 1 mM, el nombre de cèl·lules amb la forma activa de la Caspasa-3, així com el nombre de nuclis refringents, desapareixia totalment, indicant que l'activitat catalítica SSAO era la responsable del procés apoptòtic obtingut (Fig. 3.6C). Així doncs, l'elevat percentatge de cèl·lules positives per la forma activa de la Caspasa-3 (Fig. 3.6G) indicava clarament que la major part de la mort cel·lular observada responia a un clàssic procés apoptòtic.

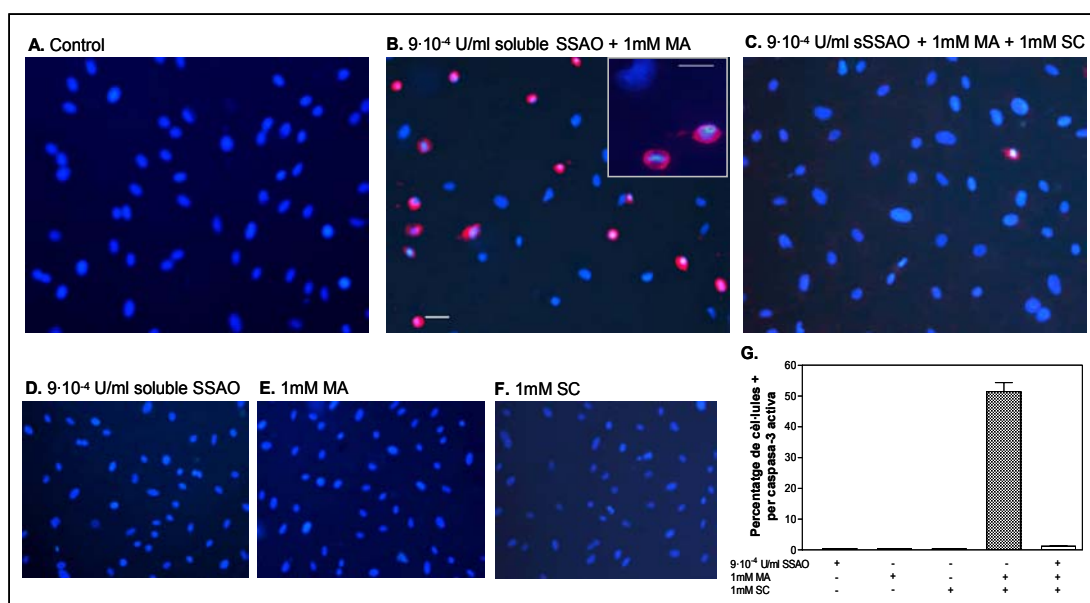


Figura 3.6. L'oxidació de MA per la SSAO soluble indueix apoptosi en cèl·lules A7r5. Immunocitoquímica representativa de Caspasa-3 activa i tinció amb Hoechst 33258 de la incubació amb (A) control, (B) $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble + 1mM MA, (C) $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble + 1 mM MA + 1 mM SC, (D) $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble, (E) 1 mM MA i (F) 1 mM SC, durant 24 hores. Escala de les barres = 50 μ m en A-F, i 25 μ m en B (detall). (G) Percentatge de cèl·lules positives per la forma activa de la Caspasa-3 respecte el nombre total de cèl·lules. Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat.

Es van avaluar altres marcadors apoptòtics com la *Poly (ADP-Ribose) Polymerase* (PARP), ja que és una de les proteïnes responsables del manteniment i reparació del DNA, i és un dels substrats proteolitzats per les caspases executores (*Kaufmann et al.*, 1993). L'anàlisi per Western-blot (Fig. 3.7A) va mostrar com la proteïna es fragmentava (obtenint un fragment de 85 KDa) només en el tractament de les cèl·lules amb 1 mM MA i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO durant 24 hores. Aquests resultats confirmaven l'activació de la Caspasa-3 a les 24 hores de tractament, ja que PARP és un dels substrats d'aquesta proteïna.

Per altra banda, quan es va realitzar el Western-blot de les fraccions citosòliques, després del corresponent fraccionament subcel·lular dels llisats cel·lulars, amb l'anticòs anti-Citocrom c, s'observava com l'oxidació de la MA per la SSAO donava lloc a un increment de la presència d'aquesta proteïna a la fracció citosòlica depenent del temps (Fig. 3.7B), indicant que el tractament provocava un alliberament de Citocrom c de la mitocondria al citosol. A les 12 hores ja s'obtenia un lleuger alliberament de la proteïna comparat amb els controls, i aquesta dada és rellevant si es té en compte que aquest és un procés més primerenc dins el procés apoptòtic i que posteriorment desencadenarà altres processos implicats, com l'activació de la cascada de les caspases. L'alliberament de Citocrom c depenent del temps suggeria que el procés d'apoptosi intrínsec via mitocondrial estava implicat en la mort induïda per l'oxidació de la MA, probablement mitjançant l'efecte dels productes del metabolisme de la SSAO.

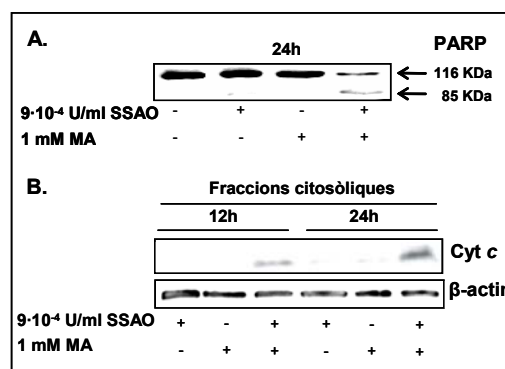


Figura 3.7. L'oxidació de MA per la SSAO soluble ($9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble i 1 mM MA) induïx apoptosi en cèl·lules A7r5. Immunoblot representatiu de **(A)** la fragmentació de PARP després de 24 hores de tractament, i **(B)** l'alliberament de Citocrom c al citosol després de 12 i 24 hores de tractament. L'expressió de β -actina es utilitzada com a control de càrrega.

3.2. Efecte dels productes catalítics de la SSAO (H_2O_2 , formaldehid i amoni) en cèl·lules A7r5

Per tal de comprovar que el metabolisme de la SSAO era el responsable de la mort cel·lular observada, es van estudiar els efectes dels productes finals generats per la oxidació de la MA separatament en cèl·lules A7r5. Donada l'estequiometria (1:1) de la desaminació d'amines primàries per la SSAO, i tenint en compte que les condicions utilitzades de substrat van ser de 1 mM MA, els productes finals també es van assajar a una concentració màxima de 1 mM (0.1-1 mM).

La incubació de les cèl·lules amb H_2O_2 durant 24 hores donava lloc a una davallada en la viabilitat cel·lular, obtenint-se un efecte màxim del 40% de decrement en els nivells de reducció d'MTT amb 1 mM d' H_2O_2 respecte el control de cèl·lules tractades amb H_2O (Fig. 3.8A). Altres estudis, en els quals s'utilitzen cèl·lules vasculars de múscul llis cerebral (Li *et al.* 2003a), descriuen un efecte similar de H_2O_2 mesurant al viabilitat cel·lular per mètodes d'exclusió amb blau de tripà.

Quan el tractament es realitzava amb formaldehid al mateix rang de concentracions utilitzat prèviament durant 24 hores, s'obtenia un fort decrement en la viabilitat cel·lular a concentracions molt més baixes que l'obtingut amb el tractament amb H_2O_2 (Fig 3.8B). Així doncs, a partir de 0.5 mM de formaldehid s'indueïa pràcticament un 100% de pèrdua en la viabilitat cel·lular. En canvi, el tractament amb l'altre producte generat per l'acció catalítica de la SSAO, l'amoni, no era capaç d'induir cap efecte tòxic en les cèl·lules A7r5 a les concentracions assajades (Fig. 3.8C). Per tant, aquests resultats suggerien que l'amoni no contribuïa a la mort cel·lular observada per l'oxidació de la MA per la SSAO soluble.

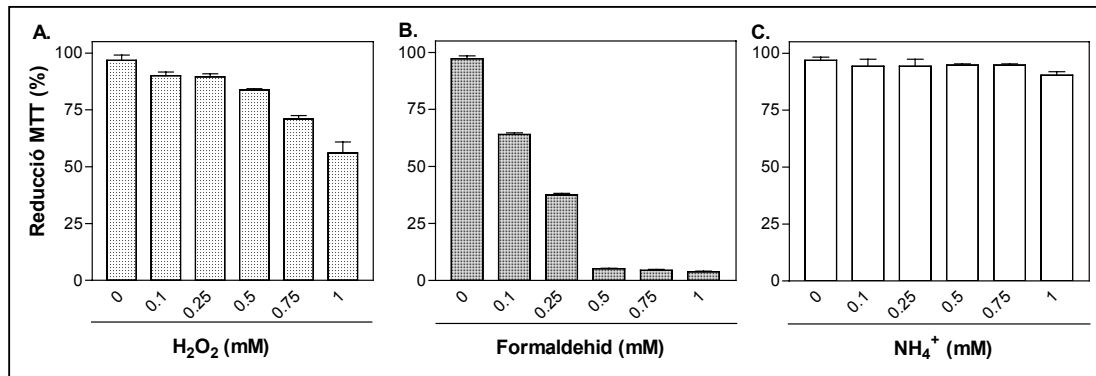


Figura 3.8. Citotoxicitat induïda per l'acció dels productes generats de l'oxidació de la MA per la SSAO soluble expressada en percentatges de reducció d'MTT. Incubació de cèl·lules A7r5 durant 24 hores amb: **(A)** 0.1-1 mM H_2O_2 , **(B)** 0.1-1 mM formaldehid, i **(C)** 0.1-1 mM NH_4^+ . Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat.

Donat que l'acció catalítica de la SSAO soluble és capaç d'induir apoptosi en cèl·lules A7r5, es va estudiar si els productes de la seva catàlisi, que induïen una pèrdua en la viabilitat cel·lular, eren capaços de provocar un tipus de mort apoptòtica en aquest sistema. Tot i que està àmpliament descrit que l' H_2O_2 i les espècies reactives d'oxigen (ROS) en general, indueixen apoptosi en un gran nombre de tipus cel·lulars (Barbouti *et al.*, 2002; Kumar i Jugdutt, 2003), incloses les cèl·lules de múscul llis (Li *et al.*, 1997a, Li *et al.*, 1997b, Li *et al.*, 2003), no està descrit a la literatura que el formaldehid sigui capaç d'induir aquest tipus de dany en cèl·lules de múscul llis.

En determinar, per tècniques immunohistoquímiques, el percentatge de cèl·lules amb la forma activa de la Caspasa-3, s'observava que el tractament amb 0.5 mM de formaldehid durant 24 hores induïa un 75% de cèl·lules amb tinció positiva (Fig. 3.9C), comparat amb les cèl·lules control tractades amb H_2O (Fig. 3.9A). El percentatge obtingut amb formaldehid (Fig. 3.9D) era comparable als nivells de pèrdua de viabilitat observats per aquest mateix tractament, i demostrava que el formaldehid era un fort inductor apoptòtic en aquest tipus cel·lular. La tinció amb Hoechst 33258 de les cèl·lules positives per la Caspasa-3 activa evidenciava que aquestes cèl·lules presentaven la morfologia típica de nuclis apoptòtics condensats, correlacionant els dos marcadors apoptòtics analitzats.

En canvi, quan les cèl·lules es tractaven amb 0.5 mM d' H_2O_2 usant les mateixes condicions experimentals, només un 10% de cèl·lules presentaven la forma activa de la Caspasa-3 (Fig. 3.9B). En aquest cas, el percentatge (Fig. 3.9D) també era comparable a la pèrdua de viabilitat cel·lular obtinguda anteriorment amb aquest tractament, corroborant que l' H_2O_2 induïa una mort de tipus apoptòtic en aquest tipus cel·lular.

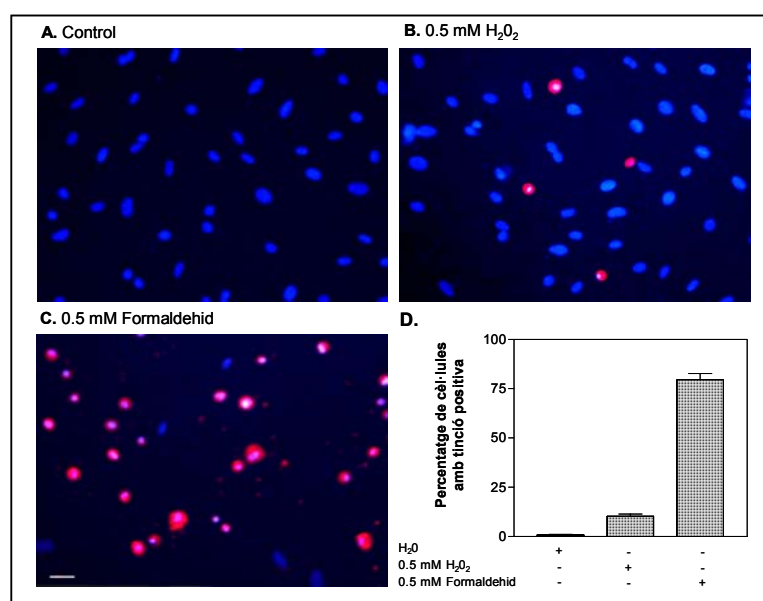


Figura 3.9. Els productes citotòxics generats pel metabolisme de la SSAO (H_2O_2 i formaldehid) induïxen apoptosi en cèl·lules A7r5. Immunocitoquímica representativa de Caspasa-3 activa i tinció amb Hoechst 33258 de la incubació amb **(A)** H_2O , **(B)** 0.5 mM formaldehid, **(C)** 0.5 mM H_2O_2 , durant 24 hores **(D)** Percentatge de cèl·lules positives per la forma activa de la Caspasa-3 respecte el nombre total de cèl·lules. Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat. Escala de les barres = 50 μm en A, B i C.

Per altra banda, també es va analitzar l'expressió de PARP després del tractament amb diferents concentracions de formaldehid (0.1, 0.5 i 1 mM) durant 24 hores, i els resultats obtinguts demostraven una clara fragmentació de la proteïna en tot el rang de concentracions estudiat (Fig. 3.10A). En canvi, en el cas del tractament amb H_2O_2 , donat que el trencament de PARP és un dels darrers processos en la cascada apoptòtica, va caldre un tractament de 42 hores per tal de poder observar la fragmentació de la proteïna a partir d'una concentració d' H_2O_2 de 0.5 mM (Fig. 3.10B).

Per tant, els resultats obtinguts suggerien que el formaldehid era el màxim responsable de l'efecte apoptòtic observat durant l'oxidació de la MA, ja que tant els valors de citotoxicitat, com la intensitat de l'efecte apoptòtic obtinguts amb dosis de 0.5 mM de formaldehid, coincidien amb els valors prèviament observats amb l'oxidació de la MA per la SSAO. En canvi, l'H₂O₂ presentava una mort més retardada que podria perllongar els efectes citotòxics observats. Tot i així, no es podria descartar que un efecte sinèrgic entre els dos components fes incrementar la senyal de mort apoptòtica en aquest sistema.

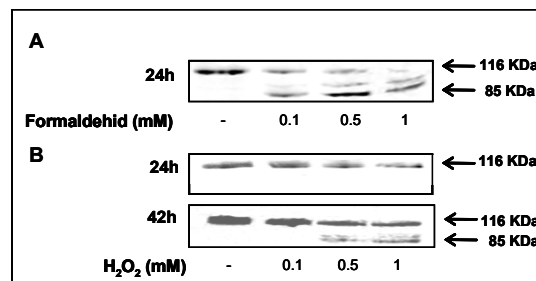


Figura 3.10. Els productes citotòxics generats pel metabolisme de la SSAO (H₂O₂ i formaldehid) induïxen apoptosi en cèl·lules A7r5. Immunoblot representatiu de la fragmentació de PARP després de 24 hores de tractament amb (A) formaldehid (0.1, 0.5 i 1 mM), i (B) 24 i 42 hores de tractament amb H₂O₂ (0.1, 0.5 i 1 mM).

3.3. Efecte de la SSAO soluble en cèl·lules HASMC

Per tal de comprovar que la citotoxicitat induïda per l'oxidació de la MA a través del metabolisme de la SSAO soluble no era un artefacte produït pel fet d'utilitzar una línia cel·lular transformada, es van realitzar els experiments de toxicitat utilitzant un cultiu primari de cèl·lules de múscul llis procedents d'aorta humana (HASMC). Així mateix, i donat que les cèl·lules A7r5 provenen d'aorta de rata, es va voler comprovar que l'efecte observat no depenia de l'espècie de la qual provenien les cèl·lules en cultiu, i per tant, poder extrapolar els resultats a cèl·lules d'origen humà. El fet de treballar amb un cultiu primari dificulta i alenteix el procés. En primer lloc, cal tenir en compte la dificultat d'obtenció, transport i processament de mostres humanes, i en segon lloc, el cultiu primari de cèl·lules de múscul llis requereix de temps molt llargs per tal d'obtenir un cultiu pur. A més, donat que no és recomanable treballar amb passatges inferiors a 8, cal realitzar una amplificació inicial del cultiu considerablement extensa per tal de

disposar d'un nombre suficient de cèl·lules adequat per treballar. Tot i així, la utilització d'aquest tipus de cultiu permet tenir un model que s'aproxima més a les condicions que es donarien fisiològicament i permet confirmar els resultats obtinguts amb la línia cel·lular d'aorta de rata, A7r5.

3.3.1. Caracterització del cultiu primari d'HASMC

En primer lloc, va caldre posar a punt el cultiu primari d'HASMC. Per això, es va seguir el mètode per explants prèviament descrit (Ross *et al.*, 1980) (veure Materials i Mètodes 1.1.2). Les aortes humanes es van obtenir gràcies al Servei de Trasplantaments de l'Hospital de la Vall d'Hebron de Barcelona.

Després de subcultivar les cèl·lules durant aproximadament 2 mesos i de comprovar-ne la seva morfologia, es va realitzar una immunocitoquímica amb el clàssic marcador de cèl·lules de múscul llis, α -actina. Paral·lelament, es va realitzar un tinció nuclear amb Hoechst 33258 que ens permetia avaluar la puresa del cultiu. Així doncs, tal i com es mostra a la figura 3.11, la tinció nuclear permetia identificar totes les cèl·lules presents en el cultiu, i la tinció fluorescent amb l'anticòs α -actina conjugat a fluoresceïna va permetre concloure que s'havia obtingut una única espècie cel·lular. Aquesta tinció permet descartar les contaminacions més habituals d'aquest tipus de cultiu primari, com són les cèl·lules endotelials i els fibroblasts. Una vegada es va caracteritzar el cultiu, es va procedir a la seva amplificació sense treballar amb passatges superiors a 8. Donada la ja esmentada dificultat d'obtenir mostres d'aorta humana, es van congelar les cèl·lules HASMC a passatges inferiors a 4 pel seu posterior ús. Inicialment, va caldre comprovar que el procés de congelació no interferís en el correcte creixement i subcultiu de les cèl·lules.

Tot i que l'homogenat inicial d'aorta humana tenia una activitat SSAO de 2400 pmol/min·mg de proteïna, les cèl·lules musculars en cultiu procedents d'aquest teixit a partir d'un passatge 3, no presentaven activitat ni expressió SSAO. No es va poder estudiar l'activitat de l'enzim abans d'aquest passatge, ja que com s'ha comentat anteriorment, la metodologia de preparació del cultiu no permet tenir suficient material cel·lular fins a passatges més avançats.

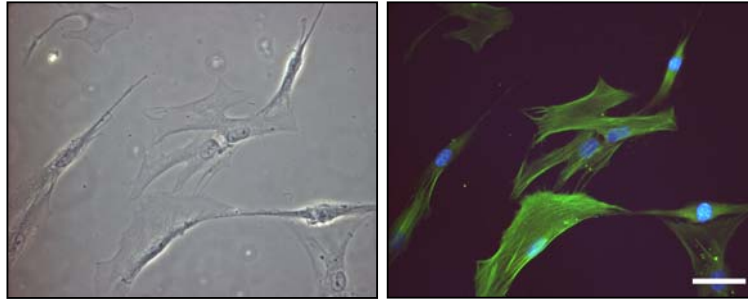


Figura 3.11. **A.** Contrast de fase de cèl·lules HASMC. **B.** Immunocitoquímica d'α-actina i tinció nuclear amb Hoechst 33258. Escala de barres = 50 μm en A i B.

3.3.2. L'oxidació de la MA per la SSAO indueix citotoxicitat en cèl·lules HASMC

Es van tractar les cèl·lules A7r5 amb una concentració de BS del 15 % (v/v), equivalent a una activitat SSAO soluble de $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml i una concentració de MA de 1 mM durant 24 hores i se'n va determinar la viabilitat cel·lular mitjançant el mètode de reducció de l'MTT. El tractament per separat de SSAO i MA no provocava diferències significatives en la viabilitat cel·lular respecte el control sense tractar. En canvi, quan s'incubava juntament 1 mM MA i una activitat de SSAO soluble de $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml, s'observava una davallada en els valors de reducció d'MTT del 35 % (Fig. 3.12), en comparació al 75 % observat en el cas del mateix tractament en A7r5. Aquests resultats indicaven que el cultiu primari resultava més resistent a la toxicitat induïda per l'acció catalítica de la SSAO. Els inhibidors de la SSAO, semicarbazida 1 mM i MDL72974A 10 μM, tampoc mostraven un efecte significativament tòxic per ells mateixos, però eren capaços de revertir la pèrdua de viabilitat cel·lular induïda per la SSAO soluble en presència de MA. Cal tenir en compte que en el cas de les cèl·lules del cultiu primari, degut a la seva morfologia, la sembra cel·lular no era tan acurada com en el cas de treballar amb una línia cel·lular. Aquest fet podria explicar les desviacions obtingudes en els tractaments dels diferents experiments realitzats.

Els resultats presentats indiquen que la catàlisi de la SSAO era l'únic inductor de la citotoxicitat observada. Cal destacar, que el fet que les cèl·lules HASMC no presentessin activitat SSAO ni expressió de la proteïna, permetia estudiar l'efecte que induïa únicament la forma soluble de la SSAO que s'addiciona al cultiu, tal i com succeïa en el cas de la línia cel·lular A7r5.

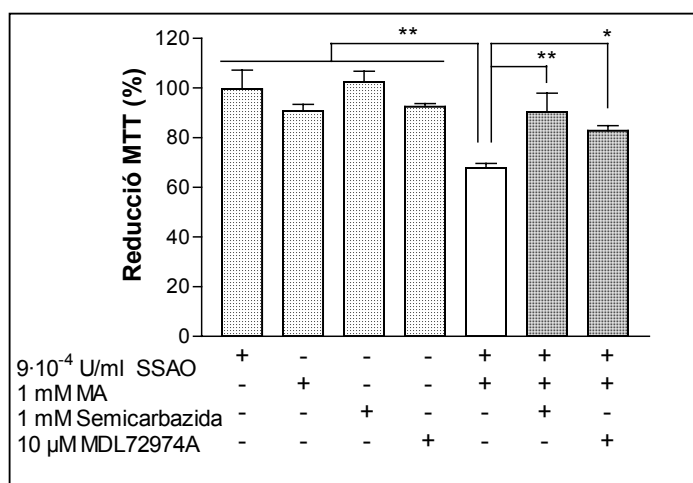


Figura 3.12. Viabilitat cel·lular expressada en percentatges de reducció d'MTT. Incubació de cèl·lules HASMC amb 1 mM MA, $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml de SSAO soluble i inhibidors de la SSAO, 1mM semicarbazida i 10 μM MDL-72974A durant 24 hores. Les dades s'expressen com la mitja \pm SEM de tres experiments diferents realitzats en triplicat. (**) $p < 0.01$, (*) $p < 0.05$ segons el test One-way ANOVA amb un Newman-Keuls *post-test*.

DISCUSSIÓ CAPÍTOL 3

L'increment en l'activitat SSAO plasmàtica descrit en certes patologies associades a complicacions vasculars, com diabetis (Boomsma *et al.*, 1999) associada a retinopatia (Garpenstrand *et al.*, 1999) i certes disfuncions cardiovasculars (Boomsma *et al.*, 1997), ha plantejat la possibilitat que el metabolisme de la SSAO circulant per la sang estigui augmentant el dany vascular en aquests tipus de malaltia. És per això que durant els últims anys s'han descrit diferents treballs en els quals s'ha estudiat l'efecte de l'oxidació de certes amines, substrats de la SSAO, sobre cèl·lules vasculars, tant de múscul llis com cèl·lules endotelials.

En primer lloc, i en referència als estudis utilitzant SSAO soluble, es va descriure que la desaminació de l'alilamina, una amina alifàtica sintètica, era altament tòxica en cèl·lules de múscul llis d'aorta de rata en presència de SSAO present en el 10% de FCS (Ramos *et al.*, 1988; Conklin *et al.*, 1998). En canvi, la metilamina (MA), una amina alifàtica endògena, no tenia cap efecte sobre aquest tipus cel·lular quan era oxidada per la SSAO soluble present en el FCS (Conklin *et al.*, 1998). Cal remarcar però, que l'activitat SSAO final amb la qual es tractaven les cèl·lules (0.5 pmol/min·mg proteïna, equivalent a 0.04 nmol/min·ml) era de l'ordre de 10-15 vegades inferior a l'activitat present en plasma humà (0.7 nmol/min·ml) (Yu i Zuo, 1993). Altres estudis, en els quals es tractaven les cèl·lules endotelials amb plasma humà, amb una activitat SSAO final de 0.56 nmol/min·ml, s'observava com l'oxidació de la MA també era capaç d'induir citotoxicitat en aquest tipus cel·lular (Yu i Zuo, 1993).

En aquest context, l'objectiu d'aquesta part del treball va ser estudiar l'oxidació de la MA per part de la SSAO soluble en cèl·lules de múscul llis, per tal de demostrar que depenent dels nivells circulants de SSAO soluble i MA, els productes metabòlics generats també podien induir dany cel·lular, contribuint al dany vascular, per exemple en CAA associada a AD. Concretament, ens vàrem interessar en estudiar els mecanismes moleculars i el tipus de mort involucrada en el procés.

En primer lloc, ens vàrem centrar en l'efecte de la SSAO soluble, ja que com s'ha comentat anteriorment, es la forma enzimàtica incrementada en certes patologies

associades a desordres vasculars. En aquest sentit, es va utilitzar un sèrum boví (BS) amb un elevat contingut en SSAO com a font enzimàtica soluble. Per altra banda, la major part del treball es va basar en l'estudi de l'oxidació de la MA, ja que és una de les amines considerades com el substrat fisiològic de la SSAO, i per tant, amb més rellevància fisiològica. A més, la MA també es troba augmentada en certes patologies, com urèmia i diabetis, especialment en els casos de disfunció renal crònica (Yu i Dyck, 1998).

Per aquest estudi es van utilitzar cèl·lules de múscul llis, tant de la línia cel·lular A7r5, procedents d'aorta de rata, com cultius primaris procedents d'aorta humana (HASMC). Tot i que la SSAO s'expressa constitutivament en múscul llis vascular i majoritàriament en la túnica media d'aorta (Clarke *et al.*, 1982; Lyles i Singh, 1985; Hysmith i Boor, 1987), les cèl·lules A7r5 i HASMC no presentaven activitat ni expressió SSAO. En aquest sentit, la bibliografia al respecte és bastant diversa. Per una part, certs autors que treballen amb cultius primaris d'aorta porcina (Hysmith i Boor, 1987, 1988) i de rata (Ramos *et al.*, 1988; Langford *et al.*, 2001) descriuen expressió i activitat SSAO cel·lular en cultiu. En canvi, altres autors no aconsegueixen descriure l'expressió de l'enzim en cèl·lules de múscul llis d'aorta de porc (Trevethick, 1981) o d'aorta de rata (El Hadri *et al.*, 2002). En aquest últim cas, es descriu un procés de diferenciació cel·lular de múscul llis, el qual permet canviar el fenotip cel·lular associat a l'aparició de l'expressió de la SSAO. En quant a les línies cel·lulars de múscul llis, el treball de Jaakkaola *et al.* (1999) descriu com la SSAO/VAP-1 es troba expressada constitutivament *in vivo*, però absent en cèl·lules transformades en cultiu. En referència a les cèl·lules endotelials, tot i que també s'ha trobat expressió SSAO *in vivo*, tampoc s'ha aconseguit trobar expressió i activitat en diferents línies cel·lulars i cultius primaris endotelials (Yu i Zuo, 1993; Arvilommi *et al.*, 1997). De fet, aquest fenomen de pèrdua de l'expressió SSAO en cèl·lules en cultiu també s'ha descrit per altres tipus cel·lulars, com els fibroblasts. Buffoni *et al.* (2000) mostren com els fibroblasts aïllats i en cultiu de pell de conill d'Índia, deixen d'expressar la SSAO a mida que augmenten els passatges del cultiu.

Les dades presentades fins al moment suggereixen que les condicions de realització i de manteniment del cultiu poden ser crucials per l'expressió de la proteïna. El fet de la pèrdua d'expressió i activitat SSAO es podria explicar tenint en compte la dificultat de mantenir la diferenciació i el fenotip cel·lular en cultiu. Està àmpliament descrit que la

plasticitat que presenten les cèl·lules vasculars de múscul llis *in vivo* i *in vitro* els hi permet canviar de fenotip en resposta a canvis en el seu entorn (Owen, 1995). Concretament, les cèl·lules de múscul llis en cultiu perden ràpidament les funcions contràctils i esdevenen altament proliferatives, i aquest fet provoca el canvi d'expressió de moltes proteïnes (Owens, 1995; Browner *et al.*, 2004). En aquest sentit, podria ser que la SSAO requereís determinats factors, no continguts en certs sèrums de creixement, imprescindibles per a la seva expressió en cèl·lules en cultiu.

En aquest estudi, hem mostrat com la coincubació de la SSAO soluble i MA induïa citotoxicitat en A7r5 i cèl·lules HVSMC. S'ha observat que era un efecte dosi dependent en un rang de concentració de MA de 100 μM a 1 mM. Cal anotar però, que les concentracions de MA fisiològiques en plasma són de l'ordre de 1-5 μM (Baba *et al.*, 1984; Li *et al.*, 2004), i en situacions patològiques com urèmia o diabetis associada a disfuncions renals, no excedeix de 50 μM (Baba *et al.*, 1984; Yu i Dick, 1998). Per tant, tot i que les concentracions de MA del treball eren superiors a les presents fisiològicament, cal destacar que aquest ha estat un estudi experimental sobre el tractament crònic de l'acció de la SSAO soluble en cèl·lules vasculars, on només s'ha tingut en compte l'efecte produït a les 24 hores de tractament. Així doncs, no es pot descartar que dosis inferiors donessin lloc a efectes semblants a temps més llargs. La concentració de MA de 1 mM, la qual no mostrava cap efecte per ella mateixa, però en canvi resultava altament tòxica en presència de SSAO soluble (70% de reducció en la viabilitat cel·lular), va ser l'escollida per experiments posteriors. Aquesta mateix rang de concentració de MA ha estat utilitzat per molts altres estudis tant de toxicitat (Yu i Duo, 1993; Langford *et al.*, 2001), com de metabolisme de la SSAO (Enrique-Taracón *et al.*, 2000; El Hadri *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2001; Mercier *et al.*, 2003) en diferents tipus cel·lulars en cultiu. En quant a l'activitat SSAO soluble utilitzada en els tractaments (3,6 i $9 \cdot 10^{-4}$ U/ml) continguda en el BS, cal remarcar que entraria dins el rang d'activitat de la SSAO plasmàtica humana en situacions fisiològiques i patològiques (0.7 nmol/min·ml equivalent a $7 \cdot 10^{-4}$ U/ml) (Yu i Zuo, 1993).

La citotoxicitat observada en presència de MA i BS es revertia completament amb la coincubació de dos inhibidors diferents i específics de la SSAO; amb semicarbazida 1 mM, i amb l'inhibidor altament selectiu i irreversible MDL 72974A 10 μM (Lyles *et al.*, 1987, Yu i Zuo, 1992). Aquest resultat demostra que l'acció catalítica de la SSAO és la

única responsable de l'efecte observat sobre les cèl·lules de múscul llis, descartant altres fonts de dany en el BS utilitzat. Per altra banda, quan experiments equivalents es realitzaven amb el substrat tiramina, no s'aconseguia revertir totalment la mort cel·lular obtinguda, suggerint que els productes catalítics procedents de l'oxidació d'aquesta amina per part de la MAO-A, expressada en la línia cel·lular A7r5, podrien ser els responsables de la lleugera davallada en la viabilitat cel·lular que no es veu recuperada amb inhibidors específics de la SSAO. Tot i així, caldrien experiments amb inhibidors selectius d'aquesta isoforma de la MAO per corroborar aquesta possibilitat i descartar altres reaccions inespecífiques en les que pugui intervenir la tiramina.

Contràriament al resultat de l'oxidació de la metilamina i la tiramina, l'amina no fisiològica benzilamina, considerada com el millor substrat de la SSAO *in vitro*, no era capaç d'induir toxicitat en presència de l'enzim. Aquestes dades suggereixen que l'estructura química i la reactivitat de l'aldehid generat depenent de l'amina oxidada són determinants en el dany cel·lular. De fet, tractaments sobre cèl·lules de múscul llis d'aorta de rata amb concentracions extremadament elevades (100 mM) de benzaldehyd, producte de l'oxidació de la benzilamina, demostren que aquest aldehid no resulta citotòxic (Conklin *et al.*, 1998). Seria interessant comprovar l'efecte directe d'altres aldehids generats a partir de diferents substrats de la SSAO, especialment del p-hidroxifenilacetaldehyd, producte format de l'oxidació de la tiramina. Tanmateix, no es pot descartar que el peròxid d'hidrogen generat tingui un efecte sinèrgic amb l'aldehid produït, capaç d'incrementar l'estrès oxidatiu i la senyal citotòxica (Lichszeld i Kruk, 1979).

Així doncs, es van assajar els diferents productes catalítics generats per l'oxidació de la MA; formaldehyd, H₂O₂ i amoni separatament, i el resultat obtingut demostrava que tant el formaldehyd com l'H₂O₂ resultaven tòxics sobre el cultiu de cèl·lules A7r5, mentre l'amoni no induïa cap efecte en la viabilitat cel·lular. Tot i així, el formaldehyd mostrava una citotoxicitat extremadament més elevada que l'H₂O₂ en les mateixes condicions experimentals, tal i com ja havien descrit altres autors en cèl·lules endotelials (Yu i Zuo, 1993). Aquest resultat pot ser particularment interessant si es té en compte que en el plasma humà no hi ha cap deshidrogenasa capaç de metabolitzar l'aldehyd (Helander i Tottmar, 1987), i per tant, si no és transportat a l'interior de la cèl·lula, seria potencialment capaç de generar dany vascular.

En aquest treball, també ens vàrem centrar en l'estudi dels mecanismes moleculars implicats en aquest tipus de mort. Concretament, l'oxidació de la MA per part de la SSAO soluble donava lloc a una mort programada o apoptosi, observada per diferents marcadors d'aquest tipus de mort, com l'activació de la caspasa executora, Caspasa-3, el trencament de la proteïna PARP i la condensació de la cromatina nuclear. La majoria de vies apoptòtiques conflueixen en l'activació de la Caspasa-3 (Lincz, 1998; Hengartner, 2000), i la forma activa d'aquesta proteïna, a la seva vegada, és capaç de proteolitzar diferents substrats, entre ells la proteïna reparadora del DNA, PARP (Kaufmann *et al.*, 1992; Hengartner, 2000; Kerr, 2002). Cal destacar que els percentatges d'activació de cèl·lules amb la forma activa de Caspasa-3 i amb condensació citoplasmàtica, després del tractament amb MA i SSAO soluble, coincidien amb el percentatge de reducció de viabilitat cel·lular obtingut pel mètode de reducció d'MTT, suggerint que es tractava d'un procés selectiu i atribuïble únicament a aquest tipus de mort.

Per altra banda, també es va observar que l'oxidació de la MA induïa l'alliberament de Citocrom c de la mitocòndria al citosol, fet que indicava que l'anomenada via intrínseca mitocondrial del procés apoptòtic es veuria implicada en el procés, probablement com a conseqüència de l'acció dels productes catalítics generats. Per una banda, l'H₂O₂ generat podria contribuir a l'estrès oxidatiu intracel·lular, i està àmpliament descrit que la via apoptòtica a través de la mitocòndria es pot veure activada per mecanismes que impliquin la formació de ROS (von Harsdorf *et al.*, 1999). Per altra banda, tractaments cel·lulars amb formaldehid, s'ha vist que indueixen inactivació de la respiració mitocondrial i decrement del potencial de membrana, suggerint que podria provocar l'obertura del porus transitori de permeabilitat mitocondrial i l'alliberament de Citocrom c de la mitocòndria al citosol (Teng *et al.*, 2001). Tot i així, caldria aprofundir en l'estudi d'aquest procés per tal de poder concloure si existeixen altres vies apoptòtiques implicades en la mort induïda pe l'acció catalítica de la SSAO.

Les amines biògenes ja s'havien descrit que podien tenir un paper important en l'apoptosi a través de l'acció catalítica de la MAO mitocondrial i les PAO citoplasmàtiques (Toninello *et al.*, 2004; Toninello i Mondovi, 2004), però fins al moment, no existien evidències directes que impliquessin l'apoptosi mitjançant l'oxidació d'amines

per acció de la SSAO. L'apoptosi de les cèl·lules de múscul llis vascular és un procés normal que té lloc durant el desenvolupament i la maduració dels vasos sanguinis, però també és un procés implicat en diverses malalties associades a complicacions vasculares (MacLellan i Schneider, 1997; Haunstetter i Izumo, 1998; Mallat *et al.*, 2000; Kumar i Jugdutt, 2003), com malalties neurodegeneratives, cardiovasculars, arteriosclerosi o hipertensió.

En aquest sentit, l'H₂O₂, una font important de mort apoptòtica en malalties associades a l'estrès oxidatiu, també va mostrar que induïa mort apoptòtica en el nostre model experimental en A7r5, tal i com estava descrit per altres cèl·lules de múscul llis (Li *et al.*, 1997a, Li *et al.*, 1997b, Li *et al.*, 2003). Així mateix, el formaldehid també s'observava que era un fort inductor apoptòtic, tal i com s'havia plantejat per altres tipus cel·lulars (Tyihak *et al.*, 2001; Amore *et al.*, 2003; Nakao *et al.*, 2003), i com s'havia descrit prèviament pel metilglixal, l'aldehid generat de l'oxidació de l'alilamina (Okado *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2000; Amore *et al.*, 2003). El fet que el formaldehid (0.5 mM) coincidís en el percentatge de mort i en la intensitat de mort apoptòtica amb els tractaments de MA 1 mM i SSAO soluble, aporta una evidència més que el formaldehid podria ser el màxim responsable de la mort apoptòtica obtinguda de l'oxidació de la MA per la SSAO. L'H₂O₂, en canvi, sembla que induiria una mort més retardada, perllongant o contribuint a l'efecte tòxic del formaldehid.

Tot i així, es desconeixen els mecanismes moleculars pels quals el formaldehid podria desencadenar la mort apoptòtica. Donada la seva capacitat de provocar un fort entrecreuament proteic, podria ser que actués a nivell de dany membranal, induint oxidació dels lípids de la membrana i provocant una senyal intracel·lular, la qual seria la responsable de l'activació de la cascada apoptòtica. Per altra banda, el formaldehid podria actuar a nivell intracel·lular directament, inactivant la respiració mitocondrial i incrementant els nivells de ROS i la peroxidació lipídica. De fet, Teng *et al.* (2001) descriuen que s'aconsegueix incrementar significativament la citotoxicitat induïda per tractaments amb formaldehid quan s'inhibeixen les deshidrogenases intracel·lulars capaces de detoxificar-lo (l'alcohol deshidrogenasa, la formaldehid deshidrogenasa depenent de glutatió i l'aldehid deshidrogenasa mitocondrial). Per tant, es suggereix que el formaldehid aconseguiria entrar dins la cèl·lula, a través d'un mecanisme desconegut fins al moment, amb la conseqüent resposta de dany cel·lular i apoptosi.

Tal i com s'ha demostrat en aquest estudi, l'oxidació de la MA per part de la SSAO plasmàtica, i concretament, els metabòlits de l'oxidació de la MA, principalment el formaldehid generat, són potencialment capaços d'induir citotoxicitat i apoptosi en cèl·lules de múscul llis.

En resum, en situacions patològiques, on els nivells de SSAO soluble i MA circulants es trobin augmentats, o en situacions d'estrès, en els quals el metabolisme de l'adrenalina produeixi uns nivells anormals de MA pel metabolisme de la MAO-A (Yu *et al.*, 1997), l'acció catalítica de la SSAO en plasma podria contribuir al dany vascular.

En el context d'aquests resultats, i els presentats en els anteriors capítols, l'augment d'activitat SSAO plasmàtica descrit en pacients amb AD sever podria contribuir a l'angiopatia cerebral amiloide i al dany vascular extensament descrit en aquesta malaltia (Yu, 2001).