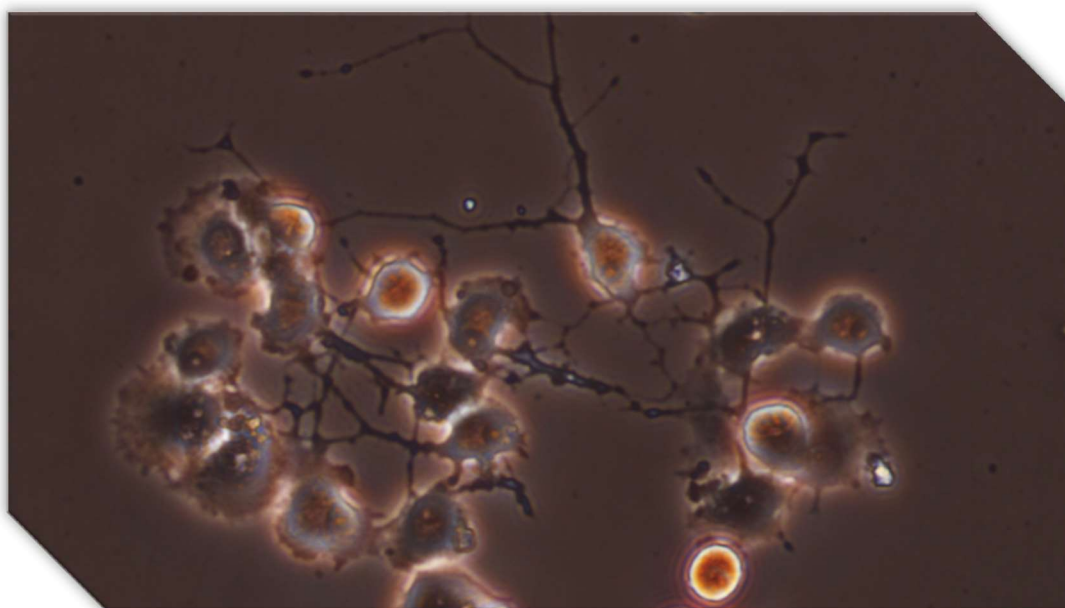


**AVALUACIÓ DE L'ACTIVITAT DE NOUS COMPOSTOS SOBRE
LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL EN CÈL·LULES PC12**

Anna Peñalver Fa

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA



Tutor acadèmic i supervisor: Francesc X. Sureda Batlle

Prof. Titular de Farmacologia

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili,
francesc.sureda@urv.cat

7 de juny del 2021

Jo, Anna Peñalver Fa, amb DNI 48137263-B, sóc coneixedora de la guia de prevenció del plagi a la URV *Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants* (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 7 de Juny de 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anna', with several large, sweeping strokes crossing over it.

ÍNDIX

ABREVIATURES.....	4
1. DADES DEL CENTRE.....	6
2. RESUM.....	7
3. INTRODUCCIÓ.....	8
3.1. RECEPTOR σ_1	8
3.1.1. HISTÒRIA.....	8
3.1.2. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS.....	9
3.1.3. FUNCIÓ BIOLÒGICA.....	11
3.2. AGONISTES DEL RECEPTOR σ_1	15
3.3. ANTAGONISTES DEL RECEPTOR σ_1	16
4. HIPÒTESI.....	17
5. OBJECTIUS.....	17
6. METODOLOGIA.....	18
6.1. MATERIAL.....	18
6.1.1. SUBSTRAT BIOLÒGIC.....	18
6.1.2. COMPOSTOS QUÍMICS.....	18
6.1.3. MATERIAL PER A CULTIU CEL·LULAR.....	19
6.2. CULTIU CEL·LULAR.....	19
6.2.1. PROTOCOLS.....	19
6.2.2. DIFERENCIACIÓ AMB NGF.....	22
6.2.3. AVALUACIÓ DE LA POTENCIACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL.....	23
7. RESULTATS.....	26
7.1. EFECTE DEL NGF EN LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL EN PC12.....	26
7.2. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DELS COMPOSTOS (+)-SKF-10,047, PRE-084 I NE-100 EN LA POTENCIACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL INDUÏDA PER NGF EN PC12.....	27

7.3. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DELS COMPOSTOS INVESTIGACIONALS EPB1 I EPB2, DEL (+)-SKF-10,047 I DEL NE-100 EN LA POTENCIACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL INDUÏDA PER NGF EN PC12	28
8. DISCUSSIÓ	29
9. CONCLUSIONS	31
10. AGRAÏMENTS	32
11. BIBLIOGRAFIA	33
12. AUTOAVALUACIÓ	37
ANNEX 1	38

ABREVIATURES

ATF6: Factor de transcripció activador 6

Bcl-2: Cèl·lules B limfoma 2

BDNF: Factor neurotròfic derivat del cervell

BIP: Proteïna d'unió a la immunoglobulina

CaMKIV: Quinasa IV dependent de calci / calmodulina

CD5K: Quinasa 5 dependent de ciclina

CM: Medi complet

CNS: Sistema Nerviós Central

CO₂: Diòxid de Carboni

CRE: Element de resposta a cAMP

DMSO: Dimetilsulfòxid

DTG: Ditolilguanidina

ERK: Quinasa regulada per senyal extracel·lular

FBS: Sèrum Boví Fetal

HS: Sèrum de Cavall

IP3R: Receptor inositol 1,4,5-trisfosfat

IRE1: Enzim 1 que requereix inositol

MAM: Membrana associada als mitocondris

MAO-B: Monoaminoxidasa-B

MAP: Proteïnes associades als microtúbuls

NFκB: Factor nuclear κB

NGF: Factor de creixement neuronal

P/S: Penicilina-estreptomina

PERK: Quinasa del reticle endoplasmàtic semblant a PRKR

RanBP2: Proteïna d'unió a Ran 2

RE: Reticle Endoplasmàtic

NMDA: N-metil-D-aspartat

ROS: Substàncies reactives d'Oxigen

RPMI: Medi Institut Roswell Park Memorial

SD: Desviació estàndard

sEH: Epòxid hidrolasa soluble

TrkA: Tirosina Quinasa A

UPR: Resposta a proteïnes desplegadas

1. DADES DEL CENTRE

El treball de fi de grau està basat en les pràctiques curriculars cursades al grup de recerca FARBIOLO-Farmacobiologia Cel·lular coordinat per la Dra. Montserrat Giralt Batista que pertany a la Facultat de Medicina i Ciències de la Salut de la Universitat Rovira i Virgili.

Aquest grup de recerca treballa en diferents línies d'investigació com ara l'estudi de marcadors de diagnòstic, funcionalitat i mecanismes d'acció d'estrès oxidatiu i inflamació, aliments funcionals per a la prevenció de malalties cardiovasculars i l'estudi de processos de neuroprotecció i neurodegeneració, especialment en models *in vitro*.

L'estudi realitzat a les pràctiques és una de les parts experimentals d'un projecte major del *Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad "Síntesis de compuestos con mecanismos innovadores contra enfermedades neurodegenerativas"* (SAF2017-82771-R) liderat pel Dr. Santiago Vázquez Cruz, membre de la Unitat de Química Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, en col·laboració amb el Dr. Francesc Xavier Sureda Batlle, responsable de la Unitat de Farmacologia de la Universitat Rovira i Virgili. De manera que, mentre que l'equip del Dr. Vázquez s'encarrega de la síntesi i caracterització química dels compostos investigacionals, el del Dr. Sureda és responsable de l'avaluació de l'activitat farmacològica.

2. RESUM

Les malalties neurodegeneratives són un grup heterogeni de trastorns que es caracteritzen per la pèrdua progressiva de la integritat neuronal, tant estructural com funcional. Un dels majors problemes d'aquestes malalties és que actualment només existeixen tractaments simptomàtics per alleugerir o minimitzar els efectes clínics del procés degeneratiu, però no disposem de cap fàrmac que permeti l'aturada o la regeneració de la integritat neuronal. És per això, que és important l'estudi de noves dianes terapèutiques involucrades en els processos de degeneració per a poder trobar fàrmacs que permetin tractar-les eficaçment.

L'estudi en el que es basa aquest treball s'emmarca dins d'un projecte major que consisteix en la síntesi de compostos que siguin capaços de modular la resposta del receptor σ_1 (Sigma-1) i, a la vegada, d'inhibir l'enzim epòxid hidrolasa soluble (sEH). Ambdós són dianes que modulen vies i mecanismes involucrats en l'aparició de la malaltia de l'Alzheimer i del dolor neuropàtic. Tot i que es coneix que la inhibició del sEH provoca respostes cel·lulars que ajuden a la neuroprotecció, és necessari avaluar si els compostos sintetitzats actuen com a agonistes o antagonistes sobre els receptors σ_1 , ja que les respostes que desencadenen són completament diferents.

Així doncs, en aquest estudi, s'avalua l'activitat farmacològica *in vitro* del caràcter agonista o antagonista sobre el receptor σ_1 dels compostos sintetitzats. Per a fer-ho, s'ha utilitzat una línia cel·lular de feocromocitoma de rata denominada PC12. És un model àmpliament utilitzat per estudiar la diferenciació i el creixement neuronal. Per tal d'establir aquesta activitat s'han mantingut en cultiu les cèl·lules i s'han diferenciat amb el factor de creixement neuronal (NGF). Posteriorment, s'han incubat amb diferents compostos per avaluar l'efecte d'aquestes substàncies sobre la proliferació de neurites, fet que indicaria la seva possible utilitat en malalties neurodegeneratives.

Paraules clau: Receptor sigma-1 (σ_1), Factor de creixement neuronal (NGF), malalties neurodegeneratives, PC12, neuroprotecció.

3. INTRODUCCIÓ

3.1. RECEPTOR σ_1

El receptor σ_1 (sigma-1) és una proteïna transmembrana amb activitat xaperona, sensible al calci, que es codificada, en humans, pel gen *SIGMAR1*. Aquesta proteïna s'expressa tant en el sistema nerviós central (SNC) com en teixits perifèrics.

En el SNC, el receptor σ_1 està relacionat amb la neuroprotecció, la neuroinflamació, la neurotransmissió i la neuroplasticitat i això s'associa amb funcions cerebrals avançades com la memòria, el coneixement, l'estat d'ànim, el dolor i la neurodegeneració. En els últims anys, s'ha plantejat que el receptor σ_1 és una possible diana per a fàrmacs útils en diversos trastorns del SNC, incloent trastorns degeneratius, dolor, ictus, degeneracions retinianes i depressió. ^[1]

Una característica important del receptor σ_1 és la seva regulació per lligands (molècules amb capacitat d'unir-s'hi) tant endògens com sintètics. Segons la resposta fisiològica que el lligand provoca a l'unir-se al receptor, aquests es poden classificar en dos grups:^[2]

- **Agonistes:** Molècules que activen el receptor provocant i/o potenciant una resposta fisiològica.
- **Antagonistes:** Molècules que realitzen una acció inhibidora de la resposta fisiològica o patològica mediada per les substàncies endògenes que normalment activen aquestes dianes.

Segons quina sigui l'activitat del lligand se'n podrà deduir una aplicació terapèutica o una altra.

3.1.1. HISTÒRIA

La història del receptor σ comença l'any 1976. Inicialment, els estudis farmacològics sobre opioides van conduir a pensar que el receptor σ mediava els efectes psicotomimètics¹ de la morfina i els seus anàlegs i això va portar a la classificació d'aquest com a un receptor opioide. Més tard, altres experiments van revelar que el lloc d'unió del receptor σ era diferent dels receptors opioides i que no tenia capacitat d'unir-se a opioides clàssics com la naloxona, la etorfina o els benzomorfans. Això va permetre reclassificar-lo com una nova família de receptors independents basant-se també en la seva estructura i funcions. ^[1,3]

¹ La psicotomimesis és l'aparició de símptomes psicòtics després de l'administració drogues o fàrmacs.

Més endavant, l'any 1992, es van diferenciar dos subtipus de receptors σ , els quals van ser catalogats com a σ_1 i σ_2 . Aquests no estan relacionats genèticament ja que provenen de gens diferents, i es poden distingir pel seu pes molecular, la seva distribució anatòmica i cel·lular i els perfils d'unió de lligands. A continuació podem observar les principals diferències que s'han documentat entre ambdós receptors.

	Receptor σ_1	Receptor σ_2
Gen codificant	<i>SIGMAR1</i>	<i>TMEM97</i>
Pes molecular	24KDa	18-22KDa
Localització	MAM (en el RE)	RE i lisosomes
Perfils d'unió	Alta afinitat per benzomorfans, DTG i haloperidol	Alta afinitat pel DTG i haloperidol No afinitat pels benzomorfans

Taula 1. Diferències principals entre els receptors σ . DGT: ditolilguanidina

Durant més de quatre dècades, els dos receptors σ han estat objectiu d'estudi pels farmacòlegs i han estat proposats com a dianes pel tractament de múltiples malalties. Per exemple, el receptor σ_1 és considerat una potent diana terapèutica pel dolor i patologies neurològiques com ara l'esclerosi lateral amiotròfica, la malaltia d'Alzheimer, de Parkinson, trastorns de la retina, ictus i per addiccions a l'alcohol i a la cocaïna. Tot i això, l'intens interès no ha permès encara aclarir el potencial terapèutic dels receptors σ .^[1,3]

3.1.2. CARACTERÍSTIQUES ESTRUCTURALS

El receptor σ_1 és una proteïna transmembrana amb una massa molecular d'uns 24kDa formada per 223 aminoàcids. La seva seqüència aminoacídica no comparteix cap homologia significativa amb cap altra proteïna receptorial transmembrana de mamífer coneguda.^[1,3,4]

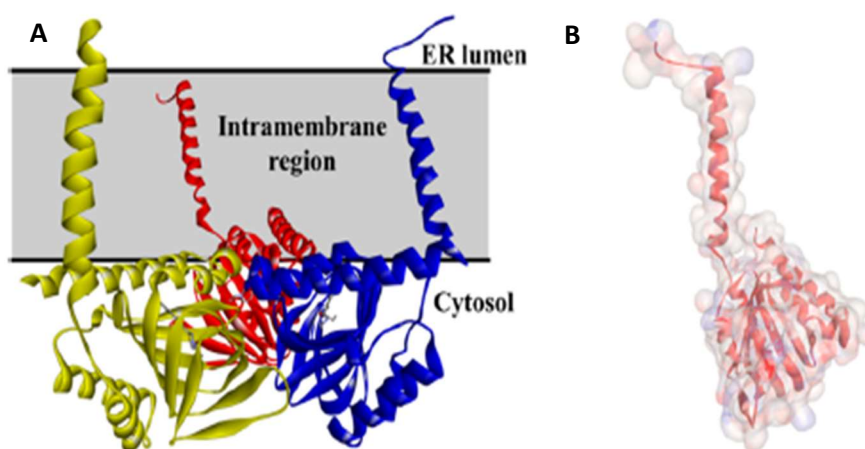


Figura 1. A) Representació de l'estructura homotrimerica del receptor σ_1 . B) Representació d'un protòmer, és a dir, una de les tres subunitats (idèntiques entre elles) que formen l'homotrimer.^[1]

L'any 2016, es va determinar la primera estructura cristal·lina sencera del receptor σ_1 utilitzant anàlisi de difracció de raigs X (Figura 1). A partir d'aquesta estructura es va determinar que la proteïna receptoral està composta per tres subunitats cada una de les quals conté una part transmembrana. Les hèlix alfa que componen els dominis transmembrana es troben separades i estan localitzades als extrems del complex, mentre que els dominis C-terminal de cada subunitat formen l'estructura trimèrica. Cada un dels dominis C-terminal conté un barril beta amb un lloc d'unió altament conservat pels lligands. [4]

El lloc d'unió del receptor σ_1 és capaç de lligar moltes molècules estructuralment diferents amb una alta afinitat. Aquest interacciona amb la majoria dels seus lligands mitjançant la interacció electrostàtica entre l'aminoàcid Glu172 i l'àtom de nitrogen present en la majoria de lligands, mentre que la resta del lligand és lliure d'encaixar a la butxaca hidrofòbica del barril beta, la qual conté residus hidrofòbics. Cal destacar que, el receptor σ_1 lliga alguns neurosteroides que no tenen l'àtom de nitrogen. En conseqüència, aquests lligands podrien interaccionar de manera diferent, possiblement quan l'aminoàcid Glu172 està protonat. En la Figura 2 es pot observar el lloc d'unió dels agonistes al receptor σ_1 [3,4]

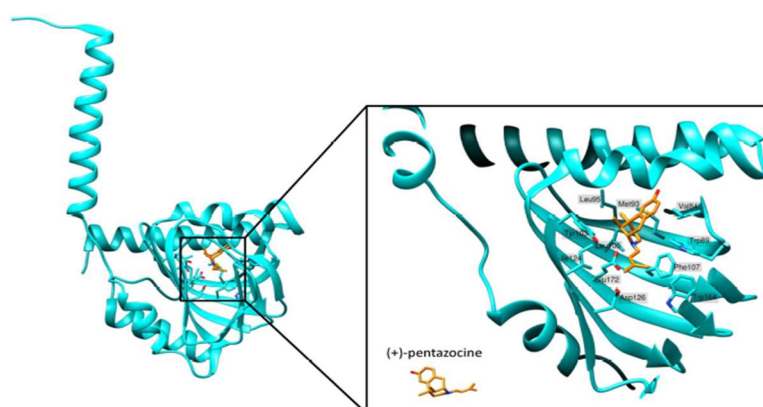


Figura 2. A la part esquerra de la imatge podem observar l'estructura del receptor σ_1 unit a l'agonista (+)-pentazocina. A la part dreta de la imatge s'observa el lloc d'unió pels lligands amb els aminoàcids més importants senyalats. [4]

➤ Oligomerització

Es coneix que el receptor σ_1 pot existir en múltiples estats oligomèrics (monòmers, tetràmers, hexàmers, octàmers...) i que és possible que sigui la unió d'un lligand el que indueixi un canvi en l'estat oligomèric del receptor i que això, podria arribar a determinar la resposta funcional.

En el model que proposa Hong et al. (2017), representat en la Figura 3, els agonistes promouen la dissociació del receptor σ_1 en monòmers, de manera que aquests podrien

mobilitzar-se a altres compartiments subcel·lulars i associar-se amb proteïnes. Contràriament, els antagonistes estableixen els estats oligomèrics, prevenint així interaccions entre el receptor i altres proteïnes. A més, s'ha demostrat que el receptor en el seu estat oligomèric és capaç de lligar un lligand. En canvi, se sap que els monòmers han perdut aquesta propietat.^[4,6]

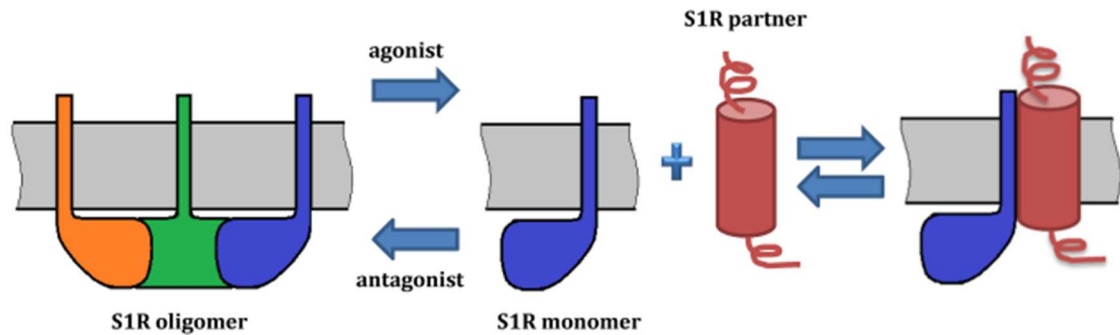


Figura 3. Model basat en Hong et al. (2017), de la oligomerització del receptor σ_1 .

Així doncs, basant-nos en aquest model es podria afirmar que els lligands regulen l'associació del receptor σ_1 amb altres proteïnes. Malgrat això, no està molt clar quina forma oligomèrica del receptor σ_1 , existeix *in vivo* i quins estats són funcionalment actius.^[4]

3.1.3. FUNCIO BIOLÒGICA

El receptor σ_1 es localitza principalment en una regió específica de la membrana del reticle endoplasmàtic (RE) associada als mitocondris (MAM) la qual és important pel control de la homeòstasi del calci, pel metabolisme i transport lipídic, pel plegament proteic i per l'autofàgia.^[1,4]

Com es mostra en la Figura 4, el receptor σ_1 es troba associat a la proteïna xaperona BiP formant un complex que participa en el plegament de proteïnes i impedeix la translocació del receptor σ_1 en el seu estat inactiu. Aquest receptor pot esdevenir actiu de dues maneres diferents: per la unió específica d'un agonista o bé, a causa de l'esgotament de calci en el RE. Això induïx la dissociació del complex permetent al receptor σ_1 moure's i interaccionar amb altres proteïnes que es poden trobar en el mateix RE, o en altres membranes com pot ser la plasmàtica, la nuclear o la mitocondrial. Generalment es creu que l'activació d'aquest receptor modula una sèrie de dianes com poden ser altres receptors, canals iònics, lípids, quinases, i altres proteïnes de senyalització. S'han trobat almenys 49 proteïnes que tenen una important divergència estructural i de seqüència entre elles i que interaccionen amb el receptor σ_1 (Figura 4).

[1,3,4,7]

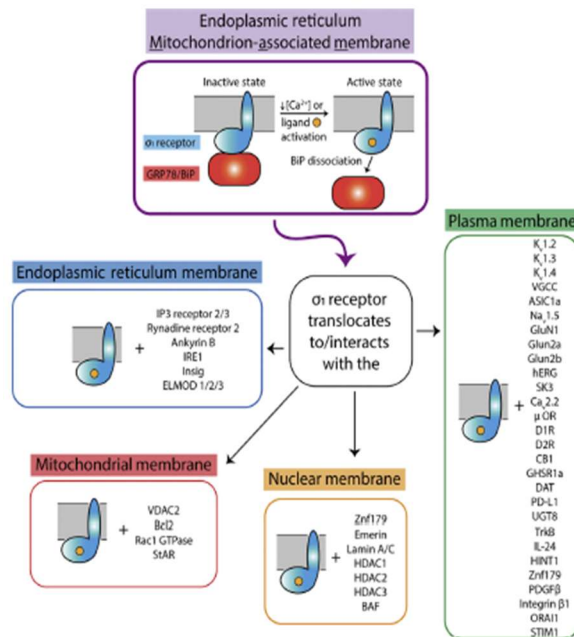


Figura 4. Resum dels llocs on actua el receptor σ_1 després de la seva activació i les proteïnes amb les que pot arribar a interaccionar. [3]

Si ens fixem en la Figura 5, en la membrana del RE, el receptor σ_1 en el seu estat actiu és capaç de modular la senyalització del calci mitjançant la interacció amb el receptor IP₃ (IP₃R), de manera que potencia l'influx de calci des del RE cap al mitocondri. Això provoca una sobrecàrrega de calci en el mitocondri que estimularà l'alliberació de múltiples factors apoptòtics. El receptor σ_1 contrarresta aquest senyal pro-apoptòtic per mitjà de la regulació de les proteïnes Bcl-2 que promouran la supervivència cel·lular. Aquesta entrada de calci també impulsa la generació d'ATP que va acompanyat d'un increment de substàncies reactives d'oxigen (ROS) les quals són neutralitzades gràcies al receptor σ_1 que regula el factor de transcripció Nrf2 perquè aquest activi els gens involucrats en la protecció cel·lular contra l'estrès oxidatiu. [8]

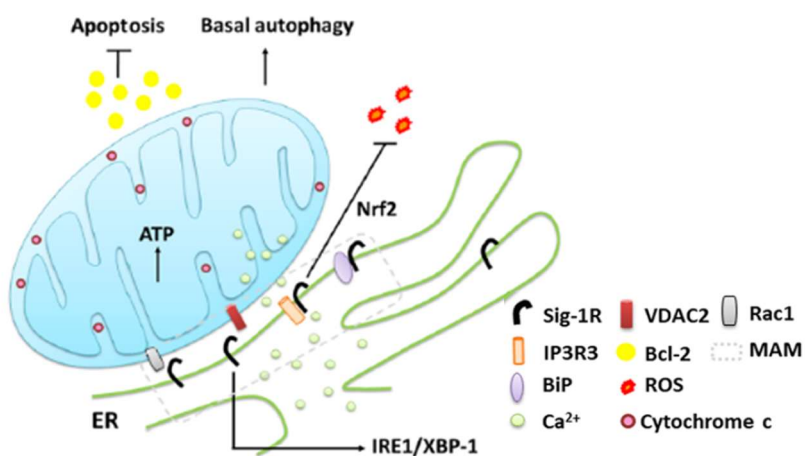


Figura 5. Regulació de la funció mitocondrial pel receptor σ_1 present en la membrana del reticle endoplasmàtic. [8]

L'augment de ROS també pot desencadenar l'estrès del RE. Aquest és el principal orgànel que s'encarrega del correcte plegament i la modificació de les proteïnes de membrana i secreció, així que l'estrès pot suposar l'acumulació de proteïnes plegades incorrectament. En aquest cas, s'activa la resposta de proteïnes desplegadas (UPR) que impedeix la sobrecàrrega del lumen amb proteïnes acabades de sintetitzar i activant la degradació de proteïnes mal plegades a través del sistema ubiquitina-proteosoma i l'autofagia. Si el senyal d'estrès és prolongat en el temps, les proteïnes defectuoses poden entrar al mitocondri causant disfunció en la producció d'energia. Com a resultat, les vies de mort cel·lular s'activen en forma de reaccions apoptòtiques i pro-inflamatòries. El receptor σ_1 , com a xaperona, és capaç de modular la UPR mitjançant la interacció amb proteïnes com la IRE1, PERK o ATF6.^[8,9]

D'altra banda, el receptor σ_1 actiu es pot mobilitzar cap a la membrana plasmàtica, podent regular l'activitat de receptors de neurotransmissors com els de dopamina, glutamat, receptors opioides i canals de potassi.

De la mateixa manera, si el receptor σ_1 es mobilitza a la membrana nuclear, pot interaccionar amb la proteïna emerina, la RanBP2 i la Tau. La interacció amb emerina recluta una sèrie de proteïnes que porten a la inhibició de la transcripció del gen MAO-B, un enzim important en la inactivació de la dopamina. La proteïna Tau protegeix l'elongació dels axons mitjançant la regulació indirecta de la quinasa 5 dependent de ciclina (CD5K).^[9,10]

Totes aquestes respostes cel·lulars com l'estrès del RE, l'estrès oxidatiu, la disfunció mitocondrial i la desregulació del calci, entre d'altres, són mecanismes patològics que comparteixen la majoria de les malalties neurodegeneratives, de tal manera que l'activació i el potenciament del receptor σ_1 per part d'agonistes podria mitigar molts dels efectes perjudicials que causen aquestes malalties. És aquesta una de les raons per la qual s'ha postulat que el receptor σ_1 seria una diana terapèutica prometedora.

Tot i això, calen més estudis per determinar si alguns dels efectes moduladors són realment resultat d'una interacció directa entre el receptor σ_1 i les proteïnes diana, ja que en ocasions els lligands d'aquest receptor que són capaços de modular, per exemple, els canals iònics de manera independent a la interacció amb el receptor σ_1 . Per a estudiar-ho s'han dut a terme experiments de Co-immunoprecipitació, de transferència d'energia de ressonància o de lligació que demostren la seva proximitat, però no poden distingir entre interaccions directes i indirectes.^[1,3]

➤ El rol del receptor σ_1 en la neurogènesi

Es coneix que a més de tenir un rol important en la neuroprotecció cel·lular, el receptor σ_1 també està relacionat amb la generació de neurites i l'elongació d'axons. El mal funcionament del manteniment dels axons (encarregats de la modulació de l'alliberament de neurotransmissors i la funció neuronal) contribueix al patiment de trastorns del SNC com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson, l'íctus i lesions de la medulla espinal. [11]

Tot i que la diferenciació neuronal ve induïda pel NGF, es creu que aquest incrementa la concentració de receptors σ_1 i són aquests, quan són activats mitjançant la interacció amb els seus agonistes com el donepezil i la fluvoxamina, els que potencien el creixement de neurites. [7,12,13]

Takebayashi et al. 2000 va afirmar que el receptor σ_1 pot estar en la membrana del RE formant un complex amb una proteïna citoesquelètica anomenada anaquirina i amb el IP3R. El complex és regulat per agonistes i antagonistes del receptor σ_1 de manera que quan interacciona amb un agonista, el complex receptor σ_1 /anaquirina es dissocia del IP3R. L'anaquirina té un paper important en el transport de vesícules i la interacció del receptor σ_1 amb un agonista podria arribar a modular el transport vesicular i l'alliberament de neurotransmissors afectant la dinàmica de l'anaquirina i facilitant el transport vesicular amb el receptor σ_1 com a proteïna carga i l'anaquirina com a proteïna adaptadora. En canvi, quan el receptor σ_1 interactua amb un antagonista es dissocia del complex anaquirina/IP3R. Així doncs aquest estudi suggereix que el receptor σ_1 pot arribar a afectar la dinàmica i el reestructurament de proteïnes del citoesquelet podent causar així alteracions en les cèl·lules. [13,14]

Tant el receptor σ_1 com la proteïna anaquirina s'ha vist que apareixen en una gran concentració en el con de creixement neuronal (situat a la punta del creixement de la neurita) el qual està relacionat amb el creixement, extensió i guia de la neurita. Per tant, s'hipotitza que el receptor σ_1 pot estar relacionat amb els canvis morfològics de la cèl·lula, específicament en l'inici del creixement de la neurita.

D'altra banda, també se sap l'augment de la concentració de calci en el RE provocat per l'increment del calci intracel·lular per l'administració de NGF en cèl·lules PC12 causa la dissociació de la proteïna anaquirina del IP3R, de manera que es podria dir que la concentració de calci podria estar relacionada amb l'acció del receptor σ_1 pel que fa a la potenciació del creixement de neurites induït per NGF. [13-15]

Una altra relació important a destacar entre el receptor σ_1 i l'elongació axonal ve determinada per la proteïna Tau. Aquesta és una proteïna que pertany a la família de

les proteïnes associades als microtúbuls (MAP) i que s'uneix a la superfície dels microtúbuls estabilitzant-los i promovent el seu ensamblatge a partir de les subunitats de tubulina determinant el recorregut i la longitud de l'axó [16]. Breument, Tsai et al. 2015 van determinar que el receptor σ_1 regula, via la interacció amb l'àcid mirístic, el temps de vida mitja de la proteïna p35 que activa la CD5K mantenint així una fosforilació adequada de la proteïna Tau i en conseqüència, l'allargament de l'axó al cervell.

A més a més del calci i l'àcid mirístic, també s'ha hipotitzat que l'activitat del receptor σ_1 pot arribar a modular la plasticitat cel·lular modificant directament l'activitat de:

- Factors de transcripció pleiotròpica, com el factor nuclear κB (NF κ B).
- Canals iònics, com el corrent K^+ activat per calci de conductància petita (canals SK).
- Quinases, com la quinasa IV dependent de calci / calmodulina (CaMKIV).
- Receptors acoblats amb proteïna G.
- Factors tròfics, com el factor neurotròfic derivat del cervell (BDNF).

En conclusió, el receptor σ_1 té un paper important en la plasticitat cerebral, la resposta a l'estrès, l'aprenentatge i la memòria i la neuroprotecció. Les accions neuroprotectores i neurorestoratives combinades proporcionen una àmplia finestra terapèutica.[17]

3.2. AGONISTES DEL RECEPTOR σ_1

Hi ha diversos compostos com els antipsicòtics (haloperidol), antidepressius (fluvoxamina, sertralina, fluoxetina, imipramina), analgèsics (pentazocina), antitussius (carbetapentà) i medicaments utilitzats contra l'Alzheimer (donepezil) que presenten una activitat agonista pel receptor σ_1 i que per tant poden arribar a ser agents terapèutics prometedors per determinades malalties neurològiques. [1,7,6,12]

El donepezil és un fàrmac autoritzat pel tractament de la malaltia d'Alzheimer a través, fonamentalment, de la inhibició de l'acetilcolinesterasa. Millora les funcions cognitives i la funcionalitat general que es veu alterada durant aquest trastorn neurodegeneratiu. Curiosament, aquest fàrmac s'uneix al receptor σ_1 al SNC.

L'ifenprodil és un agent vasodilatador cerebral i antiedemència utilitzat en alguns països. Aquesta molècula actua com a antagonista del receptor NMDA, però també s'uneix a ambdós receptors sigma en el cervell.

Antidepressius com la fluvoxamina, la fluoxetina i escitalopram són inhibidors selectius de la recaptació de serotonina i són molt utilitzats tant en el trastorn depressiu major

com en d'altres trastorns neuropsiquiàtrics com, l'ansietat o el trastorn obsessiu-compulsiu. [6]

Totes aquestes molècules són fàrmacs coneguts que ja s'utilitzen, que s'ha comprovat que tenen afinitat pel receptor σ_1 i s'ha determinat que potencien la diferenciació neuronal induïda pel NGF en cèl·lules PC12, però tot i ser selectius per aquest receptor, la seva activitat normalment s'atribueix a l'ocupació d'altres dianes, com en el cas de la fluvoxamina i la fluoxetina que són inhibidors selectius de la recaptació de serotonina. [6,18] Contràriament, molècules com el PRE-084, la (+)-pentazocina i el (+)-SKF-10,047 tenen activitat agonista sobre el receptor σ_1 però són més selectius. [19]

Per a determinar la selectivitat d'un compost per a un o altre receptor, cal obtenir un paràmetre que mesuri l'afinitat per a una o altra diana. La constant K_i és un paràmetre que defineix l'afinitat d'un enllaç entre un lligand i un receptor a través de determinats assaigs moleculars (assaigs de competició per a la unió de dianes). Una K_i baixa està relacionada amb una alta afinitat, mentre que un valor de K_i alta significa una baixa afinitat de la molècula pel receptor. En la Taula 2 hi ha els diferents valors de K_i que ens ajuden a determinar la selectivitat dels diferents fàrmacs esmentats enfront el receptor σ_1 i σ_2 .

Agonistes del receptor σ_1 selectius				Agonistes del receptor σ_1 no selectius			
	Ki nM σ_1	Ki nM σ_2	R		Ki nM σ_1	Ki nM σ_2	R
PRE-084 [33]	2.2	13091	5950	Donepezil [31]	14.6	ND	-
(+)-Pentazocina [30]	6,7	1361	203	Fluvoxamina [27]	36	8439	234
(+)-SKF-10,047 [30]	28,7	33654	1172	Fluoxetina [32]	240	16100	67,1

Taula 2. Valors de K_i dels diferents agonistes del receptor σ .

3.3. ANTAGONISTES DEL RECEPTOR σ_1

En canvi, els antagonistes del receptor σ_1 han estat proposats com una possible estratègia eficaç i segura per abordar afeccions doloroses cròniques difícils de tractar com el dolor neuropàtic ja que s'ha vist que poden proporcionar efectes antipsicomimètics, antinociceptius i analgèsics [19].

Múltiples estudis confirmen l'activitat antagonista i la gran selectivitat del lligand NE-100 respecte el receptor σ_1 [7,12,20,21]. S'ha demostrat experimentalment que aquest compost bloqueja els efectes d'agonistes com el PRE-084 [22], el donepezil [12], la fluvoxamina [7] o la pridopidina. L'efecte d'aquest últim compost també pot ser bloquejat per l'haloperidol, un altre antagonista del receptor σ_1 [23].

4. HIPÒTESI

Aquest treball és una de les parts experimentals que forma part d'un projecte major liderat pel Dr. Santiago Vázquez Cruz, membre de la Unitat de Química Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, en col·laboració amb el Dr. Francesc X. Sureda Batlle, membre de la Unitat de Farmacologia de la Universitat Rovira i Virgili, en el qual es vol estudiar la utilització de nous compostos obtinguts per síntesi química, que són al mateix temps, lligands del receptor σ_1 i inhibidors de l'enzim sEH, amb la finalitat de tractar malalties neurodegeneratives o el dolor neuropàtic.

Tant el sEH com el receptor σ_1 han estat escollits com a dianes perquè ambdós modulen vies i mecanismes involucrats en la patogènesi d'aquestes malalties. Griñán-Ferré et al. 2020 van demostrar que la inhibició de l'enzim sEH reduïa la neuroinflamació, l'estrès del reticle endoplasmàtic i l'estrès oxidatiu, de manera que millorava la resposta endògena de l'organisme i es reduïa el deteriorament i la mort de les neurones. Tot i això, per avançar en el desenvolupament preclínic d'aquests lligands duals sEH-receptor σ_1 cap a estudis *in vivo*, és crucial determinar el comportament dels compostos sintetitzats ja que poden actuar com a neuroprotectors, en el cas de ser agonistes, i per tant ser d'interès per malalties neurodegeneratives, com l'Alzheimer, o bé ser antagonistes, actuant així com a analgèsics, i podent ser d'utilitat per al dolor neuropàtic.

Així doncs, aquest treball pretén determinar el caràcter agonista o antagonista dels compostos sintetitzats d'acord a l'avaluació farmacològica *in vitro*. La hipòtesi que es planteja és que **es pot identificar la natura agonista de nous compostos investigacionals sobre el receptor σ_1 , en base a la potenciació de la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12, i que aquesta és una tècnica robusta i eficient.**

5. OBJECTIUS

Els objectius son:

- Comprovar l'activitat agonista i antagonista respecte el receptor σ_1 dels compostos (+)-SKF-10,047, PRE-084 i NE-100 i per tant, el seu efecte sobre la potenciació de la diferenciació cel·lular induïda amb NGF en cèl·lules PC12.
- Determinar l'activitat dels compostos investigacionals sintetitzats pel projecte.
- Valorar la factibilitat de la tècnica com a eina de cribratge farmacològic.

6. METODOLOGIA

6.1. MATERIAL

6.1.1. SUBSTRAT BIOLÒGIC

Respecte al substrat biològic, per a dur a terme l'experiment s'han utilitzat cèl·lules PC12 (ECACC 88022401, adquirides a través de Merck-Sigma Aldrich). La línia cel·lular prové d'un feocromocitoma de rata, tumor benigne que es desenvolupa en la medulla suprarenal, que conté una mescla de cèl·lules neuroblàstiques i eosinofíliques. Creix en suspensió en material de plàstic no tractat, mentre que s'adhereix a superfícies de plàstic recobertes de col·lagen tipus IV. Ha estat utilitzada àmpliament com a model experimental per a l'estudi de la diferenciació neuronal i la neurosecreció. Aquestes cèl·lules, una vegada son tractades amb NGF aturen la proliferació, comencen a desenvolupar neurites, es converteixen en cèl·lules elèctricament excitables i expressen marcadors neuronals. Això és degut a que quan el NGF interacciona amb el seu receptor de tirosina quinasa (TrkA) causa una cascada de senyalització que acaba donant lloc a la diferenciació neuronal, on destaca la participació de la proteïna ERK i la transcripció de gens dependents de CRE.

Com en qualsevol tipus d'experimentació que impliqui cultiu cel·lular, les condicions de treball, tant les superfícies, com el material utilitzat per la manipulació de les cèl·lules són totalment estèrils.

És important remarcar que durant la realització dels diferents assajos s'han fet servir dos batch de cèl·lules diferents.

6.1.2. COMPOSTOS QUÍMICS

➤ Productes per a cultiu cel·lular:

Per a realitzar el medi es va fer servir: Medi RPMI-1640 (R0883-500mL; Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); Horse serum heat inactivated (HS) (H1138-500mL; Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA); Penicilina-estreptomicina (PS) (15070063, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA), Fetal Bovine Serum (FBS) (10500-064, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA) i L-Glutamina (49419-25G, Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

StemPro™ Accutase® Cell Dissociation Reagent és una solució d'enzims proteolítics que es va fer servir per dissociar les aglomeracions cel·lulars (A1110501, ThermoFisher Scientific™, Waltham, MA, USA).

➤ **Fàrmacs:**

El NGF-2.5S de la glàndula submaxil·lar murina (N6009-4X25UG; Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) va ser utilitzat per dur a terme la diferenciació cel·lular.

Per a comprovar el potenciament de la diferenciació cel·lular es va utilitzar els agonistes coneguts del receptor σ_1 (+)-SKF-10,047 (A114 Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) i PRE-084 (P2607, Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). D'altra banda, es va fer servir l'antagonista NE-100 (SML0631, Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

6.1.3. MATERIAL PER A CULTIU CEL·LULAR

El material principal que s'ha fet servir pel manteniment del cultiu ha estat: flascons de cultiu cel·lular de 25cm² i 75cm² (CLS430372, Corning[®], Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), tubs de centrífuga de 15mL (CLS430055, Corning[®], Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) i pipetes de 5 i 10mL (CLS4488, Corning[®] Costar[®] Stripette[®], Merck, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

D'altra banda, per la realització de l'estudi de la diferenciació s'han utilitzat plaques de 24 pous de fons pla, amb tractament de col·lagen de ratolí tipus IV (354430, Corning[®] BioCoat[™], Bedford, M, USA).

6.2. CULTIU CEL·LULAR

6.2.1. PROTOCOLS

➤ **Congelació:**

Després de la recepció de les cèl·lules és recomanable preparar un estoc propi de la suspensió cel·lular, al·liquotada i mantinguda en N₂ líquid. El protocol per a obtenir l'estoc de cèl·lules és:

1. Fer créixer les cèl·lules fins que estiguin en la fase exponencial del creixement.
2. Passar la solució en un tub estèril de centrífuga de 15mL.
3. Centrifugar 150xg durant 5 minuts i descartar sobrenedant.
4. Resuspendre en medi de congelació (10% DMSO, 90% FBS).
5. Aliquotar 1mL de la solució en vials de criocongelació a la densitat desitjada.
6. Posar els vials en gel.
7. Després de 10 min, posar-les a -20°C.
8. En 24h passar-les a -80°C.
9. En 24h passar els vials a N₂ líquid. Els canvis han de fer-se el més ràpid possible.

➤ **Descongelació:**

Les cèl·lules es troben en vials emmagatzemats en un tanc Dewar de N₂ líquid. Per a dur a terme la descongelació s'ha de:

1. Treure el vial que conté la suspensió cel·lular del tanc de N₂ i posar-lo ràpidament en un bany d'aigua a 37°C amb agitació constant fins a la total descongelació.
2. Una vegada descongelat, netejar el vial amb etanol, obrir-lo i passar el contingut en un tub tipus estèril de 15mL.
3. Afegir 5mL de medi complet de manteniment (CM).
4. Centrifugar les cèl·lules 140xg durant 5 minuts.
5. Descartar sobrenedant i resuspendre el pellet en 14mL de CM. Passar-ho a un flascó de cultius de 75cm².

➤ **Preparació del medi de cultiu:**

En aquest experiment s'han utilitzat dos tipus de medi de cultius.

Per una banda, el medi de cultiu complet (CM) és el que s'utilitza pel manteniment rutinari, és a dir, perquè les cèl·lules proliferin. Està format per:

- RPMI 1640. Es caracteritza per tenir un sistema tampó bicarbonat, amb un pH 8, un indicador de pH (vermell fenol), glucosa, sals, aminoàcids i vitamines, però manca de l'aminoàcid L-glutamina, ja que en solució aquosa la glutamina tendeix a metabolitzar-se a glutamat.
- 2mM de glutamina (300mg/L). El reactiu és en pols, de manera que es pesa a la balança analítica, es dissol en RPMI, i la solució s'esterilitza per pressió positiva mitjançant un filtre per a xeringa amb porus de 0,22 µm.
- 10% de *Horse Serum heat inactivated* (HS)
- 5% Fetal Bovine Serum (FBS). Tant el HS com el FBS proporcionen factors d'adhesió, nutrients, hormones i altres substàncies, a més de ser un amortidor contra alteracions com els canvis de pH o endotoxines. També té un alt contingut de factors de creixement i proteïnes, i nivells baixos d'anticossos.
- *Penicilina-estreptomicina* (P/S) barreja de dos antibiòtics per evitar la contaminació bacteriana en el cultiu cel·lular.

D'altra banda, l'altre medi suplementat que s'utilitza és el CM Low (*Complete medium Low*), i es diferencia de l'anterior per tenir una baixa concentració de sèrum, ja que no conté HS i la concentració del FBS és molt reduïda (0,5%). Aquest s'utilitza específicament per a la diferenciació degut a que se sap que el sèrum conté hormones esteroides que s'uneixen al receptor σ_1 .

Així doncs, segons les concentracions, es necessita:

	Per 100mL CM:	Per 50mL CM Low:
HS	10mL	-
FBS	5mL	0,25mL
P/S	1mL solució 1:100 (10000 UI/mL)	0,5mL
Glutamina	10mL de solució (30mg/10mL)	5mL de solució (15mg/5mL)
RPMI-1640	74mL	44,25mL

Ambdós medis s'emmagatzemen en flascons estèrils, es mantenen a 4°C i es fan servir un màxim d'una setmana. El HS, el FBS i la P/S es mantenen congelats a -20°C, mentre que la glutamina i el RPMI 1640 a 4°C.

➤ **Manteniment rutinari:**

Les cèl·lules es mantenen en incubador de CO₂ sota les condicions de 37°C i 5% CO₂ en flascons de 75cm² que conté uns 14mL de suspensió cel·lular en medi complet. El medi es canvia cada dos o tres dies. Per canviar el medi cal:

1. Passar la suspensió cel·lular que es troba en el flascó a tub de 15mL.
2. Centrifugar a 150xg durant 4 minuts.
3. Tractament amb Accutase® (opcional).
4. Resuspendre el pellet o, la suspensió amb Accutase® (en el cas d'haver fet el tractament de dissociació) amb medi complet i retornar la suspensió cel·lular de nou al flascó. El volum final de la solució ha de ser d'entre uns 12-14mL.

➤ **Tractament amb Accutase® :**

Les cèl·lules PC12 creixen en suspensió en flascons de plàstic no tractats formant colònies que son dificultoses de dissociar únicament pipetejant. El tractament amb Accutase® es pot fer tant quan les cèl·lules s'han d'emplacar, per a poder contar-les bé i que quedin separades a la placa, o bé en el mateix manteniment rutinari si hi ha moltes aglomeracions. Els passos a seguir són els següents:

1. Transferir la suspensió cel·lular del flascó a un tub estèril de 15mL.
2. Centrifugar a 150xg durant 4min.
3. Descartar sobrenedant i resuspendre el pellet en 1mL d'Accutase® (Gibco)
4. Passar a incubadora de cultius de CO₂ a 37°C durant 15min. Agitar 3 vegades, cada 5 minuts.
5. Afegir 5mL de CM, o CM Low en cas d'emplacar per la diferenciació.
6. Pipetejar repetidament (x20) amb una pipeta Pasteur de vidre estèril.

➤ **Emplacatge i cultiu per avaluar activitat sobre receptors σ_1 :**

Per a dur a terme l'avaluació de l'activitat del receptor σ_1 *in vitro*, s'ha d'emplacar la suspensió de cèl·lules en una placa de cultiu de 24 pous amb la densitat corresponent. En aquest estudi es va utilitzar densitats de 10.000cèl/mL i 20.000cèl/mL. Una vegada emplaçades, a les 24h es diferencien i s'estudia la potenciació del creixement neuronal amb els diferents fàrmacs. El procediment a seguir és el següent:

1. Realitzar el tractament amb Accutase® resuspenent amb CM Low.
2. Fer un comptatge cel·lular i fer els càlculs pertinents per emplaçar les cèl·lules a la densitat cel·lular desitjada.
3. Emplacar 0.5 mL per pouet.
4. Diferenciar les cèl·lules amb NGF a la concentració desitjada (2.5 a 30 ng/mL).
5. Afegir fàrmacs. Incubar i monitorar.
6. Incubar en incubadora de CO₂ fins a recopilació de les microfotografies (3 i 5 dies després de la diferenciació).

6.2.2. DIFERENCIACIÓ AMB NGF

Com ja s'ha comentat, les cèl·lules PC12 en presència de NGF, aturen la seva proliferació i es diferencien en cèl·lules neuronals de manera dependent de la concentració. És per això que primer s'ha fet una avaluació de la diferenciació neuronal de les cèl·lules PC12 a diferents concentracions de NGF (2,5ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 15ng/mL, 20ng/mL, 30ng/mL) podent determinar així, quina concentració de NGF és la òptima per utilitzar-la posteriorment en l'avaluació de la potenciació de la diferenciació neuronal amb els diferents fàrmacs. Aquest experiment es va fer per n=2.

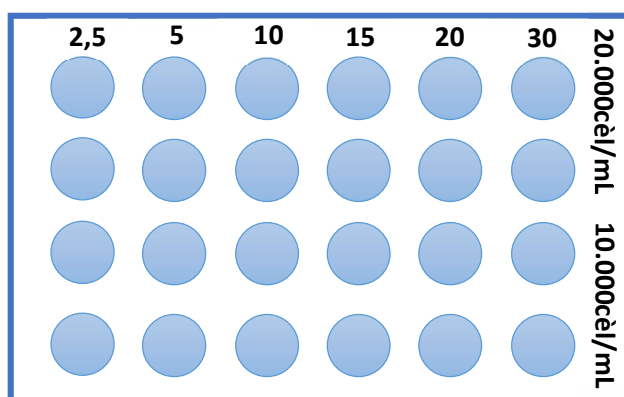


Figura 6. Distribució de la placa de 24 pous amb les diferents concentracions de NGF (en ng/mL) i amb les diferents densitats cel·lulars.

Aquesta mateixa avaluació es va repetir utilitzant el segon batch cel·lular de PC12 canviant algun paràmetre per cobrir més variables. En aquest, com podem veure en la Figura 7, hi ha pous control on no hi ha NGF i en canvi, no hi ha concentració 5ng/mL de NGF, ja que en l'experiment anterior es determina que és molt similar a la de 2,5ng/mL. Les cèl·lules es van sembrar a una densitat de 20.000cèl/mL. L'experiment es va fer per n=1, ja que es va dissenyar només per a comprovar l'estat de diferenciació neuronal inicial del segon batch cel·lular.

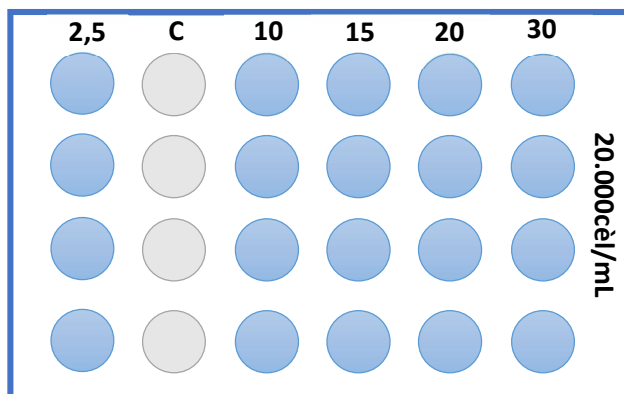


Figura 7. Distribució de la placa de 24 pous amb les diferents concentracions de NGF (en ng/mL) i amb les diferents densitats cel·lulars. C:Control.

6.2.3. AVALUACIÓ DE LA POTENCIACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL

Com ja s'ha esmentat en la introducció, la diferenciació de cèl·lules PC12 induïdes per NGF pot ser potenciada per agonistes del receptor σ_1 com ara (+)-SKF-10,047 i PRE-084 observant un increment en el nombre de cèl·lules diferenciades. En canvi, aquest efecte pot ser bloquejat si el tractament es fa conjuntament amb antagonistes com el NE-100.^[7,19,22,24]

Inicialment es posa a punt la tècnica verificant si els compostos ja definits com agonistes σ_1 potencien la diferenciació per NGF. Per comprovar-ho, es realitza un experiment utilitzant el primer batch de cèl·lules on, en una la placa sembrada i incubada 24h, primer se li afegeix NGF (5ng/mL) i posteriorment s'avalua la potenciació de la diferenciació neuronal mitjançant diferents concentracions dels agonistes (+)-SKF-10047 i PRE-084 (1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M) i el bloqueig d'aquest efecte mitjançant l'antagonista NE-100 (1 μ M). Les concentracions de qualsevol dels compostos van ser escollides en base a la selectivitat que tenen pels receptors σ_1 i σ_2 . Cada experiment es reproduueix un mínim de 3 vegades (n=3).

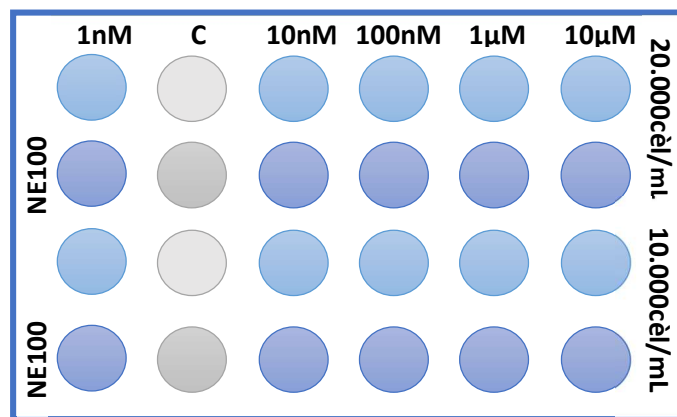


Figura 8. Distribució de la placa de 24 pous amb les diferents concentracions de (+)-SKF-10,047 o PRE-084 i NE100 i amb les diferents densitats cel·lulars. C:Control

Per acabar, amb el segon batch de cèl·lules es duu a terme l'experiment per l'avaluació de l'activitat agonista o antagonista dels compostos investigacionals EPB1 i EPB2. Per fer-ho, s'emplaquen les cèl·lules a una densitat de 20.000 cèl/ml en tots els pous, ja que gràcies a la realització dels primers experiments (Figura 6 i 8) es va veure que la densitat cel·lular més òptima era aquesta. A causa de l'obtenció d'uns resultats poc coherents en els experiments anteriors, es decideix afegir (+)-SKF-10,047 i repetir dues de les condicions ja estudiades. Passades 24 hores de l'emplacatge, s'afegeix NGF a una concentració de 2,5ng/mL, EPB1 i EPB2 a 200nM, (+)-SKF-10,047 a 10µM i NE100 a 1µM.

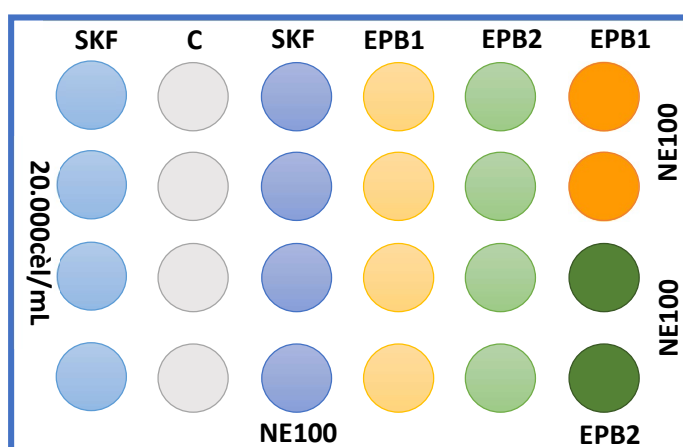


Figura 9. Distribució de la placa de 24 pous amb les diferents concentracions de EPB1, EPB2, (+)-SKF-10,047 i NE100, i la densitat cel·lular.

6.2.4. QUANTIFICACIÓ I ANÀLISI ESTADÍSTIC

Durant el monitoratge de cada experiment, es realitza una fotografia per pou cada 2-3 dies, fins a un màxim de 9 dies després de l'emplacatge, amb el microscopi òptic invertit Nikon Eclipse TE200 el qual té una càmera integrada Toupcam, i amb l'ajuda del programa ToupView 3.7 (ToupTek). En cada imatge hi apareixen una mitjana de 100 cèl·lules.

Per dur a terme la quantificació s'utilitzen les imatges que s'han fet sis dies després de l'emplantatge i amb el mateix programa que s'utilitza per realitzar les fotografies es realitza el comptatge de les cèl·lules que s'han diferenciat. Les cèl·lules diferenciades es compten mitjançant l'avaluació visual de manera que, com es pot observar en la Figura 10, es marquen totes les cèl·lules classificant-les com a:

- Negativa (creu vermella): Quan la cèl·lula és esfèrica i no té cap dendrita.
- Positiva (creu verda): Quan la cèl·lula és morfològicament irregular, amb mínim una dendrita.
- No quantificada (NQ, cercle groc): Quan hi ha una aglomeració de cèl·lules a les quals no se'ls hi veu el nucli ben definit per determinar el nombre de cèl·lules que hi ha. Aquestes no es tenen en compte en el recompte.

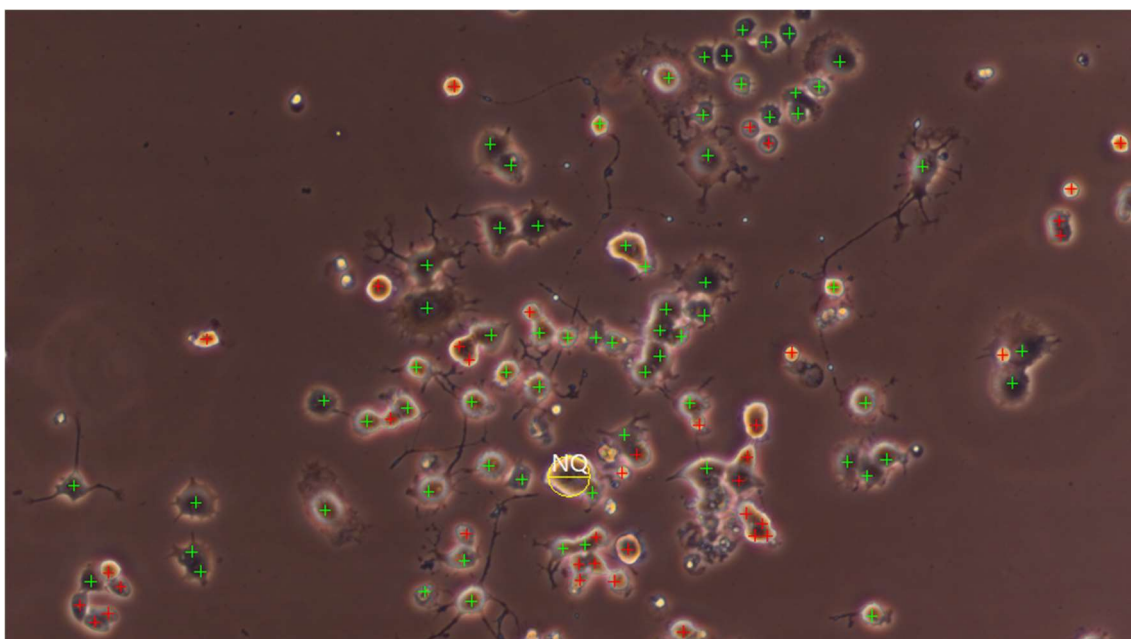


Figura 10. Imatge obtinguda amb la càmera del microscopi òptic invertit Nikon Eclipse TE200, i posteriorment quantificada de cèl·lules PC12, sembrades a una densitat cel·lular de 10.000 cèl./mL, diferenciades amb NGF (5ng/mL), potenciades amb PRE-084 (1µM), a 10000 augments, després d'estar 6 dies sembrades en la placa. Les creus vermelles corresponen a les cèl·lules negatives (no diferenciades), les creus verdes a les cèl·lules positives (diferenciades) i el cercle groc son les cèl·lules no quantificades.

Tot seguit es tracten les dades fent servir el programa Excel on s'acaba obtenint la mitjana aritmètica del percentatge de cèl·lules diferenciades en cada condició, juntament amb la desviació estàndard (SD). Les dades ja tractades s'introdueixen al programa GraphPad Prism 5.0 per a realitzar els diferents gràfics i les corbes concentració resposta de cada experiment.

Finalment, aquest últim programa també s'utilitza per realitzar els anàlisis estadístics on es porta a terme el test ANOVA seguit de la prova de comparació múltiple de Tukey per saber quins dels resultats son significatius i quines de les relacions entre variants és significativa.

7. RESULTATS

7.1. EFECTE DEL NGF EN LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL EN PC12

La diferenciació neuronal induïda per NGF fent ús del primer batch de cèl·lules PC12 augmenta de manera dependent a la concentració. Tot i això, el percentatge de cèl·lules diferenciades en la concentració inicial de NGF (2,5ng/mL) és molt alt, mentre que aquest mateix valor, és baix en la concentració més elevada de NGF (30ng/mL) fet que deixa un marge petit d'actuació per part de la potenciació (Figura 11). En base a aquests resultats es va escollir la concentració de NGF (5ng/mL) utilitzada en l'avaluació de la potenciació de la diferenciació neuronal en PC12. Cap dels resultats és estadísticament significatiu.

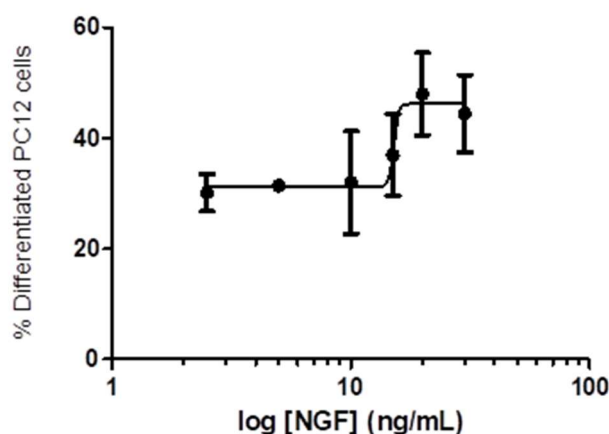


Figura 11. Corba concentració resposta de l'efecte del NGF en la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12. Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte al logaritme de les diferents concentracions de NGF (ng/mL). El gràfic està fet a partir de la mitjana aritmètica dels valors obtinguts en cada condició \pm la SD (n=2).

A continuació, en la Figura 12 hi ha representats els resultats del segon estudi sobre la diferenciació neuronal induïda per NGF utilitzant el segon batch de cèl·lules PC12. S'observa que el nombre de cèl·lules diferenciades augmenta en funció de la concentració. A més, el percentatge de cèl·lules diferenciades a la concentració (2,5ng/mL) és baix, mentre que en la concentració de 30ng/mL NGF aquest valor encara no ha arribat al seu màxim, fet que deixa un marge ampli per a la potenciació de la diferenciació per part dels agonistes del receptor σ_1 .

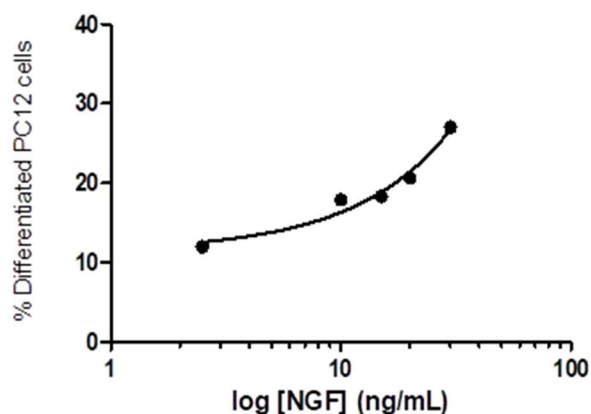


Figura 12. Corba concentració resposta de l'efecte del NGF en la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12. Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte al logaritme de les diferents concentracions de NGF (ng/mL). El gràfic mostra les dades per n=1.

7.2. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DELS COMPOSTOS (+)-SKF-10,047, PRE-084 I NE-100 EN LA POTENCIACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL INDUÏDA PER NGF EN PC12

Els gràfics de les Figures 13 i 14 mostren el percentatge de cèl·lules diferenciades induïdes amb NGF (5ng/mL), potenciades amb (+)-SKF-10047 i PRE-084 respectivament, a diferents concentracions, en presència i absència de NE-100. En ambdós gràfics es pot veure que els pous control mostren un percentatge de cèl·lules diferenciades molt elevat.

D'altra banda, el valor del percentatge de cèl·lules diferenciades en les condicions que contenen NE-100 és majoritàriament més elevat que en les que hi ha absència d'aquest compost.

En el cas de l'experiment on s'avalua l'efecte del (+)-SKF-10,047 (Figura 13), trobem un alt percentatge de cèl·lules diferenciades quan la concentració és mínima a 1nM, mentre que a mesura que va augmentant la concentració, el nombre de cèl·lules diferenciades es manté més baix que fins i tot, el control. Finalment, en la concentració de 10µM, hi ha un petit augment però aquest no és significatiu.

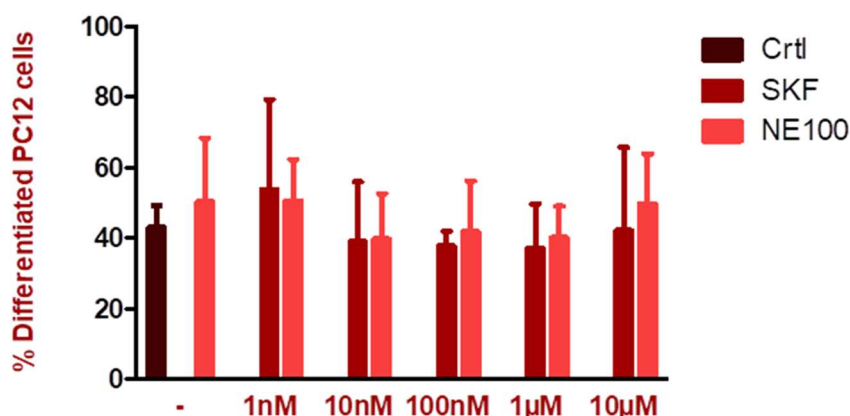


Figura 13. Efecte del (+)-SKF-10,047 i del NE-100 en la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12 induïda per NGF (5ng/mL). Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte a les diferents concentracions de (+)-SKF-10,047. El gràfic està fet a partir de la mitjana aritmètica dels valors obtinguts en cada condició \pm SD (n=3).

Pel que fa l'experiment on s'avalua l'efecte del PRE-084 (Figura 14) el percentatge de cèl·lules diferenciades mostra una petita tendència a augmentar a mesura que s'augmenta la concentració del compost, menys en la condició on la concentració de l'agonista és més baixa (1nM) que aquest valor és elevat, fins i tot per sobre del control. Els resultats obtinguts no són estadísticament significatius.

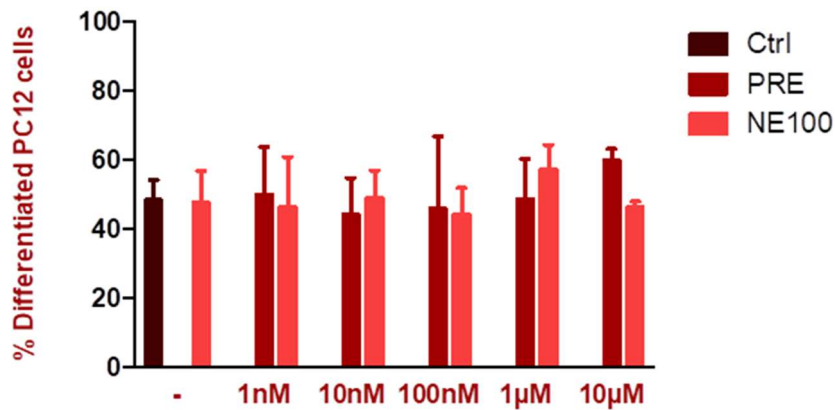


Figura 14. Efecte de l'agonista PRE-084 i l'antagonista NE-100 en la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12 induïda per NGF. Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte a les diferents concentracions de PRE-084. El gràfic està fet a partir de la mitjana aritmètica dels valors obtinguts en cada condició \pm SD (n=3).

7.3. AVALUACIÓ DE L'EFECTE DELS COMPOSTOS INVESTIGACIONALS EPB1 I EPB2, DEL (+)-SKF-10,047 I DEL NE-100 EN LA POTENCIACIÓ DE LA DIFERENCIACIÓ NEURONAL INDUÏDA PER NGF EN PC12

En la Figura 15 s'observa un percentatge baix de cèl·lules diferenciades en el control. Tot i no haver-hi resultats significatius, hi ha una clara tendència en quant a l'augment del nombre de cèl·lules diferenciades en presència dels compostos (+)-SKF-10,047, EPB1 i EPB2 respecte al control. D'altra banda, en presència de NE-100, es percep una lleugera però evident disminució del nombre de cèl·lules diferenciades en quant a la seva respectiva condició sense aquest.

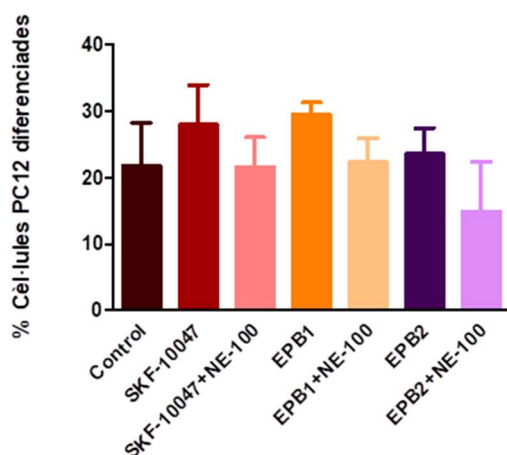


Figura 15. Avaluació de l'efecte dels compostos investigacionals EPB1 i EPB2, del (+)-SKF-10,047 i del NE-100 en la diferenciació neuronal induïda per NGF (2,5ng/mL) en cèl·lules PC12. Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte a les determinades concentracions dels diferents compostos. El gràfic està fet a partir de la mitjana aritmètica dels valors obtinguts en cada condició \pm SD (n=3).

8. DISCUSSIÓ

Per l'estudi de l'efecte de la diferenciació de cèl·lules PC12 amb NGF s'han realitzat dos experiments on, en cada un, s'ha utilitzat un batch cel·lular i s'han contemplat unes variables diferents (Figures 11 i 12). Els resultats obtinguts en els dos experiments recolzen la bibliografia científica, en la que s'indica que el NGF incrementa el nombre de cèl·lules diferenciades PC12, adoptant un fenotip de cèl·lula neuronal, d'una manera dependent de la concentració. [7,13]

En segon lloc, si comparem els dos gràfics veiem que en les concentracions més baixes de NGF (2,5ng/mL) del primer experiment el percentatge de cèl·lules diferenciades és molt elevat i que aquests es mantenen gairebé estables fins a la concentració de 10ng/mL NGF. Contràriament, en el segon experiment, en la mateixa concentració de 2,5ng/mL NGF, el nombre de cèl·lules diferenciades és notablement més baix i que aquest pateix un increment més destacable quan passem a la concentració de 10ng/mL NGF. Basant-nos en els resultats obtinguts per Nishimura et al., 2008 (Figura 17) els valors que més coincideixen són els que s'han obtingut en el segon experiment. Com podem observar en la Figura 16 (que representa els mateixos valors que la Figura 12, en un format que s'assimila més a la Figura 17) la diferència amb la Figura 17 és mínima i la tendència que segueixen és la mateixa ja que no hi ha una estabilització dels valors del percentatge de cèl·lules diferenciades en concentracions de 30ng/mL NGF com tenim en el primer experiment, sinó que aquests tendeixen a augmentar. Aquest fet, com hem comentat anteriorment, permet que els agonistes del receptor σ_1 tinguin un marge més ample d'actuació en quant a la potenciació de la diferenciació neuronal.

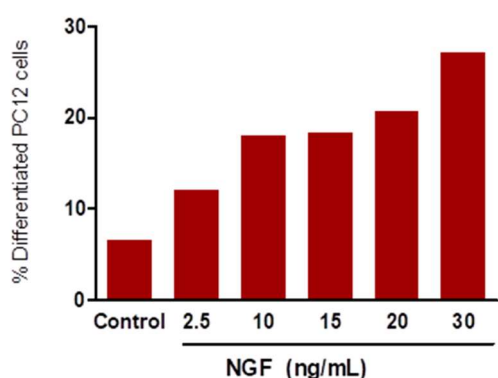


Figura 16. Efecte del NGF en la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12. Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte a les diferents concentracions de NGF (ng/mL). El gràfic mostra les dades per $n=1$.

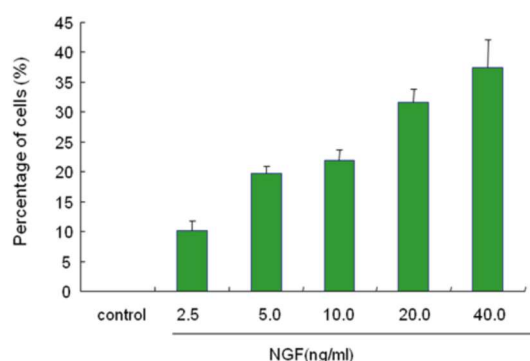


Figura 17. Efecte del NGF en la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12. Les dades estan representades com el percentatge de cèl·lules diferenciades respecte a les diferents concentracions de NGF (ng/mL). El gràfic està fet a partir de la mitjana aritmètica dels valors obtinguts en cada condició \pm SD ($n=8$). [7]

Pel que fa l'avaluació de l'efecte dels compostos (+)-SKF-10,047, PRE-084 i NE-100 en la potenciació de la diferenciació neuronal induïda per NGF en PC12 es van realitzar amb el mateix batch cel·lular que el primer experiment amb NGF. Coincidint amb els resultats de la Figura 11, en aquests estudis seguim tenint un percentatge de cèl·lules diferenciades en el grup control molt elevat, deixant un marge baix d'actuació pel que fa la potenciació d'aquesta diferenciació. En les Figures 13 i 14 no hi ha una coherència de les dades en quant a l'actuació dels compostos. El (+)-SKF-10,047 i el PRE-084 no semblen actuar com a agonistes del receptor σ_1 ja que no es veu una clara potenciació de la diferenciació respecte els respectius controls. El mateix passa amb el NE-100 i la seva activitat com a antagonista del receptor σ_1 degut a que no hi ha cap mena de disminució en l'efecte de la potenciació de la diferenciació neuronal respecte a la condició sense antagonista en cada concentració.

Per tant, arrel d'aquests resultats el problema que es planteja és que els experiments realitzats amb el primer batch de cèl·lules PC12 (Figures 11,13 i 14) poden estar condicionats per una possible activitat constitutiva del receptor σ_1 causada per algun efecte extern al nostre estudi. Això provoca aquesta predisposició de les cèl·lules a la diferenciació sense la necessitat d'induir-la amb NGF, fet que explicaria l'obtenció de valors de percentatge de cèl·lules diferenciades tant elevats en concentracions de NGF molt baixes (2,5-5ng/ml). En l'Annex 1 hi ha diferents imatges realitzades amb la càmera del microscopi òptic invertit Nikon Eclipse TE200 del primer batch cel·lular de PC12 24h després de ser emplaçades i abans d'afegir els fàrmacs corresponents fet que ajuda a reforçar aquesta hipòtesi.

D'altra banda, tot i no ser significatius a causa de la variabilitat del mètode i de la manca de replicats, els resultats obtinguts en l'avaluació de l'efecte dels compostos EPB1 i EPB2, (+)-SKF-10,047 i NE-100 en la potenciació de la diferenciació neuronal induïda per NGF en PC12 realitzada amb el segon batch cel·lular són coherents. El control presenta un percentatge de cèl·lules diferenciades baix que deixa marge a l'acció per part dels altres compostos per la potenciació. La tendència és clara tant en la potenciació de la diferenciació neuronal per part dels compostos (+)-SKF-10,047, EPB1 i EPB2 actuant així com a agonistes del receptor σ_1 , com en el bloqueig d'aquest efecte en totes les condicions per part del NE-100 que actua com a antagonista del receptor σ_1 . Aquests resultats ajuden a reforçar la hipòtesi que hem comentat en el paràgraf anterior, ja que, mentre que els experiments realitzats amb el primer batch de cèl·lules no són coherents ni amb la bibliografia ni entre ells, els que s'han dut a terme posteriorment amb un batch cel·lular diferent recolzen la bibliografia consultada on s'indica que el (+)-SKF-10,047 actua com a agonista del receptor σ_1 potenciant la diferenciació neuronal induïda per NGF en PC12 i que aquests efectes son bloquejats per l'antagonista NE-100.^[19,25,26-29]

9. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquest estudi són:

- No s'ha pogut comprovar l'activitat agonista dels compostos (+)-SKF-10,047 i PRE-084 ni la de l'antagonista NE-100 respecte del receptor σ_1 per falta de resultats estadísticament significatius. Tot i això, els resultats obtinguts amb el segon batch de cèl·lules semblen indicar que el compost (+)-SKF-10,047 actua com a agonista del receptor σ_1 potenciant la diferenciació neuronal induïda per NGF en cèl·lules PC12 i el NE-100 bloqueja aquest efecte, actuant com a antagonista del receptor σ_1 .
- No s'ha pogut determinar l'activitat dels compostos investigacionals EPB1 i EPB2, també per falta de significació estadística, però les dades semblen indicar que ambdós actuen com a agonistes del receptor σ_1 potenciant la diferenciació neuronal induïda per NGF en cèl·lules PC12.
- La dificultat per a assolir significació estadística després de la realització dels replicats pertinents permet concloure que la tècnica que s'ha utilitzat no és eficaç com a eina de cribratge farmacològic. El principal inconvenient que té és la dificultat de reproduir-ne els resultats, causant així una excessiva variabilitat en les dades obtingudes. Bé és cert que possiblement aquest inconvenient es podria resoldre repetint els experiments un número suficientment alt de vegades com per reduir la variabilitat, però alhora, això significaria un augment tant econòmic com del temps de treball que faria poc viable aquesta metodologia.

En conseqüència, queda refusada la hipòtesi plantejada a l'inici del projecte on s'afirmava que la identificació de la naturalesa agonista dels nous compostos investigacionals sobre el receptor σ_1 es pot realitzar en base a la potenciació de la diferenciació neuronal en cèl·lules PC12 de manera robusta i eficient.

10. AGRAÏMENTS

En primer lloc m'agradaria donar les gràcies a la meva família per recolzar-me en totes les decisions que he pres, per confiar en mi i per estar al meu costat quan ho he necessitat, tot això m'ha facilitat el camí que he hagut de recórrer per arribar fins aquí.

També a la Dra. Vanessa Sánchez Martos i al Dr. Jordi Blanco ambdós companys del laboratori, per estar sempre disposats a ajudar-me en qualsevol cosa que necessités, però sobretot perquè aconseguien fer del lloc de treball un lloc més agradable.

Finalment, agrair al meu tutor el Dr. Francesc Xavier Sureda Batlle, per brindar-me aquesta oportunitat que m'ha permès aprendre, formar-me i créixer com a professional, per la confiança depositada en mi des del principi i per dedicar-me el seu temps i atenció quan l'he necessitada. Ha estat tot un privilegi formar equip amb el Dr. Sureda i portar endavant un projecte en comú ja que mitjançant aquest he pogut adquirir molts dels coneixements i consells importants en l'àmbit de la recerca que m'enduc d'aquesta experiència.

Plenament agraïda.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1- Ye, N., Qin, W., Tian, S., Xu, Q., Wold, E. A., Zhou, J., & Zhen, X. C. (2020). Small Molecules Selectively Targeting Sigma-1 Receptor for the Treatment of Neurological Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(24), 15187–15217. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01192>
- 2- Morales-Lázaro, S. L., González-Ramírez, R., & Rosenbaum, T. (2019). Molecular interplay between the sigma-1 receptor, steroids, and ion channels. *Frontiers in Pharmacology*, 10(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00419>
- 3- Schmidt, H. R., & Kruse, A. C. (2019). The Molecular Function of σ Receptors: Past, Present, and Future. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(9), 636–654. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.07.006>
- 4- Ryskamp, D. A., Korban, S., Zhemkov, V., & Kraskovskaya, N. (2019). Neuronal Sigma-1 Receptors: Signaling Functions and Protective Roles in Neurodegenerative Diseases. 13(August), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00862>
- 5- Hong, W. C., Yano, H., Hiranita, T., Chin, F. T., McCurdy, C. R., Su, T. P., Amara, S. G., & Katz, J. L. (2017). The sigma-1 receptor modulates dopamine transporter conformation and cocaine binding and may thereby potentiate cocaine self-administration in rats. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11250–11261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.774075>
- 6- Albayrak, Y., & Hashimoto, K. (2017). Sigma-1 receptor agonists and their clinical implications in neuropsychiatric disorders. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 964, 153–161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1_11
- 7- Nishimura, T., Ishima, T., Iyo, M., & Hashimoto, K. (2008). Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: Role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS ONE*, 3(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002558>
- 8- Weng, T. Y., Tsai, S. Y. A., & Su, T. P. (2017). Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0380-6>
- 9- Penke, B., Fulop, L., Szucs, M., & Frecska, E. (2017). The Role of Sigma-1 Receptor, an Intracellular Chaperone in Neurodegenerative Diseases. *Current Neuropharmacology*, 16(1), 97–116. <https://doi.org/10.2174/1570159x15666170529104323>

- 10- Arena, E., Dichiara, M., Floresta, G., Parenti, C., Marrazzo, A., Pittalà, V., Amata, E., & Prezzavento, O. (2018). Novel Sigma-1 receptor antagonists: From opioids to small molecules: What is new? *Future Medicinal Chemistry*, 10(2), 231–256. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0164>
- 11- Tsai, S. A., Pokrass, M. J., Klauer, N. R., Nohara, H., & Su, T. (2015). Sigma-1 receptor regulates Tau phosphorylation and axon extension by shaping p35 turnover via myristic acid. 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422001112>
- 12- Ishima, T., Nishimura, T., Iyo, M., & Hashimoto, K. (2008). Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by donepezil : Role of sigma-1 receptors and IP 3 receptors. 32, 1656–1659. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.06.011>
- 13- Takebayashi, Minoru, Hayashi, T., & Su, T. P. (2002). Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves σ -1 receptors: Implications for antidepressants. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303(3), 1227–1237. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041970>
- 14- Hayashi, T., & Su, T. (2000). Regulating ankyrin dynamics : Roles of sigma-1 receptors. 29, 3–8.
- 15- Ruscher, K., & Wieloch, T. (2015). The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. 127, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2014.11.011>
- 16- Jouanne, M., Rault, S., & Voisin-chiret, A. (2017). European Journal of Medicinal Chemistry Tau protein aggregation in Alzheimer ' s disease : An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.070>
- 17- Crouzier, L., Couly, S., Roques, C., Peter, C., Belkhiter, R., Jacquemin, M. A., Bonetto, A., Delprat, B., Maurice, T., Crouzier, L., Couly, S., Roques, C., Peter, C., & Belkhiter, R. (2020). Sigma-1 (σ 1) receptor activity is necessary for physiological brain plasticity in mice To cite this version : HAL Id : hal-03020937. 1.
- 18- Montigny, D. (1996). Short communication Natsuko Mad . mji Hashimoto a * b , . 307, 117–119.
- 19- Merlos, M., Burgueño, J., Salido, E. P.-, & Plata-salamán, C. R. (n.d.). Pharmacological Modulation of the Sigma 1 Receptor and the Treatment of Pain. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-50174-1>

- 20- Okuyama, S., Imagawa, Y., Ogawa, S., Araki, H., Ajima, A., Tanaka, M., Muramatsu, M., Nakazato, A., Yamaguchi, K., Yoshida, M., & Otomo, S. (1993). CH3O--- ~ ~ CH2CH2N ~ cH2CH2CH3. 53, 285–290.
- 21- NE-100 , a novel potent σ 1 ligand , preferentially binds to in guinea pig brain binding sites. (1994). 251, 1–2.
- 22- Bol, A. V, Kraskovskaya, N. A., Gainullina, A. N., Kukanova, E. O., Vlasova, O. L., & Bezprozvanny, I. B. (2017). Neuroprotective Effect of σ 1-Receptors on the Cell Model of Huntington ' s Disease. 3, 252–258. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3968-7>
- 23- Ryskamp, D., Wu, L., Wu, J., Kim, D., Rammes, G., Geva, M., Bezprozvanny, I., Care, I., Industries, P., & Tikva, P. (2020). HHS Public Access. 15, 489–504. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.12.022.Pridopidine>
- 24- Rossi, D., Pedrali, A., Urbano, M., Gaggeri, R., Serra, M., Fernández, L., Fernández, M., Caballero, J., Ronsisvalle, S., Prezzavento, O., Schepmann, D., Wuensch, B., Peviani, M., Curti, D., Azzolina, O., & Collina, S. (2011). Bioorganic & Medicinal Chemistry Identification of a potent and selective σ 1 receptor agonist potentiating NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 19(21), 6210–6224. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.09.016>
- 25- Schmidt, H. R., Betz, R. M., Dror, R. O., Kruse, A. C., Biology, S., Physiology, C., & Engineering, M. (2019). Structural basis for σ 1 receptor ligand recognition. 25(10), 981–987. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0137-2.Structural>
- 26- Dalwadi, D. A., Kim, S., Schetz, J. A., & Worth, F. (2018). HHS Public Access. 2, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.02.003.Activation>
- 27- Voronin, M. V., Vakhitova, Y. V., & Seredenin, S. B. (2020). Chaperone Sigma1R and antidepressant effect. International Journal of Molecular Sciences, 21(19), 1–33. <https://doi.org/10.3390/ijms21197088>
- 28- Vavers, E., Zvejniece, L., Maurice, T., & Dambrova, M. (2019). Allosteric modulators of sigma-1 receptor: A review. Frontiers in Pharmacology, 10(MAR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00223>
- 29- Chu, U. B., & Ruoho, A. E. (2016). Biochemical Pharmacology of the Sigma-1 Receptor. January, 142–153.
- 30- Itzhak, Y. (1988). Pharmacological specificity of some psychotomimetic and antipsychotic agents for the sigma and PCP binding sites. Life Sciences, 42(7), 745–752. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(88\)90646-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(88)90646-7)

- 31- Kato, K., Hayako, H., Ishihara, Y., Marui, S., Iwane, M., & Miyamoto, M. (1999). TAK-147, an acetylcholinesterase inhibitor, increases choline acetyltransferase activity in cultured rat septal cholinergic neurons.
- 32- Mad, N., Hashimoto, mji, & Tomitaka, S. (1996). of se. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 307).
- 33- Su, T. P., Wu, X. Z., Cone, E. J., Shukla, K., Gund, T. M., Dodge, A. L., & Parish, D. W. (1991). Sigma compounds derived from phencyclidine: identification of PRE-084, a new, selective sigma ligand. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 259(2).

12. AUTOAVALUACIÓ

En primer lloc, la redacció del treball m'ha ajudat a millorar el sistema de cerca d'informació, gràcies a l'aprenentatge de noves eines i de posar en pràctica les que ja coneixia. També he sabut postular una hipòtesi, marcar uns objectius, interpretar dades i treure conclusions, incrementant així la meva experiència en la redacció científica.

Un altre punt a destacar és que el fet de realitzar aquest estudi m'ha permès aprendre els passos necessaris per a crear, liderar i defensar un projecte de grans dimensions per fer-lo possible. A més, com a estudiant de biotecnologia he sortit de la meua zona de confort per endinsar-me en el món de la farmacologia i la neurociència ampliant els meus camps de coneixement.

Ara bé, on més he après ha estat en el laboratori mentre realitzava l'experiment. En aquest període he treballat amb autonomia fet que m'ha requerit la presa de decisions i ha suposat un increment de les responsabilitats. També he adquirit experiència en tècniques bàsiques de cultiu cel·lular, sobretot en el treball amb la línia cel·lular PC12, en la morfometria de la maduració neuronal, la utilització del microscopi invertit i programes específics de tractament d'imatges i anàlisi de dades com són el Toupview i el GraphPad Prism. Durant aquesta etapa he comprovat que les qualitats que més ressaltaria d'un bon investigador són la paciència i la perseverança.

En definitiva, he aplicat molts dels coneixements adquirits durant aquests quatre anys de grau obtenint com a resultat un bon treball, coherent i que s'ajusta al que s'ha demanat.

ANNEX 1

En el següent apartat s'exposen algunes imatges obtingudes amb la càmera del microscopi òptic invertit Nikon Eclipse TE200 d'un experiment on s'ha utilitzat el primer batch cel·lular de PC12 24h després de ser emplaçades i abans d'afegir els fàrmacs corresponents.

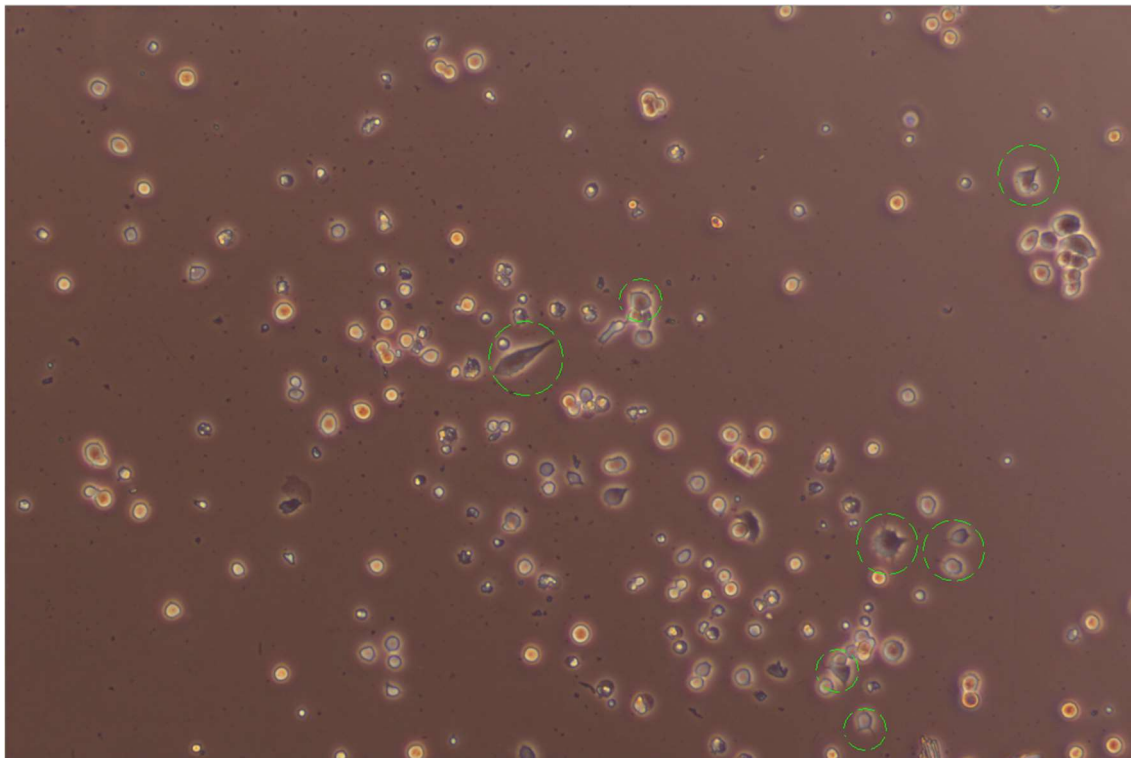


Figura 18. Imatge de cèl·lules PC12 a 10000 augments, 24 hores després de ser emplaçades a 10.000 cèl·lules/mL . Els cercles verds marquen les cèl·lules que han començat la diferenciació neuronal.

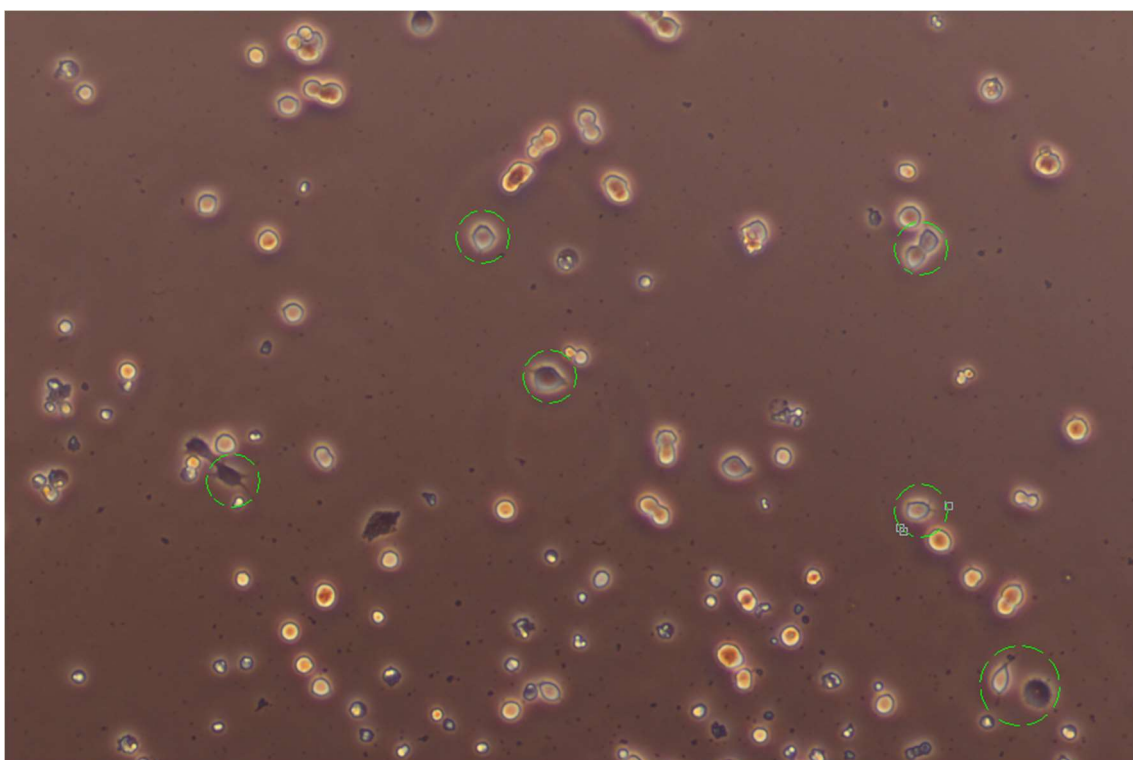


Figura 19. Imatge de cèl·lules PC12 a 10000 augments, 24 hores després de ser emplaçades a 10.000 cèl·lules/mL . Els cercles verds marquen les cèl·lules que han començat la diferenciació neuronal.

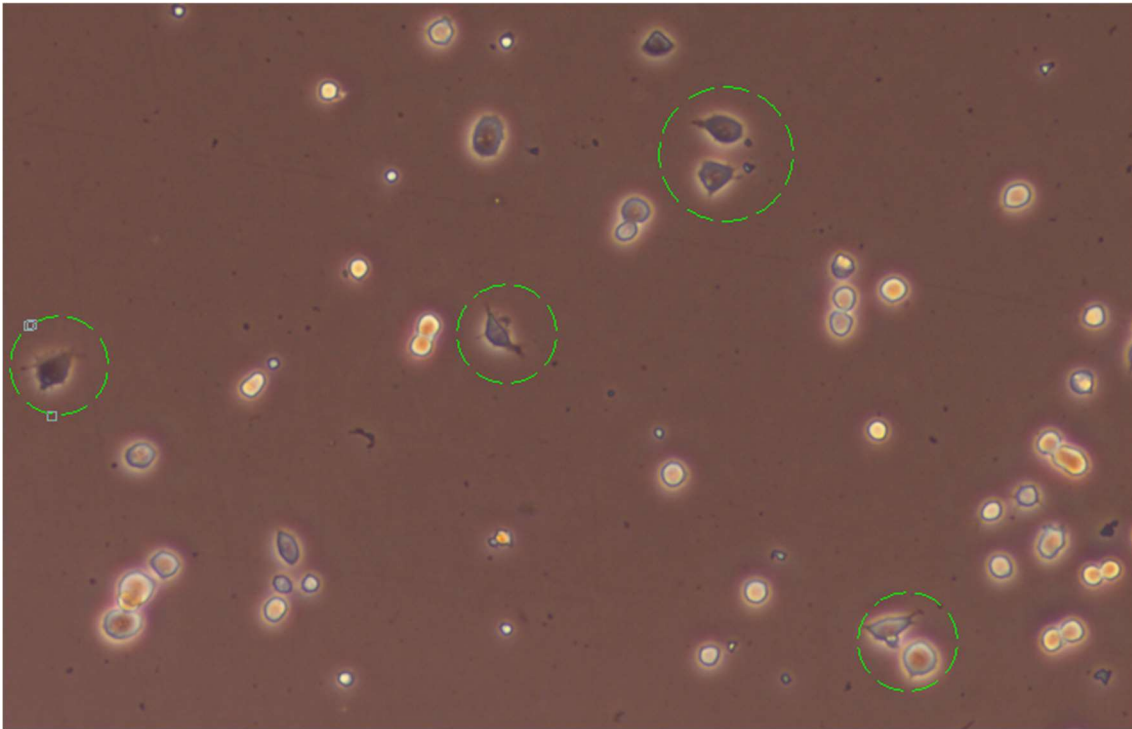


Figura 19. Imatge de cèl·lules PC12 a 10000 augments, 24 hores després de ser sembrades a 10.000 cèl·lules/mL . Els cercles verds marquen les cèl·lules que han començat la diferenciació neuronal.

Com podem observar, hi ha entre un 5-10% de cèl·lules que ja han començat la diferenciació neuronal sense haver d'induir-la amb NGF.

ANNEX 1

FORMULARI SOL·LICITUD DEL TREBALL DE FI DE GRAU

(A lliurar per correu electrònic al responsable de l'assignatura)

Alumne (Nom/Cognoms): *(omplir camp)*

Correu-e *(omplir camp)*

Anna Peñalver Fa

anna.penalver@estudiants.urv.cat

Títol provisional *(omplir camp)*

Treball de fi de Grau en Biotecnologia: Avaluació de l'activitat de nous compostos sobre la diferenciació neuronal

Resum del treball *(omplir camp)*

Aquest estudi s'emmarca dins el projecte del Programa Estatal de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad "Síntesis de compuestos con mecanismos innovadores contra enfermedades neurodegenerativas". En base a la col·laboració establerta amb el Dr. Vazquez, de la Unitat de Química Farmacèutica de la Universitat de Barcelona, cal avaluar l'activitat agonista o antagonista de nous compostos investigacionals sobre els receptors sigma-1. Aquests compostos ja han mostrat afinitat en estudis de binding sobre el receptor i ara cal establir si actuen com a agonistes o antagonistes.

Per tal d'establir aquesta activitat, cal mantenir en cultiu en suspensió de les cèl·lules cromafins PC12, emplacar-les i fer-les créixer adherents en col·lagen i diferenciar-les amb NGF. Posteriorment, cal incubar-les amb diferents compostos i avaluar l'efecte d'aquestes substàncies sobre la proliferació de neurites, fet que indicaria la seva possible utilitat en malalties neurodegeneratives.

Signatura del Alumne/a *(escanejades o digitals)*



Tarragona a _8_ de _Març_2021__

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: _Anna Peñalver Fa_____

Nom i Cognoms del Tutor/a: ___Francesc X. Sureda Batlle_____

Data de la entrevista amb l'alumne: ___Contínues, diversos cops a la setmana_____

Recomanacions durant el seguiment: _

El seguiment s'ha realitzat de manera presencial treballant conjuntament durant el primer mes d'estada i, un cop s'ha assegurat que l'alumna és autònoma i treballa amb eficiència i seguretat, el seguiment es realitza en base a la discussió dels resultats i de les incidències no previstes.

Observacions: __L'Anna ha realitzat el seu treball amb diligència i dedicació i el seguiment s'ha pogut realitzar perfectament. Únicament cal destacar que durant un mes, i per malaltia del tutor, el seguiment s'ha fet de manera no presencial._____

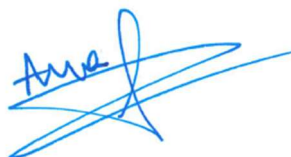
Observacions Darrera revisió:

Cap variació remarcable respecte al ja comentat.

Signatura del Tutor/a



Signatura del Alumne/a



Reus a _21_de _maig_____2021__