

Implicaciones de la hipoxia y las especies reactivas de oxígeno en las enfermedades neurodegenerativas

Informe final – enero de 2016

La concesión de la ayuda ha sido un aliciente importante para poner en marcha este proyecto mediante la colaboración de los dos grupos implicados. Se trata de dos grupos que tenemos trayectorias y experiencias científicas diferentes pero complementarias. Así, esta ayuda nos ha supuesto un importante estímulo para establecer una colaboración que creemos que puede ser muy fructífera en un futuro próximo, aun cuando termine esta ayuda. Por tanto, destacamos en primer lugar el agradecimiento a la Fundación Domingo Martínez por el apoyo que nos ha supuesto esta ayuda para impulsar nuestra investigación colaborativa en el tema.

Hemos cambiado el plan de trabajo respecto al proyecto planteado inicialmente, centrándonos fundamentalmente en aspectos relacionados con la isquemia cerebral y la enfermedad de Alzheimer. En algunos de los estudios que hemos abordado hemos aumentado la complejidad, analizando en mayor detalle los mecanismos moleculares. Recogemos aquí los resultados obtenidos en varios apartados, según los modelos utilizados:

Mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hipoxia en hipocampo de animales sanos

El primer bloque de resultados recoge la experimentación que se ha llevado a cabo en animales control. En principio se planteaba como un paso inicial, previo al estudio comparativo con modelos animales de envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, hemos podido profundizar en el estudio detallado de los mecanismos moleculares por los que la hipoxia aguda promueve la formación de ROS, y la implicación del mecanismo que describimos como elemento clave del sensor de hipoxia aguda. Asimismo, hemos comprobado su papel en el daño que se produce en un modelo animal de ictus. Estos resultados se han incorporado en un manuscrito que está actualmente en revisión en la revista científica *Nature Communications*, en la que se agradece la ayuda concedida por la Fundación.

El grupo del Dr. Martínez Ruiz había realizado experimentos midiendo la producción de superóxido en hipoxia mediante la sonda dihidroetidina, utilizando condiciones específicas en microscopía de fluorescencia, que se habían hecho en distintos tipos celulares (Hernansanz-Agustín et al., 2014). Gracias a la experiencia del grupo de la Dra. García López se han aplicado dichas técnicas a cultivos neuronales, rodajas de hipocampo y en un modelo in vivo de ictus.

Hemos utilizado la línea celular HT22, de neuronas de hipocampo de ratón inmortalizadas. Al someterlas a hipoxia aguda (cambiando el medio en un cámara de hipoxia al 1% O₂), se ha visto que producen un estallido de superóxido en los primeros 10 minutos de hipoxia, de forma similar a lo observado en células endoteliales y otros tipos celulares. Asimismo, la inhibición del intercambiador mitocondrial de sodio-calcio NCLX, mediante CGP-37157, inhibe la producción de este estallido de superóxido (Fig. 1^a). También la estabilización de HIF-1alfa en 4 horas de hipoxia al 1% O₂ se ve

inhibida por este tratamiento (Fig. 1b), lo que no sucede cuando las células se tratan con DMOG (inhibidor de las prolin hidroxilasas que marcan HIF-1 alfa para degradación).

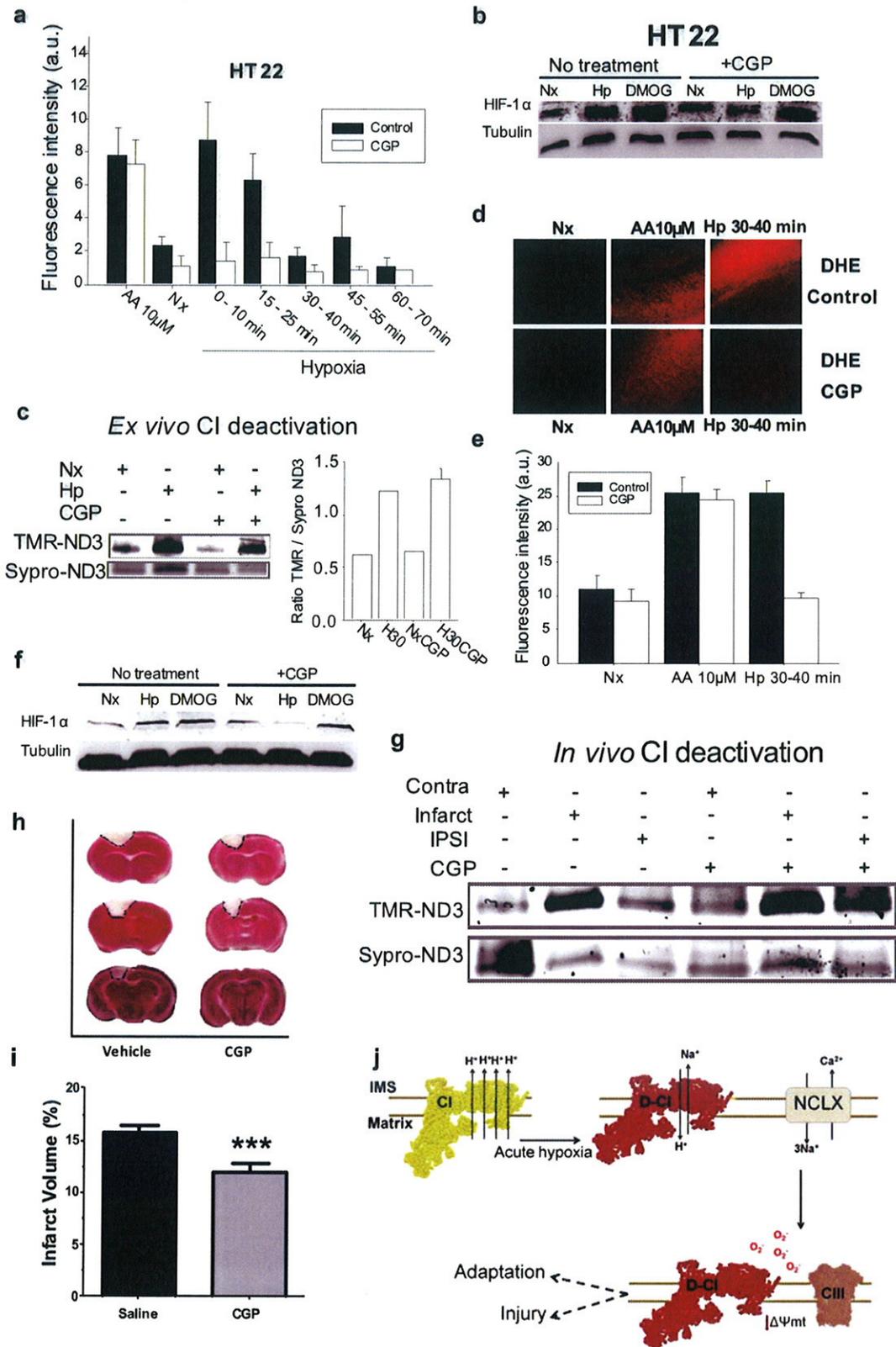


Figura 1. La inhibición de NCLX en neuronas y tejido cerebral inhibe la producción de ROS en hipoxia inducida por la desactivación de CI, y protege del daño isquémico en cerebro. (a) Células HT22 sin tratar (Control; negro) y tratadas con 10 μ M CGP-37157 (CGP; blanco) se sometieron a diferentes tiempos cortos de hipoxia (1% O₂; 0, 15, 30, 45 y 60 min), normoxia (Nx) o normoxia con antimicina A (AA 10 μ M), se incubaron con DHE durante 10 min y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4%. Se representa la media \pm e.e.m. de tres experimentos independientes. (b) Células HT22 se sometieron a 4 horas de hipoxia (1% O₂), se lisaron en tampón Laemmli y se realizó el protocolo de western blot hibridando con anticuerpos específicos para HIF-1 α y tubulina (control de carga). (c) Rodajas de hipocampo se sometieron a 30 min de normoxia (Nx), hipoxia (1% O₂; H30), normoxia con 30 μ M CGP-37157 (NxCGP) o hipoxia con 30 μ M CGP-37157 (H30CGP), se extrajeron las membranas mitocondriales internas y se marcaron las cisteínas reducidas expuestas con el reactivo maleimida-Bodipy-TMR y la proteína total se detectó tiñendo con Sypro-Ruby. Se muestra la señal de la banda electroforética correspondiente a la proteína ND3 del complejo I. La gráfica presenta la media \pm e.e.m. de tres experimentos independientes. (d-e) Rodajas de hipocampo sin tratar (Control) o tratadas con 30 μ M CGP-37157 (CGP) se incubaron en normoxia (Nx), normoxia con antimicina A (AA 10 μ M) o hipoxia (1% O₂; Hp 30-40 min), se añadió DHE (5 μ M) durante 10 min más y se fijaron con PFA 4%. (d) Imágenes representativas mostrando la fluorescencia de DHE. (e) Los datos se representaron como media \pm e.e.m. de cuatro experimentos independientes. (f) Rodajas de hipocampo sin tratar o tratadas con 30 μ M CGP-37157 se expusieron a normoxia (Nx), normoxia con 1 mM DMOG (DMOG) o hipoxia (1% O₂, Hp), y se procedió con el mismo protocolo que en (b). Imágenes representativas de cuatro experimentos independientes. (g-i) Se aplicó el protocolo de isquemia cerebral por fototrombosis en ratones tratados con vehículo o con 30 mg/kg de CGP-37157 5 min antes de la iluminación e inducción de la trombosis. (g) Detección de la exposición de la Cys39 de ND3 (como en c) aplicado a muestras de diferentes regiones del cerebro; infarto, ipsilateral (IPSI) y contralateral (Contra). (h, i) Tinción del tejido cerebral con cloruro de trifeníltetrazolio y para la cuantificación del volumen del infarto. Los datos se representaron como media \pm e.e.m. *** p < 0.001 vs control (n = 7). (i) Modelo propuesto para el mecanismo molecular del estallido de superóxido en hipoxia. El CI activo (amarillo) pasa a su conformación desactiva (rojo) en hipoxia aguda, lo cual incrementa su actividad antiportadora Na⁺/H⁺ y estimula el intercambio Na⁺/Ca²⁺ a través de NCLX, promoviendo despolarización mitocondrial y la producción de ROS por los complejos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), lo cual puede ser una señal para la adaptación hipóxica o puede provocar daño isquémico.

También hemos utilizado ratones C57BL6 de 2-3 meses a los que se les ha extraído el hipocampo, del cual se han preparado rodajas, que se han cultivado en normoxia o durante diversos tiempos de hipoxia al 1% O₂, evaluando los tiempos idóneos de respuesta para cada uno de los análisis que se querían llevar a cabo. En la medición de la producción de anión superóxido con la sonda dihidroetidina (DHE) se ha obtenido un ligero retraso en el incremento de fluorescencia en comparación a los sistemas de cultivo celular *in vitro*, ya que el máximo de señal se producía tras 30 minutos de hipoxia (Fig. 1d,e). Hemos observado también que el complejo I se desactiva a los 30 minutos de hipoxia, independientemente del tratamiento con CGP-37157 (Fig. 1c). Además, se comprobó mediante *Western blot* que la ruta de estabilización de HIF1- α era funcional y se activaba cuando las rodajas eran sometidas a 4 horas de hipoxia, pero que se inhibía por el tratamiento con CGP-37157 (fig. 1f). Para medir la viabilidad celular se ha usado el ensayo MTT en lugar de yoduro de propidio dado que este último es altamente tóxico, comprobándose que la viabilidad celular no variaba con los distintos tratamientos (resultados no mostrados).

Estos resultados nos permitieron corroborar en neuronas y cerebro el modelo que proponemos para explicar el mecanismo molecular que activa la producción de ROS en hipoxia, que se ha estudiado en más detalle en células endoteliales de aorta bovina (BAEC), y que se explica en el mismo manuscrito en que se incluyen estos resultados. De acuerdo con este modelo (Fig. 1j), el complejo I mitocondrial se desactiva al bajar la concentración de oxígeno, quizá actuando como sensor primario de oxígeno. Nosotros detectamos la inactivación de complejo I debido a que el cambio conformacional que se produce expone la cisteína 93 de la proteína ND3, que nosotros marcamos con un reactivo de maleimida fluorescente (señal de TMR-ND3 en Fig. 1c,g). El complejo I desactivo interrumpe el bombeo normal de protones, a la vez que aumenta su actividad intercambiadora de Na⁺/H⁺ (Roberts and Hirst, 2012), que exporta Na⁺ al espacio

intermembrana mitocondrial. Este movimiento de Na^+ puede ser el que produzca la activación de NCLX, que introduce 3 Na^+ en la matriz mitocondrial a cambio de la exportación de 1 Ca^{2+} . Se genera así un transporte electrogénico que reduce el potencial de la membrana mitocondrial en hipoxia, lo que induce la producción de superóxido por los complejos mitocondriales, entre ellos el complejo III. Esta señal oxidativa puede promover adaptaciones celulares, incluida la estabilización de HIF-alfa, o también daño oxidativo en situaciones de hipoxia patológica.

Entre estas situaciones de hipoxia patológica se encuentra el ictus isquémico, donde se produce la interrupción del flujo sanguíneo a una zona del cerebro, inhibiendo así el aporte de oxígeno y nutrientes, y produciendo muerte celular. Hemos usado un modelo de ictus irreversible inducido en ratones por fototrombosis, para evaluar si la inhibición de NCLX podría reducir el daño, principalmente oxidativo, producido en el ictus. En este modelo, observamos que en la zona infartada (y en menor medida en la zona contigua, ipsilateral) se produce el primero de los eventos de nuestro modelo, la desactivación del complejo I mitocondrial, independientemente de la aplicación de CGP-37157 (Fig. 1g). Sin embargo, el tamaño del infarto sí se reduce cuando se aplica este compuesto (Fig. 1h), que presumiblemente inhibe NCLX, la producción de ROS y el daño oxidativo.

Estos resultados, junto a otros resultados del grupo del Dr. Martínez Ruiz, apoyan la posible utilización terapéutica de la inhibición de NCLX como una posible intervención para reducir la producción de especies reactivas de oxígeno y la adaptación a hipoxia en patologías en la que estas se encuentran implicadas. Esta idea ha sido objeto de la patente de invención P201400968, registrada el 28 de noviembre de 2014. Sin embargo, no hemos podido alcanzar el grado de desarrollo de dicha patente que nos aconsejara su internacionalización.

Estudio en animales modelo de enfermedad de Alzheimer

Se ha comenzado el análisis de la respuesta a hipoxia en modelos murinos de Alzheimer, en concreto con ratones triplemente transgénicos (3xTg-AD, 3Tg) que poseen las mutaciones genéticas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (PS1M146V, APPSwe, y tauP301L), de 6 y 12 meses de edad, dada su disponibilidad en nuestro centro de investigación (fueron cedidos por el Dr. Luis Gandía, departamento de Farmacología-UAM). Aunque algunos son todavía preliminares, los resultados muestran un incremento en la formación de ROS en normoxia en los animales 3xTg de seis meses, que sin embargo en 30 minutos de hipoxia disminuye (Fig. 2a, comparar con Fig. 1d-e). En el caso de los animales 3xTg de 12 meses, este efecto es aún más acusado, ya que hay una señal mayor de superóxido en normoxia, que disminuye claramente en hipoxia (Fig. 2b). En este caso, dado que no se produce el estallido de superóxido en hipoxia, el tratamiento con CGP-37157 no afecta a los niveles de superóxido (Fig. 2a-b).

Asimismo, los resultados de oxidación reversible de cisteínas, medida por redox fluorescence switch (Izquierdo-Álvarez et al., 2012), muestran muy poca diferencia entre los tratamientos a las rodajas del mismo animal, pero un aumento en los niveles de oxidación en los ratones 3xTg de 12 meses respecto a 6 meses (Fig. 2c-d).

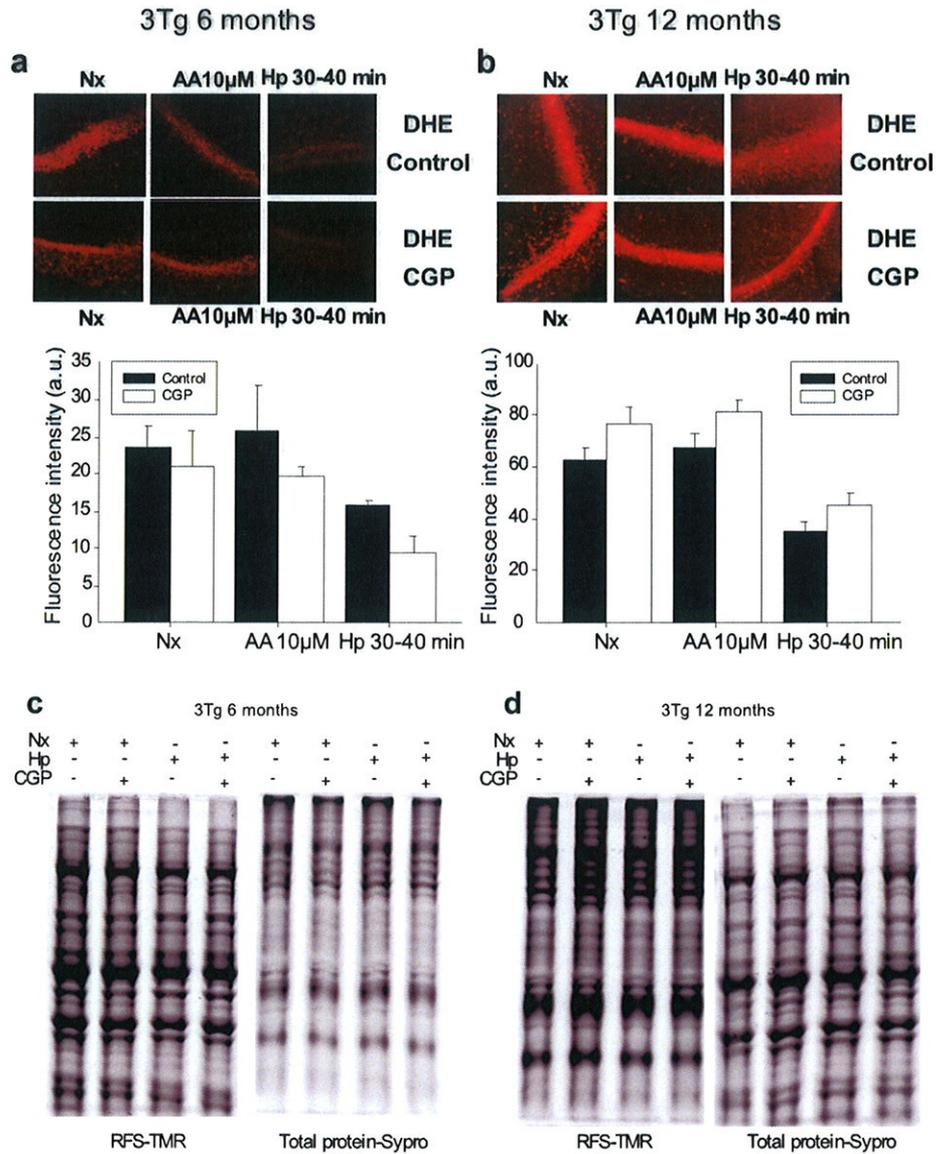


Figura 2. La respuesta redox a hipoxia dependiente de NCLX se pierde con la edad en modelos de ratón triple transgénico debido a un incremento de la producción basal de ROS. (a,b) Rodajas de hipocampo sin tratar o tratadas con 30 μ M CGP-37157 (CGP), procedentes de ratones triple transgénico de 6 meses (**b**; 3Tg 6 months) o triple transgénico de 12 meses (**c**; 3Tg 12 months) se incubaron en normoxia (Nx), normoxia con antimicina A (AA 10 μ M) o hipoxia (1% O₂; Hp 30-40 min). Tras lo cual se añadió DHE (5 μ M) durante 10 min más y las rodajas se fijaron con PFA 4%. Imágenes representativas mostrando la fluorescencia de DHE, y cuantificación presentada como media \pm e.e.m. de dos (b) o cuatro (c) experimentos independientes. **(c,d)** La oxidación reversible de tioles aumenta con la edad en ratones triple transgénico y es independiente de la hipoxia aguda y la inhibición de NCLX. **(c)** Extractos de proteínas de hipocampus de ratones triples transgénicos de 6 meses de edad sin tratar o tratados con CGP-37157 (CGP) y sometidos a 30 min de normoxia (Nx) o hipoxia (Hp) se sometieron al protocolo de "redox fluorescence switch (RFS)", detectando cisteínas reversiblemente oxidadas (RFS-TMR) y proteína total (Sypro). **(d)** Igual que (c) para ratones triples transgénicos de 12 meses de edad.

El fenotipo que vemos en la producción de superóxido en hipocampo, aumentado en normoxia y disminuido en hipoxia (Fig. 2a-b), se corresponde con lo que hemos observado en células endoteliales en las que provocábamos la interferencia, inhibición o inactivación del complejo I mitocondrial (resultados incluidos en el manuscrito en revisión en *Nature Communications*). Esto apoya la hipótesis de que en la evolución de la enfermedad de Alzheimer se produzca la desactivación del complejo I, con consecuencias como el aumento de producción de ROS o una disfunción mitocondrial.

Para continuar esta línea de investigación, nos planteamos:

- Completar el estudio en animales, comparando con animales control de la misma edad (y alguna réplica más en el caso de 3xTg de 6 meses), y determinando si el complejo I se encuentra desactivado en las mitocondrias de hipocampo de ratones 3xTg.
- Estudiar en mayor detalle el mecanismo molecular y sus posibles intervenciones terapéuticas en un modelo celular más sencillo, cultivo de neuronas primarias tratadas con beta-amiloide y ácido okadaico. Este modelo ya lo ha utilizado con éxito el grupo de la Dra. García López.

Con estos resultados se completará otro manuscrito sobre la implicación de complejo I en la producción de ROS en enfermedad de Alzheimer, en el que también se agradecerá el apoyo de la Fundación.

En el análisis de las rodajas de hipocampo, y por serendipia, hemos hallado que en los ratones 3xTg de 12 meses se acumula una autofluorescencia en las neuronas, que es compatible con la fluorescencia de flavina –que se ha descrito como marcador de células madre de cáncer (Miranda-Lorenzo et al., 2014)–, y puede estar localizada en mitocondrias (Fig. 3). Preveamos estudiar en la medida de lo posible la relevancia de este hallazgo y sus posibles implicaciones, como pudiera ser la acumulación de alguna flavoproteína, por ejemplo el complejo II mitocondrial (en relación con la desactivación que postulamos para el complejo I).

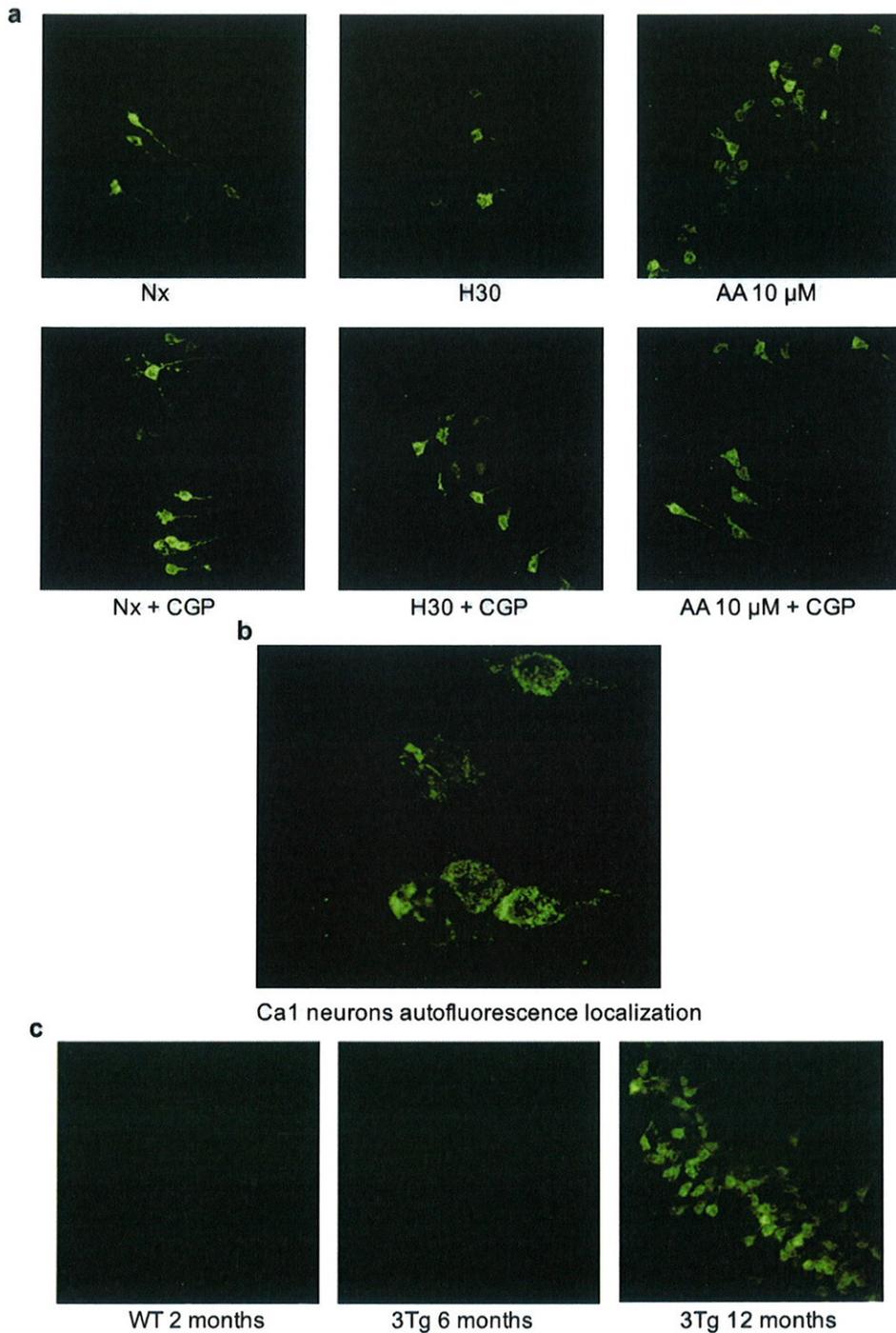


Figura 3. Las neuronas de las rodajas de hipocampos procedentes de ratones triples transgénicos de 12 meses poseen autofluorescencia con un patrón posiblemente mitocondrial. (a) Las neuronas de rodajas de hipocampos procedentes de ratones 3xTg de 12 meses poseen autofluorescencia en condiciones de excitación a 488 nm y emisión en 515-525 nm, independientemente del tratamiento con 30 μM CGP-37157 (CGP) y/o antimicina A (AA 10 μM). **(b)** La autofluorescencia sigue un patrón que posiblemente indique fragmentación mitocondrial. **(c)** La autofluorescencia no aparece hasta los 12 meses de edad en ratones 3xTg.

Implicaciones funcionales de las mutaciones APPSWE/PS1-A246E en la función mitocondrial, el estado oxidativo y la vulnerabilidad a la isquemia en astrocitos.

La enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad cerebrovascular isquémica son enfermedades con una elevada prevalencia en los países desarrollados. Cada día existe un mayor número de evidencias que ponen de manifiesto la relación entre enfermedad cerebrovascular y demencias: (i) una causa común de déficit cognitivo en personas mayores es secundario a un episodio de isquemia cerebral (Sheng et al., 2007), (ii) se ha demostrado que la enfermedad cerebrovascular puede contribuir a la pérdida cognitiva en los pacientes con EA (Altieri et al., 2004), (iii) la mitad de los enfermos con enfermedad de Alzheimer poseen patología cerebrovascular concomitante, (iv) la hipoxia facilita los depósitos de beta amiloide (Sun et al., 2006) y (v) algunos de los medicamentos empleados para la EA han mostrado eficacia en la demencia vascular (Erkinjuntti et al., 2003).

En el sistema nervioso central (SNC) cohabitan neuronas, oligodendrocitos, microglia y astrocitos. Concretamente, los astrocitos son las células mayoritarias del SNC y desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. En los últimos años hay evidencias que ponen de manifiesto que en la enfermedad de Alzheimer una de las alteraciones más tempranas sucede precisamente en los astrocitos (Verkhatsky et al., 2010).

En base a los antecedentes mencionados anteriormente, hemos realizado un estudio comparativo con dos líneas astrocitarias: una línea de astrocitos derivados de ratones control (línea CT2) y otra de ratones modelo para la enfermedad de Alzheimer (línea L3), que poseen la doble mutación de APP_{SWE}/PS1-A246E (mutaciones encontradas en algunas formas familiares de enfermedad de Alzheimer): En estas líneas hemos estudiado aspectos relacionados con la homeostasia del calcio intracelular, funcionalidad mitocondrial, estrés oxidativo y vulnerabilidad ante una situación de isquemia.

Los astrocitos son células no excitables pero son capaces de comunicarse mediante cambios en sus niveles de calcio intracelular. Tanto en la enfermedad de Alzheimer como en la isquemia cerebral existe una regulación anómala de los niveles de calcio intracelular, lo cual puede contribuir a un fallo celular y a su muerte. Empleando una sonda fluorescente que es sensible a los niveles de calcio intracelular - Fluo-3 AM- hemos observado que los astrocitos con las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E muestran incrementos en la concentración de calcio en el citosol ($[Ca^{2+}]_c$) superiores a los obtenidos en las células control cuando se estimulan con ATP (Fig. 4). Este incremento en la $[Ca^{2+}]_c$ puede atribuirse a: (i) un mayor acúmulo de calcio a nivel de retículo endoplásmico por los astrocitos portadores de la mutación o (ii) que la mutación haga a los astrocitos menos eficientes a la hora de tamponar los incrementos de calcio citoplásmico.

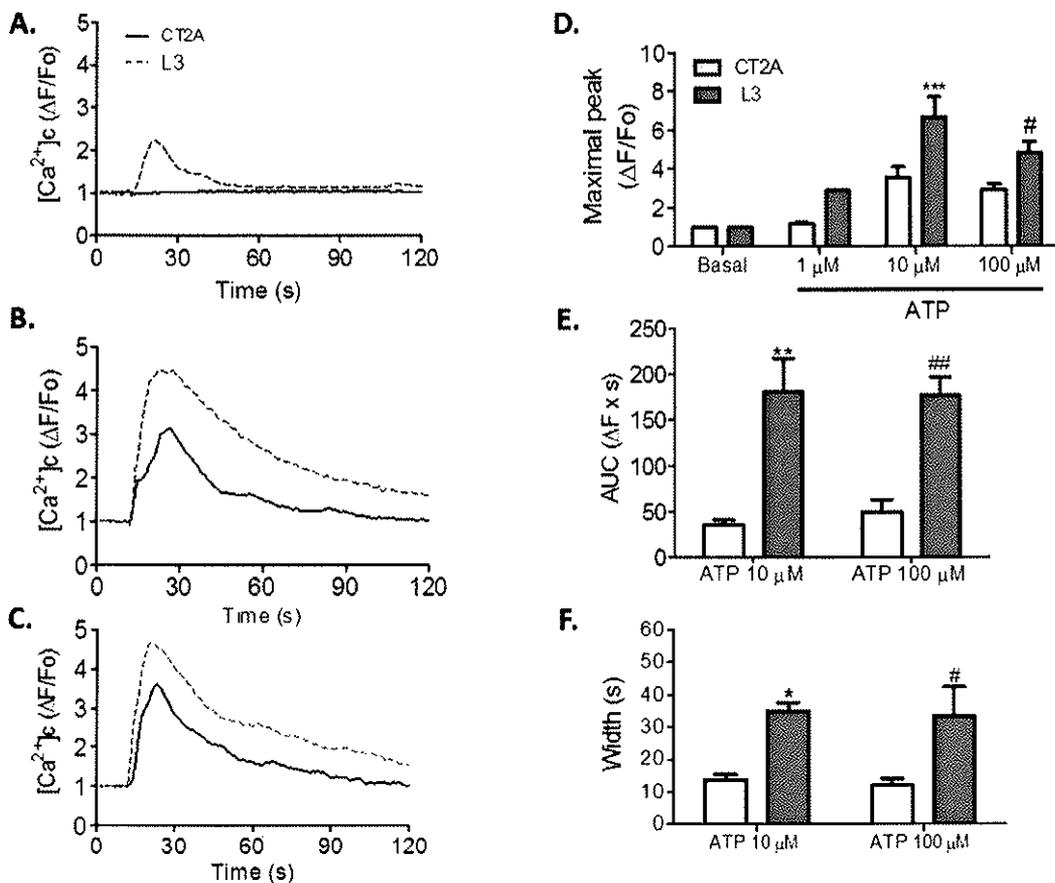


Figura 4: Los astrocitos que presentan las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E (L3) muestran mayores incrementos en la concentración de calcio intracelular cuando se estimulan con ATP a las concentraciones de 1 μM (A), 10 μM (B) y 100 μM (C) de ATP en comparación con los controles (CT2A). (D) Expresa los picos máximos, (E) el área bajo la curva y (F) la anchura media de las curvas de calcio obtenidas en los gráficos A, B y C. Los datos corresponden a la media y error estándar de 4 cultivos celulares.

Una vez determinado que los astrocitos que contenían las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E mostraban una alteración para controlar sus niveles de calcio citosólico, pasamos a estudiar su función mitocondrial, analizando distintos parámetros. Los astrocitos L3, que contienen las mutaciones, muestran unas mitocondrias hiperpolarizadas, unos niveles de NADH menores y una mayor abundancia de especies reactivas de oxígeno en comparación con los astrocitos CT2 control (Fig. 5).

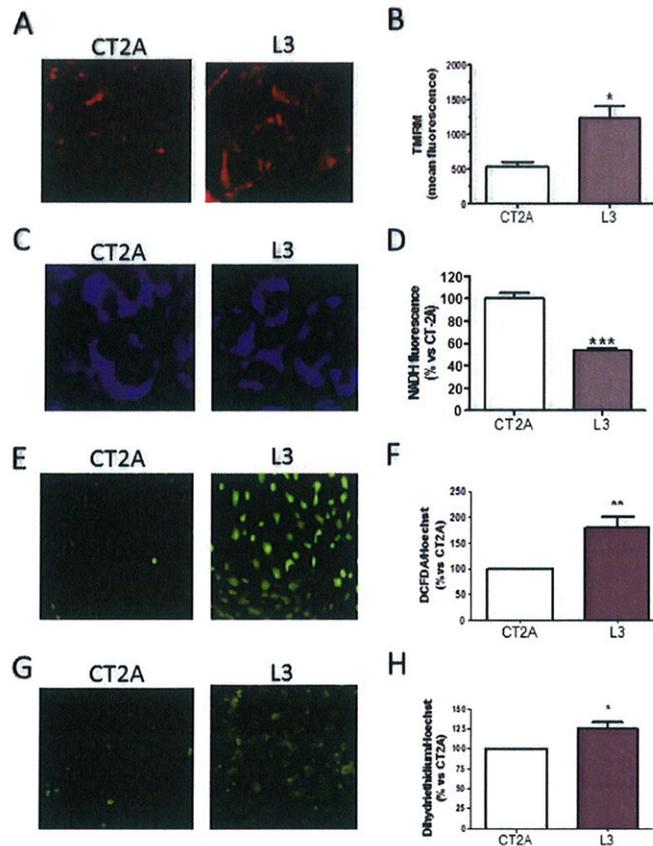


Figura 5. Los astrocitos que expresan las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E presentan una disfunción mitocondrial. (A, B) Grado de hiperpolarización mitocondrial medido mediante TMRE, (C, D) niveles de NADPH, (E, F) formación de especies reactivas de oxígeno mediante la sonda DCFDA, (G, H) formación de especies de superóxido medido con la sonda dihidroetidio. Los datos corresponden a la media y error estándar de 4-7 experimentos.

Se ha medido también la respiración mitocondrial de las células LS3 y sus controles CT2A en un aparato Seahorse XF24. Se determina así la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *oxygen consumption rate*), tanto en estado basal en el cultivo como después de distintos tratamientos que inhiben el complejo V (oligomicina), desacoplan la cadena de transporte electrónico del complejo V (FCCP) o inhibien los complejos I y III (antimicina A y rotenona). Se vio que las células LS3 presentan una menor respiración basal, así como la reducción de otros parámetros de la respiración mitocondrial (Fig. 6).

Se midió también en el mismo aparato la tasa de acidificación extracelular (ECAR, *extracellular acidification rate*), ya que mayores tasas de acidificación están relacionadas con una mayor actividad glicolítica, la ruta que puede compensar una menor producción e ATP por la respiración mitocondrial. Sin embargo, se vio que las células LS3 y CT2A presentan la misma ECAR en estado basal, aunque la reserva glicolítica de las células LS3 se encuentra disminuida (Fig. 7).

Con estos experimentos hemos podido determinar que las mitocondrias de los astrocitos que contienen las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E presentan un metabolismo mitocondrial menos eficiente y, como consecuencia, una menor producción de ATP. Será interesante comprobar si la menor eficiencia pueda deberse a una menor actividad del complejo I, una de las hipótesis que se desprende del resto de resultados de este proyecto.

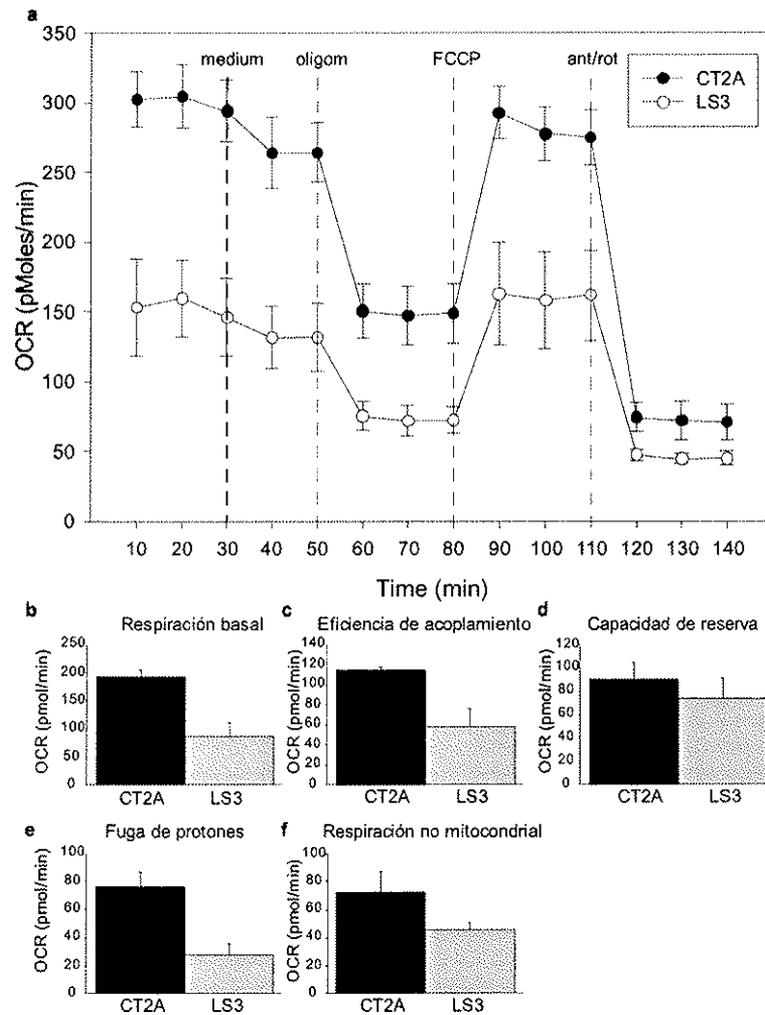


Figura 6. Los astrocitos que expresan las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E (LS3) poseen una tasa de consumo de oxígeno disminuida. (a) Se midió la tasa de consumo de oxígeno (OCR, de sus siglas en inglés) en células control (CT2A, ●) y de ratón transgénico (LS3, ○), con la adición secuencial de diferentes compuestos: medio de cultivo (medium), oligomicina 5 μg/ml (oligom), FCCP 300 nM, rotenona 1 μM y antimicina A 1 μM (ant/rot). (b-f) Cálculos definiendo diferentes parámetros sobre el consumo de oxígeno.

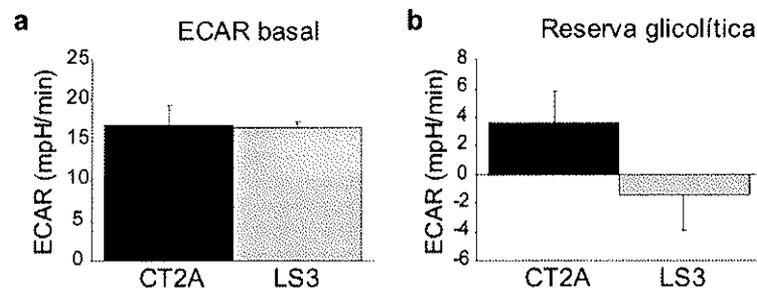


Figura 7. Los astrocitos que expresan las mutaciones APP_{SWE}/PS1-A246E (LS3) tienen una reserva glicolítica menor. Se midió la tasa de acidificación del medio extracelular (ECAR, de sus siglas en inglés) en células control (CT2A) y de ratón transgénico (LS3). (a y b) Cálculos correspondientes a los parámetros de acidificación.

Estos resultados se han incorporado a un manuscrito en el que se discute el posible papel de los astrocitos en la relación entre enfermedad de Alzheimer e ictus, que se enviará próximamente a publicar, y en el que se agradecerá el apoyo de la Fundación.

Conclusión

Los resultados de este estudio ayudan a conocer los mecanismos moleculares de la implicación de la hipoxia y la generación de ROS en ictus y enfermedades como el Alzheimer, y ayudan a abrir nuevas oportunidades terapéuticas en estas enfermedades. Se recogen e un manuscrito actualmente sometido a evaluación por pares para su publicación (se adjunta copia), otro que está en preparación, y otro que queremos completar con más experimentos. Además, se ha registrado una patente que protege la posible aplicación terapéutica de parte de estos resultados.

Agradecemos el apoyo continuado de la Fundación Domingo Martínez a la investigación científica, y en concreto la ayuda a nuestro grupo, que nos ha impulsado a poner en marcha este proyecto, con el que esperamos avanzar en el conocimiento sobre la implicación del estrés oxidativo inducido por hipoxia en las enfermedades neurodegenerativas.



Antonio Martínez Ruiz

Investigador principal del proyecto

Referencias

- Altieri, M., Di Piero, V., Pasquini, M., Gasparini, M., Vanacore, N., Vicenzini, E., and Lenzi, G.L. (2004). Delayed poststroke dementia: a 4-year follow-up study. *Neurology* 62, 2193-2197.
- Erkinjuntti, T., Kurz, A., Small, G.W., Bullock, R., Lilienfeld, S., Damaraju, C.V., and Group, G.-I.-S. (2003). An open-label extension trial of galantamine in patients with probable vascular dementia and mixed dementia. *Clinical therapeutics* 25, 1765-1782.
- Hernansanz-Agustín, P., Izquierdo-Álvarez, A., Sánchez-Gómez, F.J., Ramos, E., Villa-Piña, T., Lamas, S., Bogdanova, A., and Martínez-Ruiz, A. (2014). Acute hypoxia produces a superoxide burst in cells. *Free radical biology & medicine* 71, 146-156.
- Izquierdo-Álvarez, A., Ramos, E., Villanueva, J., Hernansanz-Agustín, P., Fernández-Rodríguez, R., Tello, D., Carrascal, M., and Martínez-Ruiz, A. (2012). Differential redox proteomics allows identification of proteins reversibly oxidized at cysteine residues in endothelial cells in response to acute hypoxia. *J Proteomics* 75, 5449-5462.
- Miranda-Lorenzo, I., Dorado, J., Lonardo, E., Alcalá, S., Serrano, A.G., Clausell-Tormos, J., Cioffi, M., Megias, D., Zagorac, S., Balic, A., *et al.* (2014). Intracellular autofluorescence: a biomarker for epithelial cancer stem cells. *Nature methods* 11, 1161-1169.
- Roberts, P.G., and Hirst, J. (2012). The deactive form of respiratory complex I from mammalian mitochondria is a Na⁺/H⁺ antiporter. *The Journal of biological chemistry* 287, 34743-34751.
- Sheng, B., Cheng, L.F., Law, C.B., Li, H.L., Yeung, K.M., and Lau, K.K. (2007). Coexisting cerebral infarction in Alzheimer's disease is associated with fast dementia progression: applying the National Institute for Neurological Disorders and Stroke/Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences Neuroimaging Criteria in Alzheimer's Disease with Concomitant Cerebral Infarction. *Journal of the American Geriatrics Society* 55, 918-922.
- Sun, X., He, G., Qing, H., Zhou, W., Dobie, F., Cai, F., Staufenbiel, M., Huang, L.E., and Song, W. (2006). Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18727-18732.
- Verkhatsky, A., Olabarria, M., Noristani, H.N., Yeh, C.Y., and Rodriguez, J.J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 7, 399-412.

Implicaciones de la hipoxia y las especies reactivas de oxígeno en las enfermedades neurodegenerativas

Informe final – resumen

En primer lugar, hemos estudiado en detalle el mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno en la hipoxia aguda, en neuronas y en tejido cerebral (rodajas de hipocampo de ratón). En ambos sistemas se ha podido comprobar que está operativo el modelo molecular que se ha establecido previamente en células endoteliales, por el que el complejo I mitocondrial se desactiva en hipoxia aguda, provocando la activación del intercambiador de sodio/calcio mitocondrial (NCLX), despolarización mitocondrial y un aumento de la producción de superóxido. Este mecanismo tiene varias implicaciones interesantes:

- El complejo I puede estar actuando como un sensor primario de oxígeno, su actividad se ve regulada por la hipoxia, y desencadena la producción de superóxido, que puede ser una señal de hipoxia aguda.

- NCLX juega un papel fundamental en el proceso de producción de ROS y la activación de la ruta de HIF en hipoxia, por lo que es una posible diana farmacológica para estos procesos (se ha registrado una patente al respecto).

Además, en un modelo de ictus irreversible en ratones, se comprobó que este mecanismo también puede estar operativo, y que la inhibición de NCLX protege parcialmente del daño que se produce por el infarto cerebral.

Estos resultados forman parte de un manuscrito, en el que se incluye el agradecimiento a la Fundación por la ayuda recibida, que se ha enviado a la revista de alto generalista de alto impacto *Nature Communications*, y que actualmente está siendo evaluado por *referees*. Se adjunta copia de la publicación.

En un modelo de ratón triplemente transgénico para la enfermedad de Alzheimer, se están llevando a cabo determinaciones similares, en rodajas de hipocampo. Se ha observado que en animales mayores, en los que la afección según el modelo de la enfermedad es mayor, se observa una mayor producción de superóxido en estado basal, y menor en hipoxia, lo que puede estar relacionado con una desactivación basal del complejo I mitocondrial. Se prevé continuar esta investigación, complementando este sistema con el estudio de un modelo de neuronas sometidas a beta-amiloide, en el que poder estudiar en detalle este mecanismo molecular.

Asimismo, se ha estudiado en detalle un modelo de astrocitos provenientes de ratones doblemente transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, en los que se ha podido constatar la disfunción mitocondrial y exacerbada producción de especies reactivas de oxígeno.

Agradecemos el apoyo continuado de la Fundación Domingo Martínez a la investigación científica, y en concreto la ayuda a nuestro grupo, que nos ha permitido poner en marcha experimentos en colaboración entre los dos grupos implicados en el equipo investigador, combinando la dispar experiencia previa, y creando nuevas sinergias. Los resultados de este estudio ayudan a conocer los mecanismos moleculares de la implicación de la hipoxia y la generación de ROS en ictus y enfermedades como el Alzheimer, y ayudan a abrir nuevas oportunidades terapéuticas en estas enfermedades.