

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y PEDIATRÍA



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**Efecto neuroprotector de fingolimod fosfato sobre el
estrés oxidativo y el daño mitocondrial inducido por
menadiona en neuronas dopaminérgicas en cultivo**

**Programa de Doctorado: Biomedicina, Investigación
Traslacional, y Nuevas Tecnologías en Salud**

Antonio Jesús Gil Cebrián


Directores: Dr. José Pavía y Dra. Inmaculada García

Málaga, 2021



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Antonio Jesús Gil Cebrián

 <https://orcid.org/0000-0003-2672-3277>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D. ANTONIO JESÚS GIL CEBRIÁN

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL, Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la universidad de Málaga, autor de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: EFECTO NEUROPROTECTOR DE FINGOLIMOD FOSFATO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL DAÑO MITOCONDRIAL INDUCIDO POR MENADIONA EN NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN CULTIVO.

Realizada bajo la tutorización de JOSE PAVÍA MOLINA y dirección de MARIA INMACULADA GARCÍA FERNÁNDEZ Y JOSE PAVÍA MOLINA.

Declaro que:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 11 de DICIEMBRE de 2021

Fdo: Doctorando.	Fdo: Tutor de la tesis.
Fdo: Directores de la tesis.	





UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

D. José Pavía Molina, Profesor Titular del Departamento de Farmacología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

INFORMA

Que el trabajo de investigación que presenta **D. Antonio Jesús Gil Cebrián**, titulado “**Efecto neuroprotector de fingolimod fosfato sobre el estrés oxidativo y el daño mitocondrial inducido por menadiona en neuronas dopaminérgicas en cultivo**” ha sido realizado bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesarios para ser sometido al superior juicio de la comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga, a 15 de noviembre de 2021.

Fdo: José Pavía Molina



UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

Dña. María Inmaculada García Fernández, Profesora Titular del Departamento Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física Deportiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga,

INFORMA

Que el trabajo de investigación que presenta **D. Antonio Jesús Gil Cebrián**, titulado **“Efecto neuroprotector de fingolimod fosfato sobre el estrés oxidativo y el daño mitocondrial inducido por menadiona en neuronas dopaminérgicas en cultivo”** ha sido realizado bajo mi dirección y considero que tiene el contenido y rigor científico necesarios para ser sometido al superior juicio de la comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga, a 15 de noviembre de 2021.

Fdo: Inmaculada García Fernández

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José Pavía Molina, por ejercer de tutor y ser el pilar fundamental de mi aprendizaje dentro del ámbito de la investigación. Destacar su excelente trato tanto profesional como personal, dedicando parte de su valioso tiempo a mi formación para que este proyecto pudiera salir adelante. A la Doctora María García Fernández, directora y de la que he tenido la suerte de adquirir grandes conocimientos, ejerciendo de consultora en cada paso de la tesis doctoral. Recalcar la calidad humana y científica de ambos y su perseverancia para que el esfuerzo realizado durante los últimos años pudiera dar su fruto plasmándose en dicho proyecto que con tanto trabajo e ilusión ha sido realizado.

A mi familia, por apoyarme durante toda mi trayectoria profesional y darme la oportunidad de recibir una educación y unos valores que han hecho posible lograr mi gran objetivo de poder llevar a cabo mi tesis doctoral.

LISTADO DE ABREVIATURAS:

- 2-DG: 2-Desoxy-D-Glucosa
- 2,4-DNP: 2,4-Dinitophenol
- ACN: Acetonitrilo
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- ADN_m: ADN mitocondrial
- ADP: Adenosín difosfato
- AMBIC: Tampón bicarbonato de amonio
- ARE: Elementos de respuesta antioxidante
- ARN: Ácido ribonucleico
- ATP: Adenosín trifosfato
- BSA: Albúmina de suero bovino
- CAT: Catalasas
- D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DAVID: Base de Datos para la Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado
- EA: Enfermedad de Alzheimer
- ECAR: Tasa de acidificación extracelular
- EH: Enfermedad de Huntington
- ELA: Esclerosis lateral amiotrófica
- EM: Esclerosis múltiple
- emPAI: Índice de abundancia de proteínas modificado exponencialmente
- eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
- EP: Enfermedad de Parkinson
- EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente
- FA: Ácido fórmico
- FADH₂: Flavín adenín dinucleótido
- FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona
- FCS: Suero fetal de ternera
- FP: Fingolimod fosfato
- G-6-PDH: Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
- GPX: Glutati6n peroxidasa
- GR: Glutati6n reductasa
- GSH: Glutati6n

- GSSG: Disulfuro de glutatión (Glutatión oxidado)
- GTP: Guanosina trifosfato
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- IFN γ : Interferón gamma
- IL: Interleuquina
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
- KEGG: Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto
- LC-MS/MS: Cromatografía líquida con espectrometría de masas/Espectrometría de masas
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- MAO: Monoamino oxidasa
- MDHM: Malato deshidrogenasa mitocondrial
- MS: Espectrometría de masas
- MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridino
- MPT: Poro de transición en la permeabilidad mitocondrial
- mtNOS: Óxido nítrico sintasa mitocondrial
- NAD⁺: Nicotiamida adenina dinucleótido
- NADP: Nicotiamida adenina dinucleótido fosfato
- nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
- NO: Óxido nítrico
- NOS: Óxido nítrico sintasa
- NOX: NADPH oxidasa
- Nrf2: Factor nuclear eritroide 2
- O₂⁻: Anión superóxido
- OCR: Tasa de consumo de oxígeno
- OH1: Hemo oxigenasa 1
- OH: Radical hidroxilo
- OH⁻: Ion hidroxilo
- ONOO⁻: Peroxinitrito
- PARP-PAR: Poli ADP ribosa polimerasa
- PBS: Tampón fosfato salino
- Q: Ubiquinona
- QH₂: Ubiquinol
- RCS: Especies reactivas de cobre

- RL: Radical libre
- RNS: Especies reactivas de nitrógeno
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- S1P: Esfingosina 1 fosfato
- S1Pr (S1P₁₋₅): Receptores esfingosina 1 fosfato
- SNC: Sistema nervioso central
- SOD: Superóxido dismutasa
- SRC: Capacidad respiratoria de reserva
- TCM: Linfocitos T memoria central
- TEMED: Tetrametiletilendiamina
- Trx: Tiorredoxina
- TEM: Linfocitos T memoria efectora
- TNF α : Factor necrosis tumoral alfa
- TrxR: Tiorredoxina reductasa
- TSPO: Proteína translocadora mitocondrial
- Vitk3: Menadiona
- VPP: Vía de la pentosa fosfato
- W123: 3-(2-(3-hexylphenylamino)-2-oxoethylamino)propanoic acid
(Antagonista competitivo selectivo del receptor S1P₁)
- XDH: Xantina deshidrogenasa
- XO: Xantina oxidasa
- XOR: Xantina oxidorreductasa

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	19
1. Fingolimod.....	19
1.1 Definición.....	19
1.2 Esfingosina 1-fosfato (S1P).....	20
1.3 Receptores de la esfingosina 1-fosfato.....	22
1.4 Beneficios terapéuticos del fingolimod.....	22
1.4.1 Secuestro de los linfocitos T en los nódulos linfáticos.....	23
1.4.2 Efecto antioxidante.....	24
1.4.3 Otros efectos.....	24
2. Fuentes de producción de energía neuronal.....	25
2.1 Glucólisis.....	26
2.2 Ciclo de Krebs.....	27
2.3 Mitocondrias: Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa.....	28
2.4 Vía de la pentosa-fosfato.....	30
2.5 Procesos de consumo del ATP neuronal.....	30
2.6 Dinámicas mitocondriales.....	31
3. Neurodegeneración.....	33
3.1 Radicales libres y especies reactivas.....	34
3.2 Sistemas de producción de ROS/RNS.....	34
3.2.1 NADPH oxidasa (NOX).....	35
3.2.2 Xantina oxidoreductasa (XOR).....	35
3.2.3 Óxido nítrico sintetasa (NOS).....	36
3.2.4 Oxidación de las catecolaminas.....	36
3.2.5 Cadena transportadora de electrones.....	36
3.3 Sistemas de defensa antioxidantes.....	38
3.3.1 Sistemas enzimáticos.....	38
3.3.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	39
3.3.1.2 Glutatión peroxidasa (GPX).....	39
3.3.1.3 Catalasas (CAT)	39
3.3.1.4 Sistema tiorredoxina (Trx).....	40

3.3.2	Sistemas no enzimáticos.....	41
3.4	Daño oxidativo neuronal.....	41
3.4.1	Procesos inflamatorios: Activación de la microglía.....	42
3.4.2	Aumento de los niveles de calcio intracelular.....	42
3.4.3	Disfunción mitocondrial y déficit energético.....	43
3.4.3.1	Daño axonal.....	44
3.4.3.2	Daño en oligodendrocitos.....	44
3.4.4	Excitotoxicidad.....	46
3.4.5	Muerte celular regulada.....	46
3.5	ROS y enfermedades neurodegenerativas.....	47
3.5.1	Enfermedad de Alzheimer.....	47
3.5.2	Enfermedad de Parkinson.....	48
3.5.3	Esclerosis lateral amiotrófica.....	49
3.5.4	Enfermedad de Huntington.....	49
HIPÓTESIS.....		51
OBJETIVOS.....		53
MATERIAL Y MÉTODOS.....		55
1.	Cultivo celular y tratamientos.....	55
2.	Viabilidad Celular.....	56
3.	Proteómica.....	56
4.	Preparación de muestras de proteínas.....	58
5.	Tinción inmunocitoquímica.....	58
6.	Enzimas antioxidantes.....	58
7.	Nitrosilación de proteínas.....	59
8.	Determinación de la aldolasa.....	59
9.	Tasa de acidificación extracelular (ECAR) y tasa de consumo de oxígeno (OCR).....	59
10.	Análisis estadístico.....	62

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
1. Estudios sobre metabolismo oxidativo.....	67
2. Estudios sobre las enzimas antioxidantes.....	71
2.1 Superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2).....	71
2.2 Glutación peroxidasa (GPX).....	71
2.3 Catalasas (CAT).....	72
2.4 Nitrosilación de proteínas.....	72
3. Estudios sobre metabolismo de la glucosa.....	73
4. Influencia de los receptores S1P.....	79
CONCLUSIONES.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	85
ANEXO 1.....	99
ANEXO 2.....	105

INTRODUCCIÓN

1. FINGOLIMOD

1.1 Definición

El Fingolimod es uno de los pocos medicamentos disponibles por vía oral para el tratamiento de la forma más frecuente de EM denominada esclerosis múltiple remitente recurrente (EMRR) ¹. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica, neurodegenerativa y autoinmune que afecta principalmente al sistema nervioso central (SNC), con una progresión clínica compleja caracterizada por una inflamación, desmielinización y degeneración axonal ².

Debido a su similitud con la esfingosina endógena, el Fingolimod se fosforila en su metabolito activo el fingolimod fosfato (FP) por medio de dos proteínas quinasas (esfingosina quinasa tipo 1 y tipo 2). FP es capaz de interactuar con los receptores de la esfingosina 1-fosfato (S1P) comportándose como agonista de los mismos e iniciando una cascada de efectos similares a los producidos por la esfingosina fosfato endógena ³.

El FP tiene como objetivo principal en el tratamiento de la EM corregir la neuroinflamación para acelerar la recuperación de los pacientes tras las recaídas, disminuir la gravedad y el número de brotes, prevenir la evolución a las formas progresivas y dar al paciente una mejor calidad de vida ^{4 5}. Todos estos objetivos son posibles a través de la modulación que ejerce el FP en los receptores S1P, teniendo como principal efecto el secuestro funcional de los linfocitos T en los nódulos linfáticos ⁶.

El mecanismo de acción de FP, aprobado actualmente por las agencias reguladoras, se basa en su interacción con los receptores S1P, de los cuales existen al menos cinco subtipos que explicaremos posteriormente. FP hiperestimula inicialmente al receptor S1P₁ de los linfocitos, seguido de un antagonismo funcional donde los receptores se internalizan y degradan, reduciéndolos o eliminándolos de la superficie celular. Esta regulación a la baja hace que los linfocitos no respondan de manera normal al gradiente S1P, impidiéndoles salir de los tejidos linfoides ante señales que ordinariamente se lo permitirían, reduciendo su infiltración al SNC ⁷.

La EM junto con otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) o la enfermedad de Alzheimer (EA), se caracterizan por una alteración de la homeostasis oxidativa neuronal y una disfunción mitocondrial, lo cual limita la neurona ante situaciones de estrés ya que la producción de energía se ve comprometida. Este grupo de enfermedades neurodegenerativas se pueden agrupar como mitocondriopatías ⁸.

Recientemente se han realizado estudios que señalan que el FP, a parte de la regulación del sistema inmunitario a través del secuestro de linfocitos T, posee un efecto neuroprotector pudiendo promover una mejora en la función cognitiva en procesos isquémicos y desórdenes neurodegenerativos como Huntington ⁹ o la enfermedad de Alzheimer ¹⁰.

Otro estudio realizado por nuestro grupo sobre un modelo de daño oxidativo inducido por menadiona (VitK3) en cultivos neuronales muestra que este efecto neuroprotector del FP es debido a su capacidad para restaurar el equilibrio oxidativo neuronal al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y recuperar la función y morfología mitocondrial, permitiendo mantener la producción de energía ¹¹.

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, se ha establecido la importancia de la glucólisis como fuente de energía en la sinapsis, la conducción axonal y la plasticidad entre otras funciones neuronales, por lo que la existencia de diferentes fuentes de energía como el ATP mitocondrial y glucolítico, permite mecanismos de adaptación más rápidos a situaciones de alta demanda energética pudiendo ayudar en el mantenimiento de la función neuronal en situaciones de estrés.

Un conocimiento más claro de la influencia del daño oxidativo en estas vías de obtención de ATP junto con los eventos moleculares asociados al efecto protector del Fingolimod podría ser crucial en el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas dirigidas a estas enfermedades.

1.2 Esfingosina 1-fosfato (S1P)

Las hormonas, los neurotransmisores y los mensajeros de acción local llevan a cabo sus funciones a través de la unión a estructuras denominadas receptores, que se encargan de disparar las acciones celulares y sistémicas que producen ¹².

La S1P es un intermediario en el metabolismo de los esfingolípidos y regula funciones importantes como la proliferación, la diferenciación y la migración, tal y como se muestra en la figura 1. Este intermediario es secretado por mastocitos, plaquetas activadas y otros tipos de células del sistema inmunitario innato, mientras que en el SNC es liberado por células endoteliales, neuronas y astrocitos ¹³.

S1P actúa como agonista natural de una familia de receptores acoplados a proteínas G, los receptores de esfingosina fosfato (S1Pr) de los que existe en la actualidad cinco subtipos. Estos receptores desencadenan efectos intracelulares a través de la generación de segundos mensajeros, proteínas efectoras y activación de enzimas ¹⁴.

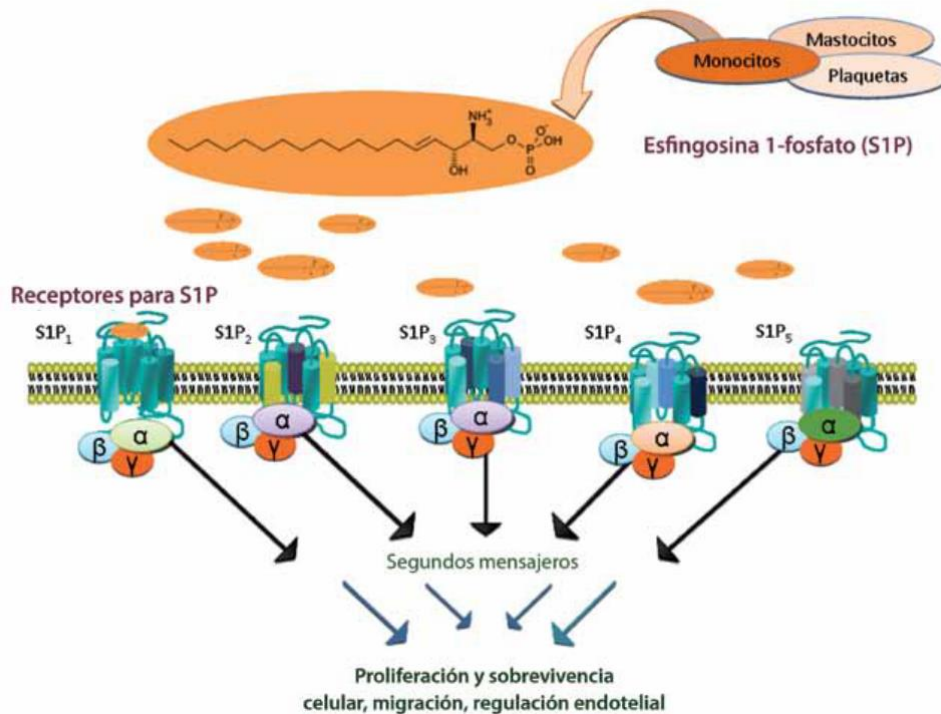


Figura 1. Células secretoras de S1P, unión a receptores S1P₁₋₅ y funciones que desencadena. (Bazúa-Valenti et al 2012)

1.3 Receptores de la esfingosina-1-fosfato

Los receptores de la S1P se encuentran en varios tipos de células tanto del sistema nervioso central como de la periferia. Existen cinco subtipos de receptores S1P, denominados S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ y S1P₅ y cada uno de ellos tienen un papel fundamental en la supervivencia celular, quimiotaxis, angiogénesis, regulación de la integridad de la barrera endotelial y en la maduración y permeabilidad vascular ¹⁵.

Los receptores S1P₁ se expresan abundantemente en los linfocitos T y B; S1P₂ tiene un papel importante en el desarrollo neuronal, además de ser fundamental en la función auditiva y vestibular; S1P₃ se expresa en el pulmón, bazo, riñones, intestino y diafragma, y una de sus funciones principales a nivel cardiovascular es la regulación de la frecuencia cardíaca ¹⁶; los receptores S1P₄ se limitan a los tejidos linfoides y hematopoyéticos, mientras que S1P₅ se expresan predominantemente en la sustancia blanca del SNC ⁷.

El receptor S1P₁ tiene como efecto más significativo su participación en la inmunidad innata y adaptativa, ya que regula la respuesta inmune, lleva a cabo la diferenciación de leucocitos y controla el tráfico de linfocitos T y B. Este tráfico de linfocitos de los ganglios linfáticos a la circulación es regulado tanto por la concentración de S1P como por la presencia del receptor S1P₁ en las células, manteniendo el nivel de linfocitos circulantes y la respuesta inmunológica del organismo ¹⁷.

Debido a su función en la regulación de la respuesta inmunitaria, el receptor S1P₁ juega un papel fundamental en la patogenia de enfermedades neurodegenerativas como la EM, la EP, la EA, la EH y la ELA convirtiéndolo en una diana farmacológica de gran interés ¹⁸.

1.4 Beneficios terapéuticos del Fingolimod

El Fingolimod es rápidamente fosforilado a su metabolito activo el FP para llevar a cabo su función mediante la modulación del receptor de la S1P, pudiendo unirse a todos los subtipos de receptores S1P exceptuando al receptor S1P₂ ¹⁹. El objetivo principal de Fingolimod en el tratamiento de la EM y posiblemente otras enfermedades neurodegenerativas, es reducir la actividad de la enfermedad y/o mejorar o enlentecer la aparición de los déficits neurológicos a través de uno o varios de los siguientes mecanismos:

1.4.1 Secuestro de los linfocitos T en los nódulos linfáticos

Los linfocitos circulan normalmente entre la sangre y los nódulos linfáticos (dónde se produce la mayoría de las presentaciones antigénicas). Cuando se produce el estímulo antigénico, los linfocitos T naive presentes en los nódulos linfáticos pueden diferenciarse en dos tipos de linfocitos T memoria: los linfocitos T de memoria central (TCM) y los linfocitos T de memoria efectora (TEM). El tipo de diferenciación depende de la intensidad de la estimulación antigénica de los linfocitos T naive en los nódulos linfáticos y la capacidad para generar CCR7, una quimiocina involucrada en la retención de los linfocitos T en los nódulos linfáticos. Si la intensidad de estimulación es alta, se generan CCR7⁻ TEMs que se desplazan a los tejidos infectados realizando sus funciones efectoras, sin embargo, si la intensidad es baja se generan CCR7⁺ TCMs que son retenidos en los órganos linfoides secundarios y requieren de una estimulación antigénica secundaria más fuerte para diferenciarse en TEMs ²⁰.

La mayoría de los TEMs patogénicos en la EM son derivados de TCMs que reciben una estimulación antigénica secundaria de la mielina del SNC, lo que conlleva al daño del tejido nervioso. La salida de los TCMs de los nódulos linfáticos requiere una activación del receptor S1P₁ que anula la retención provocada por CCR7⁺. Por lo tanto, la liberación de los linfocitos T de los nódulos linfáticos a la sangre deriva del equilibrio entre las señales de retención de CCR7⁺ y la activación de S1P₁ ²¹.

El FP, tras su fosforilación, se une al receptor S1P₁ reduciendo la señal de salida de los TCMs y favoreciendo la retención mediada por CCR7⁺ en los nódulos linfáticos.

El receptor S1P₁ desempeña un papel clave en el sistema inmunitario, ya que regula la salida de los linfocitos de los ganglios linfáticos a la circulación. El FP activa inicialmente el receptor S1P₁ a través de una unión de alta afinidad, pero posteriormente induce una regulación a la baja de estos receptores, que impide la salida de los linfocitos del tejido linfoide, reduciendo así la infiltración autoagresiva de linfocitos en el sistema nervioso central. Podemos por lo tanto concluir que, a pesar de ser un agonista del receptor S1P₁, la realidad es que FP se comporta como un antagonista funcional de dicho receptor ⁷.

Este mecanismo disminuye de manera significativa la circulación de los linfocitos T, previniendo que atraviesen la barrera hematoencefálica llegando al SNC, dónde liberarían citoquinas proinflamatorias que activarían a las células de la microglía, astrocitos y macrófagos estableciendo un entorno inflamatorio y un desequilibrio en el balance oxidativo provocando la desmielinización y finalmente la muerte neuronal ²².

1.4.2 Efecto antioxidante

La mayoría del daño en las enfermedades neurodegenerativas proviene de mecanismos de estrés oxidativo que explicaremos con más detenimiento posteriormente, dónde las especies reactivas de oxígeno (ROS) tienen un papel fundamental tanto en los estadios iniciales como tardíos.

La presencia de células inflamatorias junto con la producción de citoquinas proinflamatorias, típico de las enfermedades neurodegenerativas, activan los mecanismos oxidativos causando un daño importante a macromoléculas como ADN, lípidos y proteínas ²³.

La mitocondria es una de las fuentes principales de ROS ²⁴. Durante el proceso del transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial, una pequeña cantidad (menor al 5%) de los electrones que circulan a través de la cadena, se escapan y se unen directamente al O₂ formando el anión superóxido (O₂⁻) ²⁵.

La presencia de ROS como el O₂⁻ en pequeñas cantidades ejerce funciones fisiológicas en el organismo como señalizadores celulares frente al estrés oxidativo restableciendo la homeostasis redox, regulación vascular y transducción de señales desde varios receptores celulares ²⁶.

El sistema nervioso central es altamente susceptible a ROS, por lo tanto, un acúmulo de ROS junto con una disfunción mitocondrial, contribuyen de manera significativa a la neurodegeneración en enfermedades como la EP, EM, EA o EH ^{27 28}.

Las células poseen mecanismos defensivos para contrarrestar este desequilibrio como las enzimas antioxidantes, por lo que el mantenimiento o recuperación del desequilibrio en la homeostasis REDOX es un objetivo terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas ²⁹. La utilización de fármacos con capacidad antioxidante podría producir beneficios terapéuticos; en este sentido, nuestro grupo ha comprobado en estudios previos el efecto antioxidante de Fingolimod ¹¹.

1.4.3 Otros efectos

El FP además posee efecto antiinflamatorio al interactuar con las células dendríticas reduciendo significativamente los niveles de algunas citoquinas como TNF α , IL-17, IL-27 e IFN γ ²².

Los receptores S1P se expresan en células tanto del sistema nervioso central como de la periferia por lo que Fingolimod tendría un impacto directo sobre la neurodegeneración, gliosis y mecanismos de reparación endógenos ³⁰.

2. FUENTES DE PRODUCCIÓN DE ENERGÍA NEURONAL

Una neurona cortical cerebral consume 4.7 billones de moléculas de ATP por segundo realizando funciones biológicas ³¹.

El cerebro es el órgano que consume mayor cantidad de energía en el organismo basado principalmente en dos sustratos: la glucosa y el oxígeno. Los principales mecanismos de obtención de energía neuronal son: la glucólisis, el ciclo de Krebs, la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa, tal y como podemos observar en la figura 2.

La fuente principal de energía en las neuronas es el ATP derivado de las mitocondrias. Esta energía es necesaria para llevar a cabo actividades como el correcto funcionamiento de la sinapsis, la conducción axonal generando potenciales de acción y la plasticidad neuronal. Sin embargo, para una correcta función neuronal, las mitocondrias deben ser eliminadas cuando se vuelven disfuncionales o envejecidas, con el consiguiente reclutamiento y redistribución de mitocondrias para cumplir los requerimientos metabólicos y energéticos ³¹.

Como ya comentamos anteriormente, las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por un desequilibrio en el balance oxidativo y una disfunción mitocondrial, lo que influye de manera drástica en los diferentes mecanismos de producción de ATP, incapacitando a la neurona para cubrir las necesidades energéticas de las diferentes funciones neuronales ⁸.

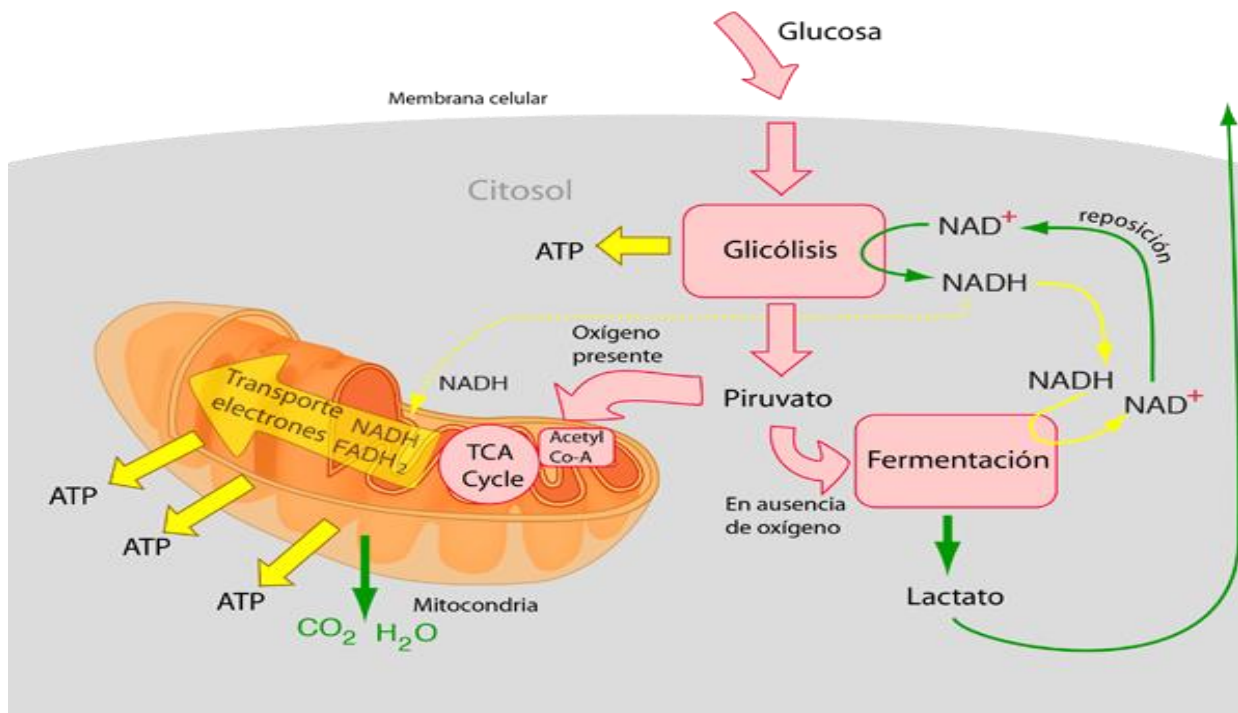


Figura 2. Representación esquemática del metabolismo celular de la glucosa. (Enger and Ross. 2003)

2.1 Glucólisis

La glucólisis es la ruta metabólica encargada de oxidar la glucosa con la finalidad de obtener energía para la célula. Consta de 10 reacciones enzimáticas consecutivas en el interior del citoplasma y son catalizadas por una serie de enzimas entre las que cabe destacar la aldolasa, obteniendo como resultado dos moléculas de piruvato. Durante el metabolismo de la glucosa a piruvato se producen dos fosforilaciones de ADP en ATP y dos reducciones de NAD⁺ a NADH por cada molécula de piruvato.

En presencia de oxígeno la molécula de piruvato entrará en la mitocondria para continuar con el ciclo de Krebs seguido de la cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa, sin embargo, en su ausencia, la molécula de piruvato seguirá una ruta metabólica anaeróbica denominada fermentación, durante la cual será reducida a lactato por medio de la lactato deshidrogenasa (LDH), obteniendo la reoxidación de NADH a NAD⁺ necesaria para una glucólisis sostenida ³².

2.2 Ciclo de Krebs

En presencia de oxígeno, la molécula de piruvato es descarboxilada en la matriz mitocondrial por el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa liberando CO_2 , acetil coenzima A (acetil-CoA) y NADH, iniciando una serie de reacciones químicas denominadas el ciclo de Krebs y representadas en la figura 3.

El ciclo de Krebs tiene lugar en la matriz mitocondrial y es una ruta metabólica que forma parte de la respiración celular aerobia donde se libera energía química a través de la oxidación del acetil-CoA.

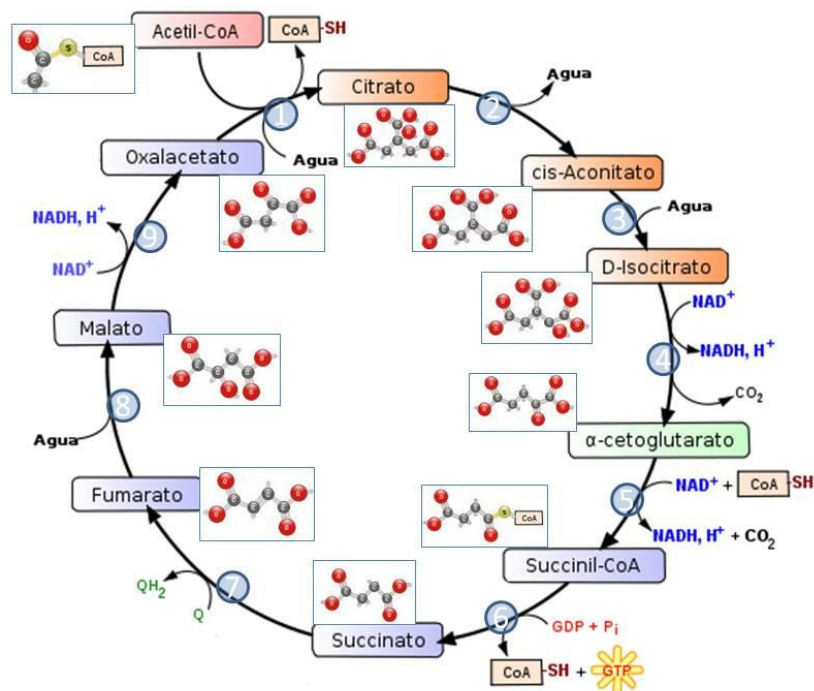


Figura 3. Esquema de las diferentes reacciones químicas y productos secundarios liberados durante el ciclo de Krebs. (Freeman 2009)

Durante este proceso se llevan a cabo una serie de reacciones redox en las que se obtiene energía en forma de diferentes moléculas: NADH, FADH_2 y GTP. Por lo tanto, a partir de una molécula de piruvato, obtendremos 1 molécula de guanosina trifosfato (GTP), 3 reducciones de NAD^+ a NADH, 1 reducción de FAD a FADH_2 y dos moléculas de CO_2 .

2.3 Mitocondrias: Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa

La cadena transportadora de electrones es una serie de complejos localizados en la membrana interna mitocondrial, cuyo objetivo fundamental es la creación de un gradiente electroquímico que se utiliza para la síntesis de ATP.

Durante el ciclo de Krebs se formarán dos moléculas donadoras de electrones: NADH y FADH_2 . Los electrones de estos donadores pasan a través de los diferentes complejos de la cadena transportadora de electrones hasta llegar al receptor final que es el O_2 , el cual se reduce para formar agua, como podemos observar en la figura 4.

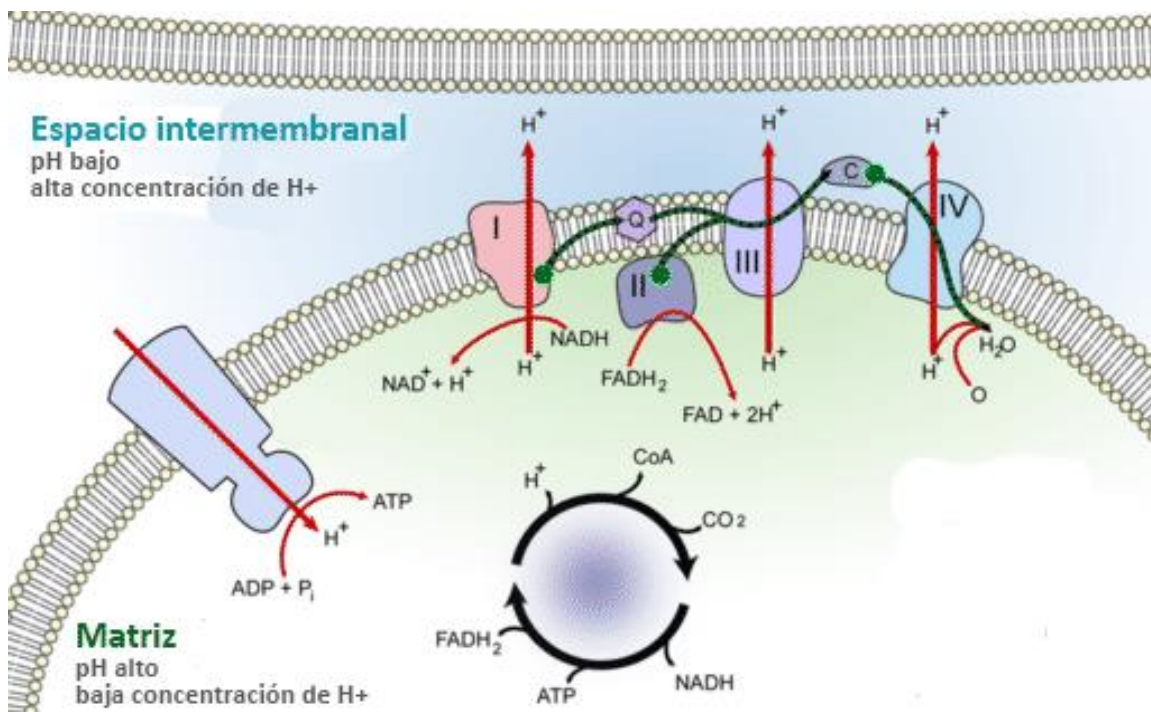


Figura 4. Cadena transportadora de electrones con los diferentes complejos localizados en la membrana mitocondrial. (Ruiz M. et al 2012)

- **Complejo I: NADH deshidrogenasa**

Capta dos electrones del NADH y los transfiere a un transportador liposoluble denominado ubiquinona (Q). Durante este proceso, el complejo I transloca cuatro protones H^+ a través de la membrana al espacio intermembrana, produciendo un gradiente de protones.

- **Complejo II: Succinato deshidrogenasa**

Este complejo no es una bomba de protones, a diferencia de los complejos I, III y IV. El $FADH_2$ formado durante el ciclo de Krebs transfiere sus electrones al transportador Q, este transportador es reducido formando ubiquinol (QH_2) que es capaz de difundir libremente por la membrana.

- **Complejo III: Complejo citocromo C**

Este complejo obtiene dos electrones del QH_2 y los transfiere a dos moléculas de citocromo C, que es un transportador de electrones hidrosoluble localizado en el espacio intermembrana de la mitocondria. Al igual que en el complejo I, durante este proceso se transloca cuatro protones H^+ a través de la membrana debido a los dos electrones transportados desde QH_2 .

- **Complejo IV: Citocromo C oxidasa**

Este complejo recibe los electrones de las dos moléculas del citocromo C y mediante una serie de procesos acaba en el receptor final que es el O_2 , que junto con dos protones de la matriz mitocondrial forma agua (H_2O). Durante este proceso, se bombean dos protones H^+ a través de la membrana.

- **Complejo V: ATP Sintasa**

La energía potencial del gradiente de protones, que se ha producido por el paso de los electrones a través de los diferentes complejos de la cadena transportadora de electrones, se libera cuando se translocan los protones a través de un canal pasivo denominado enzima ATP sintasa, y se usa en la adición de un grupo fosfato a una molécula de ADP formando ATP. Este proceso de formación de ATP aprovechando el gradiente de protones se denomina fosforilación oxidativa.

2.4 Vía de la pentosa-fosfato

La vía de la pentosa fosfato (VPP) es una ruta metabólica relacionada estrechamente con la glucólisis, durante la cual se utiliza la glucosa para generar ribosa que es necesaria para la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Además, también se obtiene poder reductor en forma de NADPH que se utilizará en el metabolismo anabólico.

De esta manera, la vía de la pentosa-fosfato tiene una doble función ya que la glucosa se usa para formar NADPH, mientras que también se puede transformar en otros componentes del metabolismo, especialmente pentosas, utilizadas para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos. Las neuronas principalmente metabolizan glucosa a través de la vía de la pentosa fosfato ³³.

2.5 Procesos de consumo del ATP neuronal

El ATP neuronal, como en la mayoría de las células, tiene un papel energético utilizándose en todos aquellos procesos que requieran energía. Principalmente es consumido por las siguientes enzimas:

- **ATPasa de Na⁺/K⁺:**

Se localiza en la membrana plasmática y consume en torno al 60% del ATP neuronal producido. Esta enzima es la responsable del mantenimiento del potencial de reposo de la membrana neuronal al bombear los iones de Na⁺ fuera de la célula intercambiándolos por iones K⁺. Este potencial es imprescindible para el correcto funcionamiento neuronal.

Cuando la neurona es activada, entran de forma masiva los iones de Na⁺ al interior neuronal produciendo un cambio en el potencial de membrana (despolarización). Esta alteración debe ser corregida rápidamente para que la neurona esté dispuesta a ser estimulada nuevamente. El restablecimiento del potencial de reposo es posible gracias al bombeo de iones de Na⁺ hacia el exterior de la neurona consumiendo ATP intercambiándolos por iones K⁺ ³².

- **ATPasa de Ca²⁺:**

Se localizan principalmente en la membrana plasmática y la membrana interna. Su función es retirar el Ca²⁺ del citoplasma, sobre todo a nivel del espacio presináptico, ya que su concentración aumenta por los procesos de despolarización neuronal.

- **ATPasa dependientes de H⁺:**

Se localizan en la membrana de las vesículas sinápticas en el terminal presináptico. Estas enzimas bombean iones H⁺ hacia el interior de las vesículas, creando un gradiente de protones que impulsa la entrada del neurotransmisor. El ATP también es usado para la exocitosis del neurotransmisor.

- El ATP se utiliza para la síntesis de GTP y la actividad de varias protein-quinasas.
- La actividad de la proteína G.

Todas estas enzimas consumen ATP para realizar sus funciones y mantener el buen funcionamiento neuronal. En las situaciones en las que se produce un desequilibrio en el balance oxidativo neuronal, como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, estas enzimas no disponen del ATP suficiente para llevar a cabo sus funciones, por lo que podrían acumularse iones Ca²⁺ en el interior neuronal provocando una interrupción del transporte rápido y una degeneración axonal ⁸.

2.6 Dinámicas mitocondriales

Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos que cambian su morfología y función en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos, regulando de esta manera la supervivencia celular ³⁴, como podemos observar en la figura 5. Dentro de estas dinámicas mitocondriales podemos destacar:

- **Tráfico mitocondrial:** Se refiere al transporte y distribución de las mitocondrias en las células. Las mitocondrias recorren largas distancias en las neuronas para aumentar su concentración en la región presináptica, cumpliendo así con las altas necesidades energéticas. Estos desplazamientos son posibles gracias al acople entre las proteínas motoras y adaptativas. Estos procesos deben ser regulados para mantener la homeostasis neuronal ³⁵.
- **Biogénesis mitocondrial:** Ciertos estímulos, como el estrés oxidativo, el ejercicio, las hormonas, la diferenciación y división celular, pueden tener como respuesta un aumento de la densidad mitocondrial. La generación de mitocondrias requiere de la expresión de dos genomas: uno el nuclear (contribuye con más de

1000 proteínas) y otro el mitocondrial (codifica sólo 13 proteínas hidrófobas de la cadena respiratoria) ³⁶.

- **Fusión / fisión mitocondrial:** Proceso que ocurre continuamente que permite la separación de porciones funcionales de la mitocondria y relocalizarlas en la neurona para la producción de energía. Este proceso es esencial para el control de calidad del orgánulo, mantenimiento y distribución del ADN mitocondrial (ADNm) y la regulación de la apoptosis ³⁷.
- **Mitofagia:** Las mitocondrias son eliminadas a través de un proceso denominado macroautofagia. Éste es el mecanismo de degradación dónde el autofagosoma se forma alrededor de los componentes dañados y se fusiona con el lisosoma para la degradación del contenido. Cuando la mitocondria no puede generar potencial de membrana, se fisiona y es degradada por mitofagia ³⁸.

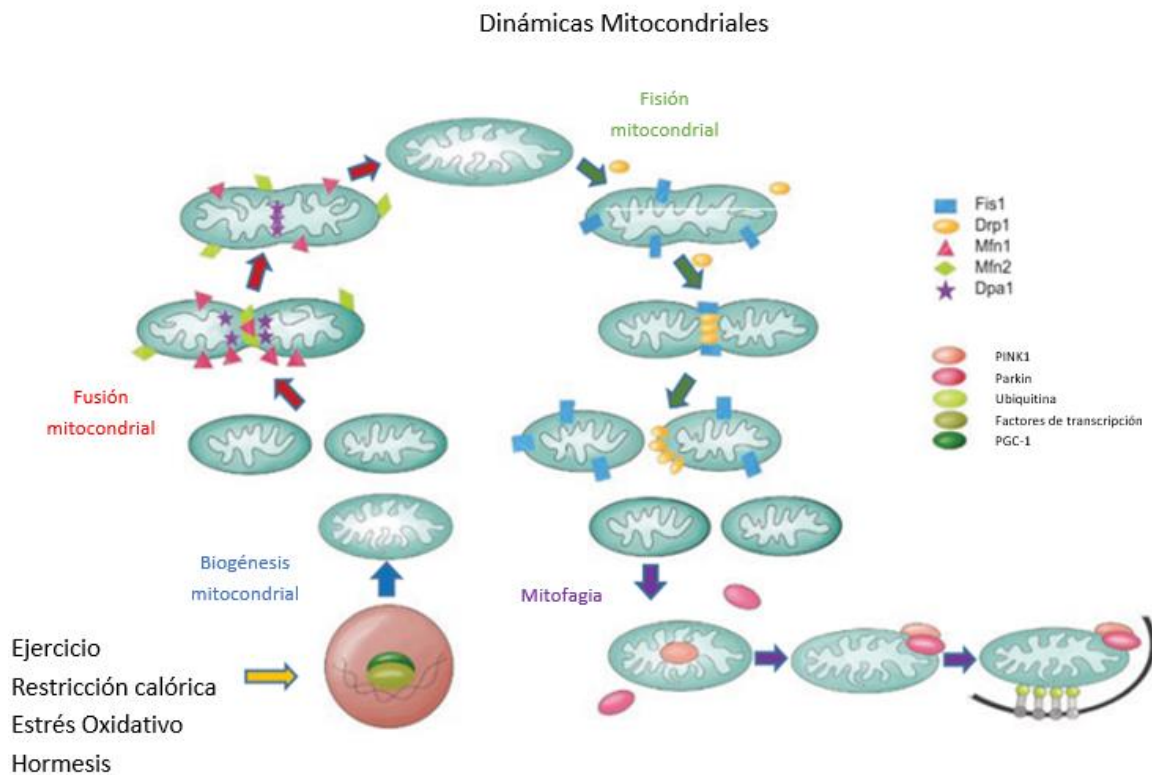


Figura 5. Dinámicas mitocondriales. (Imagen modificada de Alarcón A. et al 2019)

Nuestro grupo ha demostrado que las alteraciones mitocondriales pueden producir y ser debidas a un desequilibrio en la homeostasis oxidativa neuronal, tal y como observamos en el modelo oxidativo mitocondrial inducido por VitK3 y MPP⁺ ^{11 39}.

En condiciones normales, las mitocondrias se distribuyen con preferencia por aquellas áreas dónde hay un mayor requerimiento energético como en el espacio pre/postsináptico y en el axón dónde sirven como reguladores de calcio y para mantener el grado de polarización necesario para transmitir el potencial de acción ⁴⁰.

Cuando se establece un desequilibrio en la homeostasis oxidativa en las enfermedades neurodegenerativas, las mitocondrias se mantienen cercanas al núcleo sin alcanzar las zonas periféricas. Además, las mitocondrias dañadas son transportadas al cuerpo celular, dónde los lisosomas y otros orgánulos necesarios para la degradación mitocondrial son más abundantes ⁴¹.

3. NEURODEGENERACIÓN

En el cuerpo humano existe un equilibrio oxido-reducción constante entre la producción de pro-oxidantes derivados del metabolismo celular y los sistemas defensivos antioxidantes. Este equilibrio se rompe en enfermedades neurodegenerativas como la EM, la EH, la EP o la EA, por un aumento en el acúmulo de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que no son compensados por los sistemas antioxidantes, estableciéndose una situación denominada estrés oxidativo, desequilibrio en la homeostasis oxidativa o distrés oxidativo ⁴².

En condiciones normales, la producción de ROS es capaz de tamponarse por los sistemas defensivos antioxidantes, pero cuando la producción de ROS es excesiva o los sistemas defensivos fallan, puede tener consecuencias como aumento de la concentración de calcio intracelular, daño del ADN, daño a los transportadores de membrana, y en última instancia neurodegeneración y muerte celular ²⁶.

3.1 Radicales libres y especies reactivas

Los radicales libres (RL) son moléculas altamente reactivas debido a que contienen un electrón no apareado, permitiéndoles reaccionar con otras moléculas transformándolas en reactivas y generando una reacción en cadena que causa daño oxidativo.

Las especies reactivas se forman como producto del metabolismo de los radicales libres y son moléculas altamente oxidantes, por tanto, dañinas para las células. Destacamos principalmente las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de hierro (RIS), las especies reactivas de cobre (RCS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS).

3.2 Sistemas de producción de ROS/RNS

Entendemos por ROS, una o más moléculas derivadas de la captación de un electrón por el oxígeno, quedando el electrón en un orbital desapareado. La captación de un electrón por el O_2 produce anión superóxido (O_2^-); la captación de dos electrones más junto con dos protones H^+ por el O_2^- produce H_2O_2 (peróxido de hidrógeno); este peróxido de hidrógeno puede captar un electrón más, generando OH (radical hidroxilo) y OH^- (ion hidroxilo). Finalmente, si este radical hidroxilo capta un electrón junto con H^+ , generará H_2O (agua), como podemos observar en la figura 6. En general, son ROS el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo ²⁶.

La formación de ROS/RNS varía entre células y tejidos, pero el primer paso es común a todos, la generación de O_2^- .

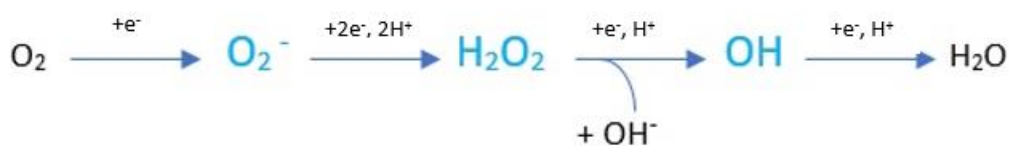


Figura 6. Proceso de generación de ROS mediante la captación de protones y electrones.

En todos los procesos metabólicos celulares se liberan ciertas cantidades de radicales libres, pero parece ser que la principal fuente de ROS es la cadena transportadora de electrones mitocondrial, que produce ROS como producto secundario del metabolismo energético oxidativo, ya que una pequeña cantidad de electrones (menor al 5%) que fluyen a través de la cadena transportadora de electrones, se escapa y se une al O_2 formando O_2^- ²⁵. A continuación, describiremos los principales mecanismos de obtención de O_2^- y, por lo tanto, el inicio del proceso de formación de especies reactivas.

3.2.1 NADPH oxidasa (NOX):

La NADPH oxidasa (NOX) es una proteína transmembrana que cataliza la reacción de oxidación del NADH o NADPH a NAD^+ o $NADP^+$, utilizando para ello oxígeno molecular y produciendo O_2^- , el cual es liberado al espacio extracelular. Se considera que NOX es un sistema enzimático responsable de ROS en enfermedades como la hipertensión, la aterosclerosis y la diabetes tipo 1 y 2 ⁴³.



3.2.2 Xantina oxidoreductasa (XOR):

La xantina oxidoreductasa es una molibdoflavoenzima citosólica que cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina y ácido úrico. Puede tener 2 formas funcionalmente diferentes: Xantina deshidrogenasa (XDH) que produce NADH y urato y Xantina oxidasa (XO) que origina O_2^- y/o H_2O_2 y urato. La actividad de la XO está aumentada en desórdenes inflamatorios de las vías aéreas, en el daño isquémico por reperfusión, la aterosclerosis, la diabetes y en desórdenes autoinmunes ⁴⁴.

3.2.3 Óxido nítrico sintetasa (NOS)

Familia de enzimas que generan óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina, NADPH y O_2 . Esta familia está formada por varios miembros: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y la NOS inducible (iNOS), todas ellas se localizan en el citosol.

En contraste a estas tres enzimas, la NOS mitocondrial (mtNOS) se localiza en la mitocondria y asegura la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), a partir de NO y O_2^- . Esta enzima puede producir O_2^- cuando se desacopla y este radical libre a su vez se combina con NO originando $ONOO^-$ ⁴⁵.



3.2.4 Oxidación de las catecolaminas

Las catecolaminas como la adrenalina, la noradrenalina, dopamina o la serotonina, son fuentes de radicales libres en el SNC lo que influye en la homeostasis redox neuronal. Su metabolismo mediante la enzima monoamino-oxidasa (MAO), localizada en la membrana mitocondrial externa, produce H_2O_2 y O_2^- ⁴⁶.

Algunos productos derivados de la oxidación de la dopamina como la quinona o semiquinona, son moléculas oxidantes que pueden interaccionar con ciertos componentes celulares como lípidos, proteínas o ADN, alterando su función⁴⁷.

3.2.5 Cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones es una fuente importante de ROS intracelular, la mayoría de las ROS se producen como resultado de la reducción parcial del O_2 formando O_2^- durante el proceso de la fosforilación oxidativa. La producción excesiva de O_2^- y OH, puede causar un daño irreparable en el ADN mitocondrial, lo que conlleva un defecto en el complejo I (NADH deshidrogenasa) o III (ubiquinol-citocromo C reductasa) incrementando la formación de O_2^- ⁴⁸.

El complejo I produce O_2^- cuando la razón $NADH/NAD^+$ es alta (originada en condiciones de daño, mutación, isquemia, pérdida de citocromo C o alta concentración de NADH como consecuencia de una baja demanda energética) y en presencia de inhibidores (rotenona) que interaccionan en el lugar de unión de la ubiquinona en el complejo, ocasionando un incremento en la generación de radicales libres, provocando un déficit de energía en la fosforilación oxidativa y un aumento del daño oxidativo ⁴⁹.

La producción de O_2^- en el complejo II por la succinato deshidrogenasa se asocia a una pérdida de electrones derivada de mutaciones. Además, en condiciones de baja concentración de succinato puede producirse la pérdida de electrones y la formación de O_2^- ⁵⁰.

En el complejo III se lleva a cabo la oxidación de ubiquinol en ubiquinona cediendo sus electrones al citocromo C, a través de un intermediario inestable denominado semiquinona. La producción de O_2^- por este complejo ocurre cuando el centro de reducción se encuentra inhibido y en presencia de ubiquinol, interaccionando el O_2 con la semiquinona. La liberación de O_2^- se produce tanto al espacio intermembrana como hacia la matriz mitocondrial como podemos observar en la figura 7 ⁵¹.

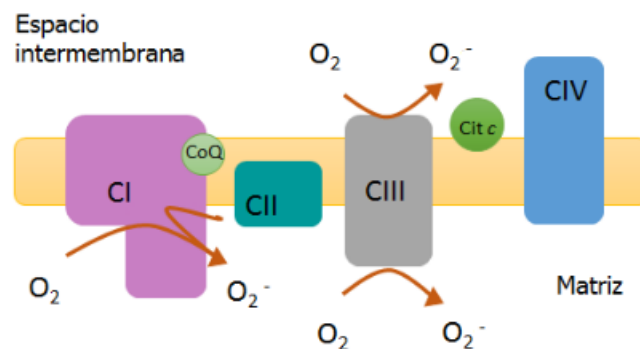


Figura 7. Formación de O_2^- en los complejos I, II y III de la cadena transportadora de electrones. (Bolaños J. et al 2015)

Varias enfermedades como el cáncer, isquemia o diabetes han sido relacionadas con una disfunción del complejo IV, además de la neurodegeneración provocada por la sobreproducción de O_2^- .

3.3 Sistemas de defensa antioxidante

Un antioxidante es cualquier sustancia que en bajas concentraciones es capaz de retrasar o inhibir una oxidación. Estos antioxidantes pueden actuar disminuyendo la concentración de oxidantes, uniéndose a iones metálicos evitando la formación de especies reactivas, disminuyendo la reactividad de los peróxidos o evitando el inicio de la reacción en cadena al “barrer” los primeros radicales libres que se forman^{52 53}.

Cuando existe una sobreproducción de ROS/RNS junto con un fallo de los sistemas enzimáticos antioxidantes se produce un daño de las estructuras celulares, lípidos, proteínas y material genético como ADN/ARN. Además, el efecto de estas especies reactivas sobre la mitocondria y sus procesos metabólicos provoca un aumento de los niveles de ROS/RNS, lo que conlleva una oxidación de las proteínas mitocondriales, lípidos y ADN⁸.

Los principales sistemas antioxidantes son:

3.3.1 Sistemas enzimáticos

Las enzimas de degradación endógenas son principalmente la superóxido dismutasa (SOD), las catalasas (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), mostradas en la figura 8. Existe además un sistema denominado sistema Tiorredoxina (Trx) que no actúa sobre las especies reactivas, pero sí sobre algunas moléculas oxidadas.

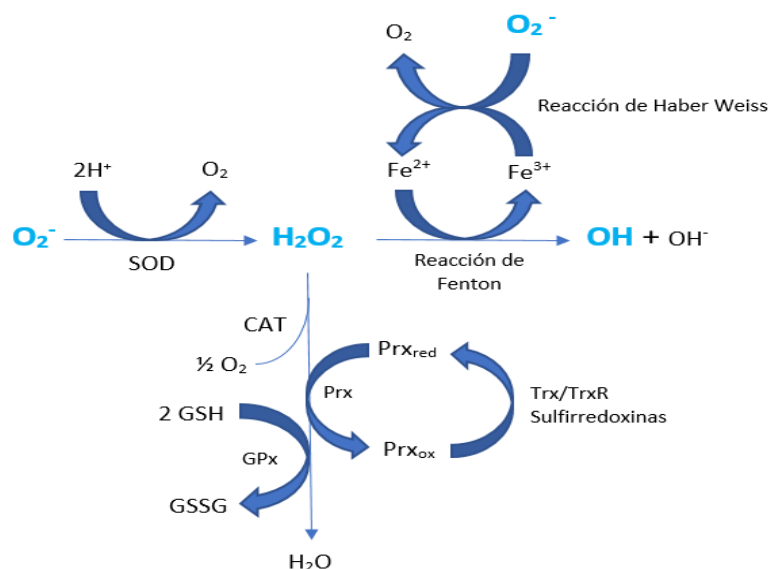


Figura 8. Esquema sistemas enzimáticos antioxidantes y reacciones que catalizan.

3.3.1.1 Superóxido dismutasa (SOD):

Enzima que cataliza la reducción del O_2^- a H_2O_2 , el cual es fácilmente metabolizado a agua por la GPX y la CAT. Existen tres formas de SOD, con cobre-zinc (Cu-Zn-SOD o SOD1) localizada en el citosol, con manganeso (Mn-SOD o SOD2) localizada en la matriz mitocondrial y superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD o SOD3).

Una vez formado el H_2O_2 , se descompone dada su inestabilidad, en presencia de altas concentraciones de metales reducidos (Fe^{2+} , Cu^+), generando OH y OH^- por las reacciones de Fenton o de Haber-Weiss (en las que interviene el O_2). No obstante, estas reacciones compiten con otros mecanismos enzimáticos que anulan el H_2O_2 mediante su reducción a H_2O . Estas enzimas son la CAT, las peroxirredoxinas (Prxs) y la GPX ⁵².

3.3.1.2 Glutación peroxidasa (GPX):

Existen cinco isoformas de esta enzima, todas son capaces de reducir el H_2O_2 . El H_2O_2 reacciona con el grupo (-SeH) de la selenocisteína en el centro activo de la GPX generando un selenio oxidado (-SeOH), que se reduce por dos moléculas de glutatión (GSH). La reacción requiere la desprotonización de la selenocisteína generando disulfuro de glutatión (GSSG), garantizando la eliminación de H_2O_2 .

La GSSG se reduce de nuevo a GSH gracias a una molécula de NADPH que cede sus electrones, esta reacción es catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR), formándose así un ciclo redox ⁵⁴.

3.3.1.3 Catalasas (CAT):

La CAT es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios, cuya función principal es catalizar la dismutación del H_2O_2 en oxígeno y agua. Existen tres familias de CAT, dos de ellas contienen el grupo hemo denominadas CAT monofuncionales y bifuncionales, y la tercera familia la conforman las CAT de manganeso (pseudocatalasas) que no contienen grupo hemo y poseen manganeso en el centro activo ⁵⁵.

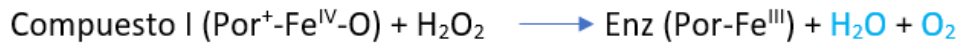
La mayoría de los organismos aerobios tienen CAT monofuncionales con una estructura homotetramérica que posee un grupo hemo, el cual contiene un átomo de hierro y un

anillo de porfirina, formando el centro activo catalítico de la enzima. El proceso de degradación de H_2O_2 consta de dos etapas tanto en las CAT monofuncionales como bifuncionales, ya que ambas poseen grupo hemo ⁵⁶:

1. En primer lugar, una molécula de H_2O_2 oxida al hierro del grupo hemo formando el compuesto I que se caracteriza por tener un grupo ferroxilo con Fe^{IV} y un radical catiónico de porfirina. En esta primera reacción se produce una molécula de agua.



2. En segundo lugar, una segunda molécula de H_2O_2 se utiliza como reductor del compuesto I, regresando la catalasa a su estado inicial, dando como resultado una segunda molécula de agua y oxígeno.



La CAT y la GPX se encargan de eliminar el H_2O_2 y su localización celular también es similar, sin embargo, sus mecanismos de regulación son diferentes. La GPX se encuentra formando parte de un sistema antioxidante diferente de la CAT. Se ha podido observar que ambos sistemas antioxidantes no actúan a la vez, ya que el sistema GPX actúa en concentraciones bajas de H_2O_2 dado que su afinidad por el sustrato es alta, mientras que el sistema antioxidante CAT tiene una afinidad por el sustrato baja aunque su efectividad es muy alta por lo que actúa en concentraciones altas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas ⁵⁷ ⁵⁸. Se localizan principalmente en los peroxisomas de la mayoría de las células del cerebro y se ha demostrado cambios en los niveles de las CAT en procesos neurodegenerativos como la EM, la EA o la EP ⁵⁹.

3.3.1.4 Sistema Tiorredoxina (Trx/TrxR)

Las Trx son proteínas que actúan como antioxidantes facilitando la reducción de otras proteínas. Se mantienen en estado reducido por la tiorredoxina reductasa (TrxR), es una relación dependiente de NADPH.

El sistema tiorredoxina está compuesto por Trx, TrxR y el NADPH, y participan junto a las peroxirredoxinas (Prx) en el proceso de reducción de H_2O_2 para formar agua ⁶⁰.

3.3.2 Sistema no enzimático

El sistema antioxidante no enzimático está integrado por una serie de sustancias como el glutatión reducido (GSH), la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A (β -caroteno), ácido úrico y coenzima Q entre otros ⁶¹. Estas sustancias cuando están en presencia de compuestos oxidables como el ADN, proteínas o lípidos, se oxidan antes que éstos, retrasando, amortiguando, previniendo o inhibiendo su oxidación y, por lo tanto, la formación de radicales libres.

3.4 Daño oxidativo neuronal

Una situación de estrés oxidativo, induce en la neurona efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual conlleva a un acúmulo de agregados intracelulares, una disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis intrínseca. Las enfermedades neurodegenerativas tienen en común este daño oxidativo, pero se desconoce si contribuye iniciando el proceso neurodegenerativo o es una consecuencia del mismo ⁶².

Durante un desequilibrio en la homeostasis oxidativa neuronal, como es el caso de las enfermedades neurodegenerativas, pueden producirse alteraciones en las estructuras de algunas proteínas formándose agregados proteínicos induciendo daño oxidativo. Este defecto es típico en la EA, en la cual, los acúmulos de β -amiloide pueden producir un daño oxidativo, provocando la entrada masiva de Ca^{2+} y la activación de caspasas que llevan a la muerte celular por apoptosis intrínseca ⁶³.

Otro de los efectos del estrés oxidativo es la peroxidación o degradación lipídica por oxidación que puede causar disfunción y muerte neuronal. En cambio, la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, inician un deterioro progresivo de las funciones de membrana provocando una disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y un aumento de la permeabilidad de la membrana.

3.4.1 Procesos inflamatorios: activación de la microglía

Las células de la microglía son células inmunoefectoras que suelen activarse antes de que ocurran daños notables en otras células. Suelen estar destinadas a funciones de protección y reparación, pero cuando son activadas por procesos que generan daño oxidativo, comienzan a liberar citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF- α), glutamato, aspartato y productos citotóxicos como ROS (H_2O_2 y NO) produciendo daño en los axones y pudiendo provocar muerte neuronal ⁶⁴.

El aumento excesivo de H_2O_2 y NO inhibe la respiración mitocondrial, provocando la liberación de glutamato que activan una serie de receptores que provocan la entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas, llevando a las células a una muerte celular regulada.

3.4.2 Aumento de los niveles de calcio intracelular

Un aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular como consecuencia del proceso inflamatorio explicado anteriormente, activa la liberación de neurotransmisores, pero cuando esos niveles se mantienen en el tiempo, también se activan proteasas, lipasas y endonucleasas.

Las proteasas dependientes de Ca^{2+} pueden dañar al citoesqueleto y a las proteínas de membrana, las lipasas catalizan la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana y las endonucleasas provocan la fragmentación del ADN, por lo tanto, el aumento mantenido en el tiempo de los niveles de Ca^{2+} conlleva a una serie de procesos cuyo final es la muerte neuronal ⁶⁵.

El aumento de Ca^{2+} intracelular estimula la activación de NOS y la conversión de xantina deshidrogenasa (XDH) en xantina oxidasa (XO) que origina O_2^- y/o H_2O_2 y urato como ya explicamos en los procesos de formación de ROS ⁴⁴.

La entrada masiva de Ca^{2+} en la mitocondria provoca la formación del poro de transición en la membrana mitocondrial interna o poro de transición en la permeabilidad mitocondrial (MPT), lo que conlleva un colapso en el potencial electroquímico de protones, disminuyendo la producción de ATP y provocando la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más Ca^{2+} . Este proceso en la mitocondria deriva en la pérdida de la función neuronal al no disponer de la suficiente reserva energética pudiendo provocar la muerte neuronal ^{66 67}.

3.4.3 Disfunción mitocondrial y déficit energético

Las similitudes en los patrones de daño axonal entre las lesiones de enfermedades neurodegenerativas y las lesiones en la materia blanca tras un ictus, sugieren que la hipoxia o la deficiencia de energía tienen un papel importante en los mecanismos subyacentes en las enfermedades neurodegenerativas ⁶⁸.

El estrés oxidativo neuronal es causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de la neurona de neutralizar rápidamente los reactivos intermedios y/o reparar el daño resultante. Este desequilibrio permite la acumulación de ROS que provocan la disfunción mitocondrial a través de varios mecanismos ⁶⁹:

- Interrumpen la función de las enzimas mitocondriales, modifican las proteínas y aceleran su degradación.
- Interfieren en la síntesis de componentes de la cadena respiratoria.
- Pueden inducir directamente daño en el ADN.

Esta disfunción mitocondrial daría lugar a un déficit de oxígeno y energía, provocando consecuencias en los axones y en las células nucleadas, como los oligodendrocitos, de los pacientes con enfermedades neurodegenerativas, tal y como podemos observar en la figura 9 ⁷⁰.

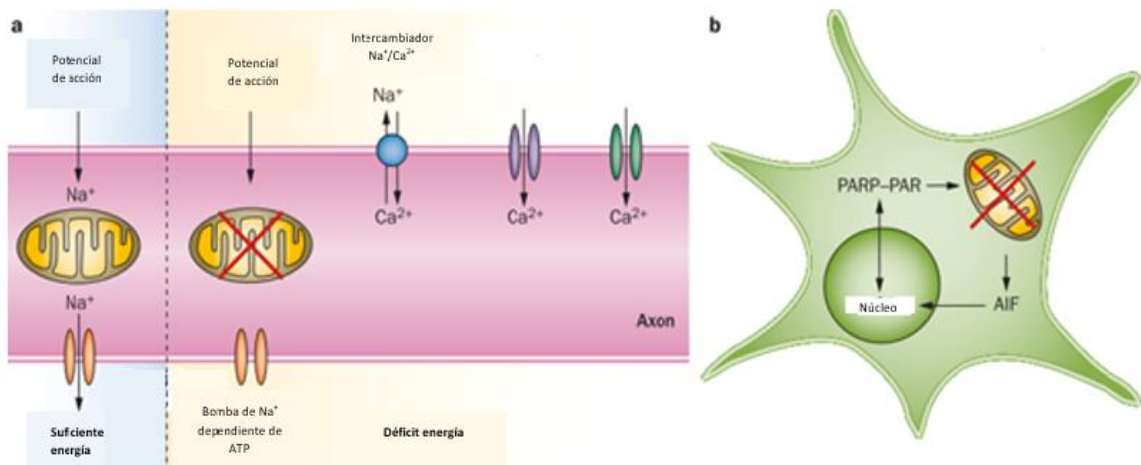


Figura 9. Las diferentes consecuencias del daño mitocondrial en pacientes con enfermedades neurodegenerativas. (Imagen modificada de D. A. Bechtold et al. 2006)

3.4.3.1 Daño axonal

La figura 9a representa cómo el déficit energético puede inducir un desequilibrio iónico con un acúmulo de iones Ca^{2+} , lo que conlleva a una interrupción en el transporte rápido y una degeneración axonal ⁷⁰.

En condiciones normales, los iones Na^+ entran en el axón durante un potencial de acción y son eliminados por la repolarización a través de ATPasa. Sin embargo, en condiciones de deficiencia energética y disfunción mitocondrial, la ATPasa no funciona adecuadamente y el Na^+ que se acumula en el axón es eliminado mediante el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que hace que la concentración de Ca^{2+} intracelular aumente considerablemente y se disparen los mecanismos de daño comentados anteriormente.

Más iones de Ca^{2+} entran en el axón por los receptores de glutamato y los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje que se encuentran en el axolema. El acúmulo de Ca^{2+} activa la calpaina (proteasa), que disuelve las proteínas intra-axonales, incluyendo proteínas del citoesqueleto que son importantes para el transporte axonal rápido, provocando su degeneración ⁷⁰.

3.4.3.2 Daño en oligodendrocitos

El daño mitocondrial de las células nucleadas, como los oligodendrocitos, provoca la liberación de un factor de inducción de la apoptosis (AIF) que se transloca al núcleo e induce daño en el ADN, tal y como se representa en la figura 9b.

Este daño provoca la activación de PARP-PAR (poli ADP ribosa polimerasa) que intenta repararlo, aumentando el déficit energético (PARP-PAR agota los depósitos celulares de NAD^+ que se requieren como sustrato para la generación de los monómeros de ADP-ribosa) y, por último, provocando la apoptosis intrínseca ⁷¹.

La presencia de radicales libres derivados de la disfunción mitocondrial y del estrés oxidativo impulsado por la inflamación junto con la presencia de iones metálicos, catalizan la formación de radicales tóxicos OH^\cdot a partir de H_2O_2 provocando daño oxidativo y neurodegeneración (figura 10) ⁶⁵.

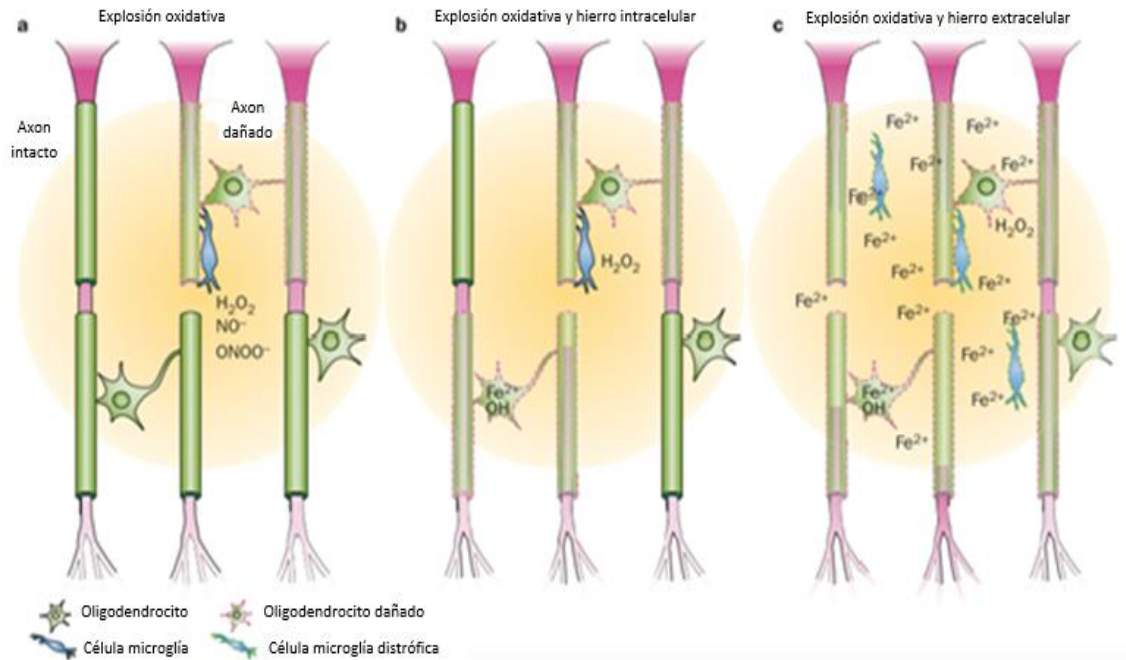


Figura 10. Esquema del daño producido por la reacción oxidativa en enfermedades neurodegenerativas (Imagen modificada de H. Lassmann et al 2012).

Los macrófagos activados y la microglia producen H_2O_2 como consecuencia del inicio del proceso oxidativo. Esta liberación de H_2O_2 en combinación con los radicales libres llevan a la destrucción de axones y oligodendrocitos (daño limitado en ausencia de Fe^{2+}), tal y como podemos observar en la figura 10a.

En presencia de Fe^{2+} acumulado en los oligodendrocitos (conforme aumenta la edad del paciente aumenta este acumulo de hierro en el cerebro) junto con el H_2O_2 produce radicales OH^\bullet altamente tóxicos provocando la muerte celular. Este acumulo de hierro explica porque la mielina y los oligodendrocitos son destruidos de manera selectiva bajo estrés oxidativo, mientras que los astrocitos que no tienen este acúmulo, permanecen intactos (figura 10b).

Este Fe^{2+} liberado al espacio extracelular por la apoptosis intrínseca de los oligodendrocitos, es captado por la microglia que se vuelve distrófica liberando una segunda oleada de Fe^{2+} lo que conlleva un aumento de la lesión destructiva (figura 10c).

3.4.4 Excitotoxicidad

El glutamato es un neurotransmisor en el SNC y es el mediador de la mayoría de señales excitatorias. La neurotransmisión glutamatérgica está implicada en procesos cognitivos, motores, sensoriales y actividades autónomas. El equilibrio entre las señales excitatorias e inhibitorias es crucial para el correcto mantenimiento de estas funciones.

El glutamato se libera continuamente por las neuronas a la hendidura sináptica donde se une a los receptores tanto ionotrópicos (NMDA, kainato o AMPA) como metabotrópicos para transmitir el mensaje excitatorio. La acumulación de glutamato en la hendidura sináptica es tóxica y conlleva la muerte celular por apoptosis intrínseca debido a la sobrecarga de Ca^{2+} tras la sobreestimulación de los receptores de glutamato. Esta sobreestimulación de los receptores genera excitotoxicidad ⁷².

La activación excesiva de los receptores NMDA lleva a la liberación de H_2O_2 y de NO^- , los cuales juegan un papel importante en el proceso ya que regulan la liberación de glutamato, por lo tanto, el estrés oxidativo es un mediador en la muerte neuronal por excitotoxicidad⁷³. La alteración en la homeostasis del glutamato tiene importantes consecuencias neuropatológicas y ha sido relacionado con numerosas enfermedades neurodegenerativas ⁷⁴.

3.4.5 Muerte celular regulada

Las dos principales formas de muerte celular regulada propiciadas por un acúmulo excesivo de radicales libres son la apoptosis intrínseca y la necrosis impulsada por MPT ⁷⁵.

La apoptosis intrínseca es un proceso activo que involucra la muerte celular sin inflamación y se caracteriza por cambios morfológicos como condensación de cromatina, ribosomas desprendidos del retículo endoplasmático rugoso y fragmentación celular en cuerpos apoptóticos que finalmente son fagocitados. Los ROS pueden inducir apoptosis intrínseca por medio de la activación de las caspasas, de genes apoptóticos o las enzimas líticas ⁷⁶.

Sin embargo, la necrosis impulsada por MPT es un fenómeno pasivo que se presenta como consecuencia de una agresión y que conlleva un exceso del flujo de Ca^{2+} .

Normalmente aparece una inflamación aguda con edema mitocondrial, reducción importante de la formación de ATP, liberación de hidrolasas, ruptura lisosomal y fragmentación de ADN por endonucleasas. El daño oxidativo puede inducir a una muerte neuronal por necrosis impulsada por MPT que implica pérdida en la regulación de las funciones neuronales por un déficit de ATP, lo cual impide el correcto funcionamiento de las bombas de Na^+/K^+ provocando un edema neuronal irreversible ⁷⁷.

3.5 ROS y enfermedades neurodegenerativas

Las mitocondrias generan altas cantidades de ROS, como hemos visto en los apartados anteriores, y/o son dianas de los radicales libres en la etiopatogenia de las principales enfermedades neurodegenerativas ⁴⁸. En la mayoría de los casos, la sobreproducción de ROS o un fallo en los sistemas defensivos antioxidantes conllevan a un daño oxidativo de diferentes moléculas provocando una alteración en la regulación de las funciones de las que son responsables, pudiendo iniciar el proceso de muerte celular regulada.

Un aumento de ROS, aunque sea en pequeñas cantidades, requiere de una actividad mayor de los sistemas antioxidantes, cuyo mantenimiento requiere mayores cantidades de energía. En aquellas situaciones en las que la producción de energía se encuentra limitada, como en las enfermedades neurodegenerativas, existe una menor disponibilidad de los sustratos para realizar las funciones mitocondriales normales. Se ha visto que existe una relación entre la disfunción mitocondrial y producción de ROS en las principales enfermedades neurodegenerativas como la EA, la EP, la ELA y la EH ⁴⁸.

3.5.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de la capacidad cognitiva, asociada a insuficiencias en la señalización colinérgica y atrofia cerebral en zonas específicas debido principalmente a una acumulación de β -amiloide (A β) y a ovillos neurofibrilares intracelulares (formados por agregados Tau) ⁷⁸.

Esta acumulación de A β favorece el estrés oxidativo, una disfunción mitocondrial y un fallo energético, ya que puede reducir la respiración mitocondrial en neuronas y astrocitos mediante la inhibición de los complejos I y IV de la cadena transportadora de electrones. El déficit energético contribuiría a un defecto en la remoción de los

agregados de A β , agravando el problema y llevando a una disfunción y muerte neuronal⁷⁹.

Además, el A β afecta a las dinámicas mitocondriales especialmente a la fusión y la fisión mitocondrial, y produce excitotoxicidad por la excesiva liberación de glutamato que conlleva la formación de NO que interacciona con el O $_2^-$ formando ONOO $^-$, incrementando el daño oxidativo y nitrosativo⁶³. En este sentido, se ha visto que uno de los principales antioxidantes no enzimáticos, la vitamina E, es capaz de inhibir o disminuir el daño inducido por acúmulo de A β ⁸⁰.

3.5.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra disminuyendo el control muscular.

Los pacientes con EP poseen una actividad reducida del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial en las neuronas del SNC, lo que implicaría una mayor formación de ROS, un aumento del daño oxidativo y una disminución en la capacidad mitocondrial de cumplir con los requerimientos energéticos neuronales⁸¹.

Este daño oxidativo junto con la disfunción mitocondrial contribuye a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, cuya relación está respaldada por el hallazgo de que los inhibidores del complejo I pueden ejercer efectos citotóxicos en las neuronas dopaminérgicas derivando en el fenotipo clínico del Parkinson⁸².

En los casos de EP familiar se ha descrito una mutación genética en una proteína denominada PINK1. Esta proteína es una quinasa mitocondrial y se ha demostrado que la deficiencia de PINK1 da como resultado una disminución en la respiración con inhibición del complejo I, aumentando la producción de ROS⁸³.

La excesiva producción de ROS mitocondrial en los pacientes con EP provoca un daño en el ADN que activa la enzima reparadora de ADN (PARP) induciendo una limitación energética neuronal debido al consumo de NAD $^+$ ⁸⁴.

3.5.3 Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una pérdida progresiva de las neuronas motoras a nivel de la médula y corteza espinal, lo que conlleva a una parálisis progresiva y a una muerte prematura.

Existen numerosas evidencias acerca de la asociación del estrés oxidativo y ELA, como el hallazgo de marcadores de la oxidación de proteínas y lípidos en las neuronas motoras, la presencia de astrocitos reactivos y macrófagos/microglía en el neuropilo de la sustancia gris de pacientes con ELA que carecían de control de la médula espinal y niveles elevados de 8-hydroxy-2'-deoxiguanosina derivados del daño oxidativo al ADN en toda la médula espinal cervical ⁸⁵.

El estrés oxidativo mitocondrial en la forma familiar de ELA está relacionado con una mutación en la superóxido dismutasa 1 (SOD1), afectando a la liberación de transmisores sinápticos. Se produce un desequilibrio en los niveles de Ca^{2+} y una disfunción mitocondrial ⁸⁶.

3.5.4 Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington (EH) es causada por un defecto genético en el cromosoma 4, el cual hace que una parte del ADN aparezca muchas más veces de las debidas. El defecto se denomina repetición CAG del gen que codifica la proteína huntingtina, normalmente esta sección del ADN se repite de 10 a 28 veces, pero en personas con EH se repite de 36 a 120 veces. A medida que el gen se transmite de padres a hijos, el número de repeticiones tiende a ser más grande, y la probabilidad de que los síntomas aparezcan a una edad más temprana aumentan ⁷⁸.

Como consecuencia de la mutación se producen proteínas que forman agregados, causando la pérdida de las neuronas de la espina dorsal media y del núcleo caudado, afectando a otras regiones cerebrales conforme avanza la enfermedad. La EH evoluciona con una discapacidad motora, disminución de la capacidad cognitiva y cambios de personalidad ⁷⁸.

La EH como otras enfermedades neurodegenerativas se caracteriza por un incremento en el estrés oxidativo, neuroinflamación y disfunción mitocondrial, detectándose baja actividad de los complejos II y III de la cadena transportadora de electrones, disminución

en el número y tamaño de las mitocondrias, déficit en la respiración y producción de ATP, alta fragmentación mitocondrial y fallos en la mitofagia, generándose un estado incompatible con la supervivencia neuronal ⁸⁷. Además, se ha descubierto que los pacientes con EH poseen unos niveles elevados de enzimas antioxidantes como SOD, GPX y CAT ⁸⁸.

HIPÓTESIS

Fingolimod fosfato tiene un mecanismo de acción conocido y aceptado en el tratamiento de la esclerosis múltiple, que está basado en su efecto inmunomodulador tras la interacción con los receptores S1P y cuyo efecto final se centra en un secuestro funcional de los linfocitos T en los ganglios linfáticos ⁶.

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, sobre todo en estadios finales, se observa una notable disfunción mitocondrial, hasta el extremo de haberse sugerido el agrupar estas enfermedades como mitocondriopatías ⁸. En estas situaciones neuronales extremas, las mitocondrias dañadas son incapaces de cubrir las demandas energéticas y el entorno se vuelve perjudicial para las células.

En base a resultados previos de nuestro grupo, nuestra hipótesis es que además del efecto inmunomodulador, Fingolimod actuaría como neuroprotector en cultivos neuronales, probablemente a través de mecanismos antioxidantes, protegiendo la mitocondria y regulando el metabolismo de la glucosa.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Demostrar el efecto neuroprotector de FP en cultivos neuronales en un modelo de daño neuronal inducido por menadiona

Objetivos específicos:

- Demostrar el efecto antioxidante de FP en cultivos neuronales en este modelo.
- Demostrar el efecto de FP sobre la expresión de enzimas antioxidantes en este modelo.
- Demostrar el efecto de FP sobre la glucólisis en este modelo.
- Demostrar el efecto de FP sobre la vía de las pentosas fosfato en este modelo.
- Demostrar el efecto de FP sobre el metabolismo oxidativo mitocondrial en este modelo.
- Demostrar la implicación de los receptores S1P en estos efectos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Cultivo celular y tratamientos*

Todos los experimentos de este trabajo se han realizado sobre neuronas de la línea celular dopaminérgica SN4741 (RRID: CVCL_S466) derivada de la sustancia negra de ratón (gentilmente cedidas por el Dr. Ernest Arenas, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia). Con el fin de obtener un control más estricto de la concentración de FP en los medios de cultivo, en este trabajo hemos utilizado en todos los experimentos el metabolito activo FP amablemente proporcionado por Novartis Pharmaceutical, en lugar del profármaco.

Las neuronas fueron cultivadas en D-MEM high glucose suplementado con un 10% de FCS, penicilina-estreptomicina (10.000 U/mL y 10.000 µg/mL respectivamente), y L-glutamina (2mM) (Fisher Scientific SL, Madrid, Spain). Las neuronas se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ hasta aproximadamente un 70-80% de confluencia. Los cultivos se realizaron en placas de 100 mm² (5x10⁶ células) o placas de 35 mm² con fondo de vidrio y placas de 6 pocillos (2x10⁵ células cada una) y se trataron con 5 µM de VitK3 (menadiona, CAS nº 58-27-5. Sigma, Madrid, España), en ausencia o presencia de 50 nM FP. Con el objeto de determinar la influencia del receptor de S1P en los posibles efectos de FP, en algunos experimentos se incluyó el antagonista de este receptor W123 10 µM (nº CAS 1345982-24-2. Cayman Chemicals, Michigan, EE. UU.), en las incubaciones con Vitk3 y FP.

VitK3 es una vitamina liposoluble que induce un daño oxidativo al ADN mitocondrial activando de manera excesiva la Poli ADP-ribosa polimerasa (PARP) para reparar el ADN agotando los depósitos celulares de NAD⁺ que se requieren como sustrato para la generación de los monómeros de ADP-ribosa, induciendo un agotamiento progresivo de ATP puesto que se inhibe la oxidación de la glucosa ³¹.

Los tratamientos se realizaron en solución de Locke modificada (137 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 25 mM glucosa, 10 mM HEPES, pH: 7,4) suplementado con penicilina-estreptomicina y L-glutamina a las mismas concentraciones mencionadas anteriormente, durante 2 horas a 37°C. En algunos experimentos (tasa de acidificación

extracelular (ECAR) y tasa de consumo de oxígeno (OCR)) se prolongó el tiempo de incubación durante cuatro horas más.

Para la medición de ECAR, se recubrieron previamente placas y cubreobjetos con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de poli-D-lisina. Se realizaron experimentos adicionales para evaluar el efecto de FP en la recuperación del daño de VitK3. En estos experimentos, después de 2h de incubación con Vitk3, se cambió el tampón por: sólo tampón (en células de control) o tampón con FP 50 nM (células tratadas) y lo mismo, pero en presencia de 10 μM de W123 para determinar la contribución del receptor S1P en esta recuperación. Las mediciones se realizaron durante 4 horas adicionales.

2. Viabilidad Celular

La viabilidad celular se determinó cuantificando la liberación de la enzima intracelular lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27)⁸⁹. Los niveles de LDH se midieron en sobrenadantes de cultivo libres de células utilizando un kit comercial de ensayo espectrofotométrico (Randox Laboratories Ltd., Reino Unido) adaptado a un autoanalizador Cobas Mira (ABX Diagnostics, Francia). Los resultados se expresan como el porcentaje de LDH liberada en el medio en relación con la LDH total (medio y células lisadas con Triton XTM-100).

3. Proteómica

Para los experimentos de proteómica, se disolvieron 100 μg de proteínas de cada muestra en tampón bicarbonato de amonio (AMBIC) 25 mM (pH 8,0) y se incorporaron a una matriz de gel de poliacrilamida sin electroforesis como se ha descrito previamente⁹⁰. Brevemente, se hizo un gel de poliacrilamida de 20 μl como se describe a continuación. Se mezclaron 14 μl de la solución proteica, 5 μl de solución de acrilamida (40%, 29:1), 0,7 μl de persulfato de amonio al 1% y 0,3 μl de TEMED y se transfirieron inmediatamente a un pequeño tubo de vidrio. La reacción de polimerización se llevó a cabo durante 20 min a temperatura ambiente. El gel se cortó en trozos pequeños, y se lavó con AMBIC 25 mM que contenía 50% de ACN durante 15 min tres veces con agitación. Después de secarse en un evaporador de vacío, los trozos de gel se sometieron al protocolo estándar de digestión en gel descrito anteriormente⁹¹.

Para el análisis LC-MS/MS y la bioinformática, las muestras se acidificaron con 1 μ l de una solución de ácido fórmico (FA) al 5% y se secaron en un evaporador de vacío. Posteriormente, los péptidos se resuspendieron en 30 μ l de una solución de FA:acetonitrilo (98:2) al 1%. Los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF Accurate (G6520A, Agilent Technologies), controlado por MassHunter (v. B.04.00) y conectado con un cubo CHIP a una nanobomba Agilent 1200.

La separación cromatográfica se realizó en un chip de carga de alta capacidad (Agilent Technologies) con una columna C18 de 75 μ m de diámetro interior, 150 mm y 300 Å, antes de un paso de desalación a través de una columna de atrapamiento de 500 nL. La muestra inyectada (6 μ L) se cargó en la columna de atrapamiento con un flujo de fase 0,1% FA:ACN (98:2) de 4 μ L/min, y después de 3 minutos, la precolumna se cambió en línea con la bomba de nanoflujo (400 nL/min, fase A: agua:ACN:FA 96,9:3:0,1, fase B: ACN:agua:FA 94,5:5:0,1), equilibrada en 3% de B. Los péptidos se eluyeron de la columna mediante el siguiente gradiente: 3-42% de B durante 90 minutos, 42-60% de B en 10', 60-90% de B en 0,1', retención al 90% de B durante 7,9', reequilibrado al 3% de B durante 13', para un tiempo total de ejecución de 125 minutos. Los espectros de MS y MS2 centrados se registraron de 350 a 1700 m/z y de 50 a 1700 m/z, a velocidades de barrido de 6 y 3 Hz, respectivamente.

Para determinar la abundancia de las proteínas, se utilizó un método sin etiquetas basado en el recuento espectral. En particular, utilizamos el índice de abundancia de proteínas modificado exponencialmente (emPAI) para calcular el contenido de proteínas en porcentaje molar⁹².

La Base de Datos para la Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID) proporciona un amplio conjunto de herramientas de anotación funcional para la interpretación biológica de grandes listas de genes. En este trabajo utilizamos DAVID para identificar las vías asociadas a los genes expresados de forma diferencial en los agrupamientos. La denominación de las vías se obtuvo de las bases de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG).

4. Preparación de muestras de proteínas

Para la preparación de la muestra de proteína en los experimentos distintos a la proteómica, las células se suspendieron en tampón que contenía HEPES 10 mM, KCl 10 mM, pH 7.4, un cóctel inhibidor de proteasa e inhibidores de fosfatasa (Sigma, Madrid, España) y se homogeneizaron a 0°C. El ensayo de proteínas de Bradford se utilizó para medir la concentración de proteína total en las muestras ⁹³.

5. Tinción inmunocitoquímica

Las neuronas crecieron sobre portaobjetos en los pozos de cultivo y se fijaron mediante la adición de metanol previamente enfriado a -20°C e incubando la placa a -20°C durante 20 min. Los pocillos se lavaron con PBS, se retiraron los portas y se incubaron con anticuerpo primario Anti-S1P Receptor EDG1 (1:100 v/v) (CAS nº AB_10745373. Sigma, Madrid, España) en PBS/3% BSA/0,02% azida sódica a 4°C durante la noche y luego se incubó con un anticuerpo secundario fluorescente Alexafluor™ 488 (2 gotas/ml) (Fisher Scientific SL, Madrid, España), en PBS/BSA durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Los portas se montaron con Fluoromount™ (Sigma, Madrid, España) y las imágenes se adquirieron con un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51 con un aumento de 40X y se procesaron con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html> NIH, EE.UU accedido por última vez el 29/09/2021).

6. Enzimas antioxidantes

La actividad de la enzima antioxidante se midió espectrofotométricamente usando un autoanalizador Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia) y los diferentes kits comerciales descritos a continuación ⁹⁴.

- La actividad de la SOD (E.C.1.15.1.1) se determinó a 37°C utilizando el kit comercial "Ransod" (Randox, Reino Unido). La actividad de Mn-SOD (SOD2) se diferencia de Cu-Zn-SOD sobre la base de su sensibilidad al cianuro de sodio 3 mM.

- La actividad de la glutatión peroxidasa (CE 1.11.1.9) (GPX) se determinó a 37°C utilizando el kit comercial "Ransel" (Randox, Reino Unido). Una unidad de actividad se definió como la oxidación de 1 μmol de NADPH a NADP/min a 37°C.
- La actividad de catalasa (E.C.1.11.1.6) (CAT) se determinó incubando muestras durante 1 min a 37°C en una solución tampón de fosfato 66 mM, pH 7,4 y 65 μM de H_2O_2 . La reacción se detuvo con 32,4 mM de molibdato de amonio y el complejo de molibdato- H_2O_2 se midió a 405 nm. Una unidad de actividad de la catalasa representó la descomposición de 1 μmol H_2O_2 en 1 min a 37°C.

7. Nitrosilación de proteínas

La nitrosilación de proteínas se midió en un homogeneizado de cultivos neuronales usando el kit comercial OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit; (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se trata de un inmunoensayo enzimático competitivo desarrollado para la rápida detección y cuantificación de la 3-nitrotirosina en muestras de proteínas. La cantidad de 3-nitrotirosina en muestras de proteína se determina comparando su absorbancia con la de una curva estándar conocida de BSA nitrada.

8. Determinación de aldolasa

La actividad de la aldolasa (EC 4.1.2.13) en homogeneizados de células se midió usando un kit de ensayo de Aldolasa (Spinreact SP, Gerona, España) adaptado a un autoanalizador Cobas Mira, siguiendo las instrucciones del proveedor. Este ensayo se basa en la observación de la disminución de la absorbancia a 340 nm provocada por la conversión de NADH en NAD^+ .

9. Tasa de acidificación extracelular (ECAR) y tasa de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR)

La tasa de acidificación extracelular y el OCR se midieron utilizando un analizador Seahorse Bioscience XF24 (Agilent Technologies. Agilent, CA, EE.UU.)^{95 96} en placas específicas de 24 pocillos a 37°C. Las células se sembraron a 2×10^4 células por pocillo

durante 18h antes del análisis y cada condición experimental se realizó en 8 réplicas. Antes de cada medición, las células se lavaron con PBS y se añadieron a cada pocillo 590 μl de medio base Agilent Seahorse XF (sin rojo fenol ni bicarbonato) complementado con 1 mM de piruvato y 25 mM de glucosa. Tras un período de equilibrio de 15 minutos, se realizaron 3 mediciones sucesivas de 2 minutos a intervalos de 3 minutos con mezcla entre mediciones para homogeneizar la concentración de protones en el medio; cada condición se midió en pozos independientes.

Para el estudio de OCR, se utilizaron una serie de toxinas mitocondriales:

- Oligomicina (1 μM), es un macrólido que actúa bloqueando el canal de protones de la ATP sintasa inhibiendo la fosforilación oxidativa.
- Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (0.5 μM), es un agente desacoplante que interrumpe la síntesis de ATP al transportar iones de hidrógeno a través de la membrana celular antes de que puedan ser usados para proporcionar la energía durante el proceso de fosforilación oxidativa.
- Rotenona (0.5 μM) inhibe el complejo I (NADH deshidrogenasa) y la antimicina A (0.5 μM) el complejo III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial interrumpiendo la fosforilación oxidativa.

Los datos de OCR obtenidos en estos experimentos permitieron determinar el consumo de oxígeno debido a:

- (a) Respiración basal: Consumo de oxígeno utilizado para satisfacer la demanda de ATP celular. Muestra la demanda energética de la célula en condiciones basales.
- (b) Producción de ATP: La disminución de la tasa de consumo de oxígeno tras la inyección del inhibidor de la ATP sintasa oligomicina representa la parte de la respiración basal que se estaba utilizando para impulsar la producción de ATP. Muestra el ATP producido por las mitocondrias que contribuye a satisfacer las necesidades energéticas de la célula.



(c) Fuga de protones. Respiración basal restante no acoplada a la producción de ATP. La fuga de protones puede ser un signo de daño mitocondrial o puede utilizarse como mecanismo para regular la producción de ATP mitocondrial.

(d) Respiración máxima: La tasa máxima de consumo de oxígeno alcanzada al añadir el desacoplador FCCP. El FCCP imita una "demanda de energía" fisiológica al estimular la cadena respiratoria para que funcione al máximo de su capacidad, lo que provoca una rápida oxidación de los sustratos (azúcares, grasas y aminoácidos) para hacer frente a este desafío metabólico. Muestra la tasa máxima de respiración que puede alcanzar la célula.

(e) Capacidad respiratoria de reserva: Esta medida indica la capacidad de la célula para responder a una demanda energética, así como lo cerca que está la célula de respirar a su máximo teórico. La capacidad de la célula para responder a la demanda puede ser un indicador de la aptitud o flexibilidad de la célula.

(f) Respiración no mitocondrial: Consumo de oxígeno que persiste debido a un subconjunto de enzimas celulares que siguen consumiendo oxígeno tras la adición de rotenona y antimicina A. Esto es importante para obtener una medida precisa de la respiración mitocondrial.

En los experimentos de ECAR se utilizaron los siguientes tóxicos mitocondriales:

- 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) (100 μ M), para desacoplar la respiración mitocondrial de la síntesis de ATP.
- 2-Deoxy-D-Gucose (2-DG) (100 mM), para inhibir la glucólisis.
- Rotenona (1 μ M), para inhibir NADH hidrogenasa/complejo I.

Los datos de ECAR obtenidos en estos experimentos permitieron determinar la tasa de acidificación extracelular debida a:

- a) La capacidad glucolítica máxima, obtenida tras la incubación con 2,4-DNP y 2-DG más rotenona.
- b) La reserva glucolítica, obtenida como la diferencia entre la capacidad glucolítica máxima y la basal.

En todas las situaciones se restó el ECAR no glucolítico, obtenido tras la adición de rotenona.

Se inyectaron compuestos concentrados (10X) en cada pocillo usando los inyectores internos del cartucho y se realizaron 3 mediciones sucesivas de 2 minutos a intervalos de 3 minutos con mezcla entre mediciones. Las medidas se normalizaron según la concentración de proteína en cada pocillo. Para los experimentos de OCR, se utilizó el kit comercial “Seahorse XF cell mito stress test kit” (Agilent Technologies. Agilent, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los experimentos, los datos se normalizaron con el contenido de proteína en cada pocillo.

10. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA de una vía. Las comparaciones por pares se realizaron utilizando una prueba de comparación múltiple post hoc de Newman-Keuls. Se consideró que la significancia estadística era $p < 0.05$. Para los datos en los que las unidades medidas fueron arbitrarias, los valores respectivos representan el porcentaje relativo al valor de control a menos que se especifique.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (EM), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (EH) o la enfermedad de Alzheimer (EA), se caracterizan por una alteración en la homeostasis oxidativa neuronal y una disfunción mitocondrial, cuya principal repercusión es un déficit de ATP limitando a la neurona en situaciones de alta demanda energética ⁸.

En los últimos años, se han realizado estudios que señalan que el FP posee, aparte del secuestro de linfocitos T en los nódulos linfáticos a través de su interacción con los receptores de la S1P, un efecto neuroprotector que puede promover una mejora en la condición neuronal ⁹⁷. Uno de estos estudios lo realizó nuestro grupo sobre un modelo de daño oxidativo inducido por menadiona (VitK3) en cultivos neuronales en el que se mostraba que este efecto neuroprotector del FP era debido a su capacidad para restaurar el equilibrio oxidativo neuronal al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y recuperar la función y morfología mitocondrial, permitiendo mantener la producción de energía ¹¹.

Para comprobar el efecto neuroprotector de fingolimod en cultivos neuronales, realizamos una serie de experimentos en los que comprobamos la capacidad de diferentes concentraciones de FP para proteger los cultivos neuronales contra la muerte celular inducida por Vitk3, evaluado como viabilidad celular (Figura 11). La dosis elegida en este estudio (50 nM FP) fue la más efectiva para prevenir la muerte celular.

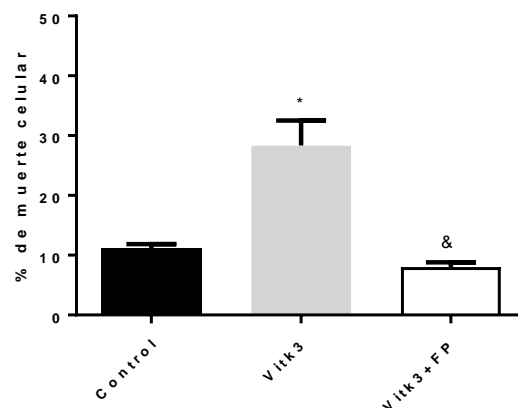


Figura 11. Efecto sobre la viabilidad celular en neuronas tratadas con Vitk3 solo y en presencia de 50 nM de FP. Los valores representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes realizados por triplicado (*p < 0.05 en comparación con las células control, & p < 0.05 en comparación con las células incubadas con Vitk3).

En este modelo, utilizamos la VitK3 que es un tóxico exógeno que produce un daño mitocondrial ligado a un aumento de ROS¹¹ distorsionando estructuras celulares como el retículo endoplásmico, pero también influyendo en importantes vías metabólicas como la glucólisis o la derivación de pentosa⁹⁸. VitK3 interfiere en el ciclo redox de la quinona, desacoplando la cadena respiratoria mitocondrial, desencadenando la liberación de O₂⁻ que, en presencia del Fe del complejo respiratorio, produce un aumento de los radicales libres¹¹; con aumento de la respiración sin aumento de la producción de ATP y disminución de la capacidad respiratoria de reserva (SRC) y de la capacidad respiratoria máxima. Además, el estrés oxidativo también podría activar otras vías metabólicas que podrían contribuir al daño de VitK3⁹⁹.

Para proporcionar una visión global de la composición proteica neuronal, se analizó el perfil proteómico de las neuronas tratadas con VitK3, VitK3+FP y las neuronas control. Las proteínas extraídas de las células no tratadas o tratadas con VK3 o FP+VK3 fueron digeridas y los péptidos fueron filtrados antes de la identificación de las proteínas. Las proteínas se identificaron con al menos un péptido único (Anexo 1). Además, las proteínas identificadas sólo en una o dos réplicas no se consideraron en el análisis posterior. Con este análisis, se identificaron un total de 162 proteínas no redundantes y 7; 22 y 23 proteínas estaban presentes exclusivamente en el grupo de control; VK3 y FP+VK3, respectivamente (Figura 12). Se identificaron 67 proteínas en los cuatro grupos; cuando se comparó el grupo de control con el grupo VK3 o FP+VK3, 71 y 73 proteínas eran comunes, respectivamente.

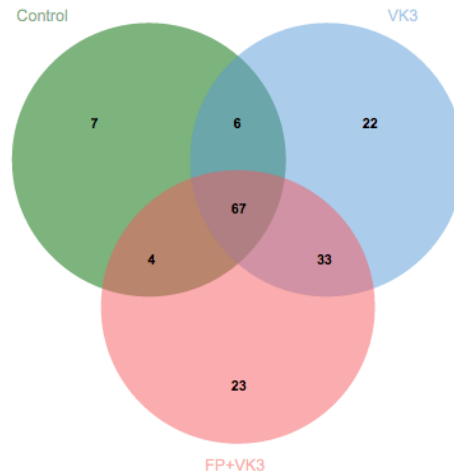


Figure 12. Diagrama de Venn donde puede verse el solapamiento de las proteínas identificadas en el análisis LC-MS/MS. Los números indican las proteínas identificadas en cada muestra. Se identificaron un total de 162 proteínas no redundantes.

Aunque la mayoría de las proteínas no se expresaron de forma diferencial entre el grupo control y uno de los otros, los estudios proteómicos revelaron un aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis (ANXA5) y la inflamación (PPIA) en las neuronas tratadas con VitK3; tales efectos ya se habían encontrado en trabajos anteriores ¹¹¹⁰⁰. Además, encontramos una disminución de CH10 y H2a2b, una cochaperonina e histona respectivamente, implicadas en la síntesis, importación y ensamblaje de proteínas mitocondriales, junto con un aumento de la malato deshidrogenasa mitocondrial (MDHM), que implicaría un aumento de la producción de ROS relacionado con la disfunción metabólica mitocondrial ¹⁰¹. Cuando se incluyó FP en el medio de incubación, se encontró una expresión diferencial de proteínas en comparación con las células tratadas con VitK3, con aumentos en proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa, como ALDOA y KP YM, junto con una disminución de proteínas proinflamatorias como PPIB y proteínas relacionadas con procesos apoptóticos, como RBMX ¹⁰².

A continuación, realizamos un análisis de enriquecimiento de las vías metabólicas, con la herramienta online DAVID para recuperar las vías génicas (KEGG) para los genes expresados diferencialmente que se presentaban en los distintos grupos. Elegimos las vías metabólicas que contenían más de dos genes con valores $p < 0.0001$. Los resultados se presentan en la Tabla 1. Tras la adición de FP al medio de cultivo neuronal, encontramos

la aparición de nuevos grupos de genes relacionados con diferentes vías metabólicas, incluyendo la glucólisis.

Basándonos en la importancia de la glucólisis para mantener el metabolismo neuronal cuando aparece una disfunción mitocondrial ^{32 103}, junto con los resultados de la proteómica que muestran una expresión diferencial de las proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial y de la glucosa y los trabajos previos de nuestro grupo y de otros, que muestran la influencia de las ROS en la producción de energía por parte de las neuronas ^{11 104 105}, decidimos adentrarnos en el estudio no sólo de la función mitocondrial sino también del efecto de FP sobre la glucólisis.

Un conocimiento más claro de la influencia del daño oxidativo en estas vías de obtención de ATP junto con los eventos moleculares asociados al efecto protector de FP podría ser crucial en el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas dirigidas a estas enfermedades, por ello, en este trabajo recurrimos al análisis de la función mitocondrial junto con el mecanismo glucolítico y de la pentosa-fosfato, con el objetivo de conocer los eventos moleculares responsables del efecto protector del FP contra el daño oxidativo inducido por VitK3.

Tabla 1. Vías de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) en los grupos generados por MCODE.

Vía KEGG	Grupo	Nombre	Count	%	p-value
VK3	1	Ribosome	14	100	2,1E-23
	2	Spliceosome	6	100	1,4E-09
	3	Protein processing in endoplasmic reticulum	3	50	4,7E-04
FP+ VK3	1	Ribosome	12	92,3	8,3E-19
	2	Protein processing in endoplasmic reticulum	4	44,4	4,0E-05
		Oestrogen signalling pathway	3	33,3	9,4E-04
	3	Spliceosome	5	100	8,4E-08
		Biosynthesis of amino acids	5	100	9,6E-09
	4	Carbon metabolism	5	100	4,8E-08
		Biosynthesis of antibiotics	5	100	5,7E-07
		Glycolysis/Gluconeogenesis	4	80	2,4E-06
	Metabolic pathways	5	100	7,5E-04	

1. Estudios sobre metabolismo oxidativo

En primer lugar, estudiamos la influencia de los radicales libres oxidativos en la función de la cadena respiratoria mitocondrial, y para ello, hemos analizado la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) tras inducir un daño oxidativo con VitK3 en los cultivos neuronales en presencia y ausencia de FP. VitK3 es un derivado de la vitamina K y un agente cíclico redox cuyo mecanismo de acción es muy característico; es reducida a nivel del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria mitocondrial, disminuyendo su actividad en un 50% ¹⁰⁶ e inhibiendo la actividad del complejo IV (citocromo C oxidasa) ¹¹, lo que conlleva un aumento en la respiración sin incrementar la producción de ATP y provocando una disminución de la capacidad respiratoria de reserva (SRC) y de la capacidad respiratoria máxima. Los datos de OCR obtenidos en estos experimentos permitieron determinar el consumo de oxígeno (figura 13).

En situaciones basales (sin adición de oligomicina, FCCP ni rotenona/antimicina) la incubación de neuronas con VitK3 mostró un aumento en OCR del 17% en comparación con el control, coincidiendo con nuestros resultados previos y otros ^{11 99}, mientras que las neuronas incubadas con VitK3 en presencia de FP mantuvieron los mismos niveles que las células control (figura 13a). El OCR ligado a la síntesis de ATP es el OCR requerido para sintetizar ATP en el complejo V, este dato puede estudiarse fácilmente ya que es sensible a la oligomicina.

En cuanto al OCR ligado a la síntesis de ATP mitocondrial, éste disminuye en un 25% tras la incubación con VitK3, coincidiendo con los resultados obtenidos por *Lakhter et al.* ¹⁰⁷, que también encontraron una disminución similar tras la incubación con esta toxina. En nuestros experimentos, el FP recupera parcialmente la disminución en la síntesis de ATP inducida por la VitK3, coincidiendo con *Bai et al.* ¹⁰⁸, quienes encontraron que el incremento de la producción de ATP por el FP podría ser la razón del efecto neuroprotector; en nuestro caso, FP restaura el OCR asociado a la producción de ATP hasta niveles cercanos a los de las neuronas control (figura 13b).

No encontramos diferencias en la fuga de protones (figura 13c), sin embargo, sí encontramos una clara diferencia en la SRC, que es la diferencia entre OCR en la actividad respiratoria basal y máxima, después de la adición de oligomicina y FCCP. En nuestros experimentos, la incubación de las neuronas con VitK3 produjo una gran disminución (40%) comparado con el control, la cual se revirtió a valores cercanos al control en presencia de FP (figura 13d).

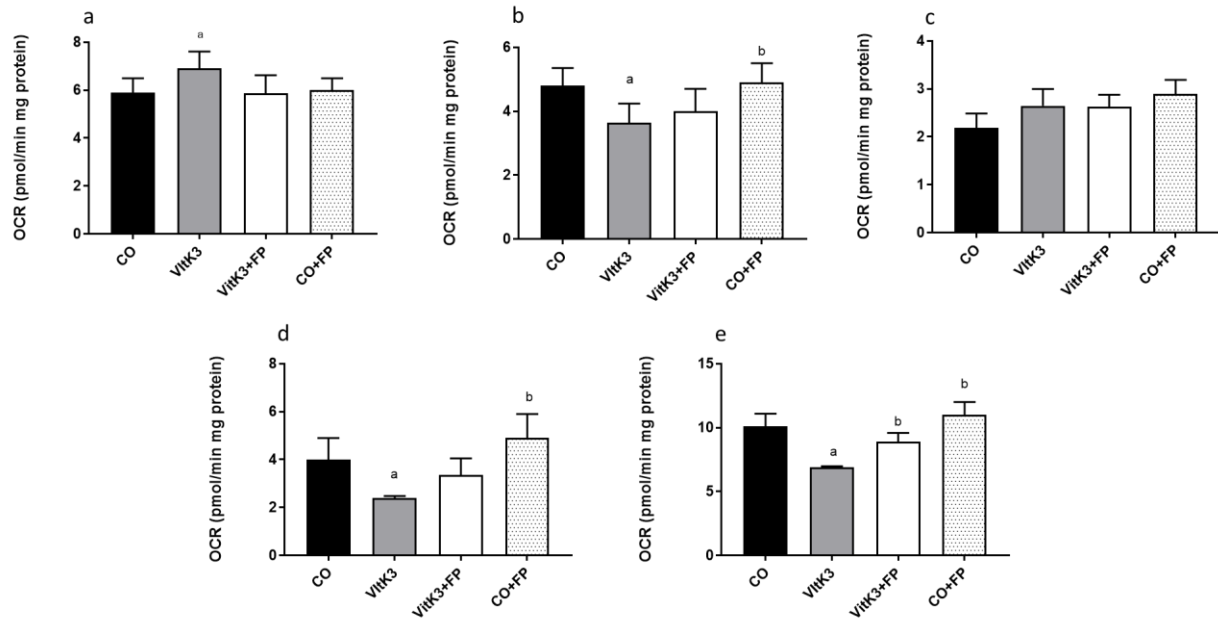


Figura 13: Estudio de la función mitocondrial neuronal después del tratamiento de la célula con VitK3 en ausencia o presencia de FP. La tasa de consumo de oxígeno se evaluó en: a) Basal después de 2 horas de incubación con VitK3. b) Producción de ATP, medida tras la adición de oligomicina. c) Fuga de protones, considerada como el consumo de oxígeno residual tras la adición de oligomicina. d) Capacidad respiratoria disponible (SRC), considerada como la diferencia entre la respiración máxima y la respiración basal. e) La respiración máxima, obtenida como el consumo de oxígeno tras la adición posterior de oligomicina y FCCP. La secuencia de tóxicos mitocondriales añadidos fue: oligomicina 1 μ M, FCCP 0,5 μ M, Rotenona/antimicina A (0,5/0,5) μ M. La inclusión de rotenona/antimicina A sirve para medir la respiración por procesos no mitocondriales ya que estos compuestos anulan la respiración mitocondrial y se restaron en todos los valores de OCR obtenidos. Los valores representan la media y la DE de al menos cinco experimentos por situación realizados por triplicado (a: $p < 0.05$ versus control, b: $p < 0.05$ versus VitK3).

La SRC es esencial para el mantenimiento de la homeostasis neuronal frente el estrés oxidativo y otros tipos de estrés o daño celular ¹⁰⁹. El uso de la SRC por las neuronas es muy variable, oscilando en rangos desde el 6-7% en situaciones de descanso al 80% en situaciones de actividad elevada, por lo que un deterioro de la SRC puede ser fatal para las neuronas ¹⁰⁹. La capacidad de incrementar la SRC por el FP permitirá a la mitocondria producir más ATP y superar el desequilibrio en la homeostasis oxidativa.

	SOD2 U/10 ⁶ cells	GPX U/10 ⁶ cells	CAT KU/10 ⁶ cells	Nit-Prot pmol/10 ⁶ cells	SOD2/GPX	SOD2/CAT
CO	43.1±3.0	21.9±4.6	27.9±3.1	0.76±0.17	2	0.15
CO+VitK3	76.4±4.0 (a)	4.5±0.8 (a)	27.1±6.3	4.5±0.35 (a)	17 (a)	0.28
CO+VitK3+FP	40.3±3.0 (b)	10.6±0.9 (a)(b)	27.8±4.2	0.45±0.15 (b)	5 (a)(b)	0.14
CO+VitK3+FP+W	79.9±6.0 (a)	27.6±4.8 (b)(c)	14.4±2.5 (a)(b)(c)	3.75±0.20 (a)(c)	3 (b)(c)	0.55 (a)(b)(c)
CO+FP	50.1±3.0 (b)(c)(d)	23.9±4.0 (b)(c)	44.1±8.5 (a)(b)(c)(d)	1.87±0.5 (a)(b)(c)(d)	2 (b)(c)	0.11 (b)(d)

Tabla 2: Cuantificación de las principales enzimas relacionadas con el metabolismo de los radicales superóxido y proteínas nitrosiladas. Cada experimento se realizó por triplicado; las muestras eran un homogeneizado de un conjunto de células neuronales. Los resultados se expresan como media ± DE (a: p<0.05 versus control, b: p<0.05 versus VitK3, c: p<0.05 versus VitK3 + FP, d: p<0.05 versus VitK3 + FP + W123).

El FP podría ser considerado un regulador de la respiración mitocondrial a largo plazo a través de los cambios producidos en la SRC. Esta modulación podría ser debida a un incremento en la expresión del óxido nítrico sintasa (NOS) neuronal, lo que incrementaría los niveles de NO ¹¹⁰; esto concordaría con nuestros resultados acerca de la nitrosilación de proteínas encontradas en el grupo control tratado con FP (Tabla 2).

Estos reguladores a largo plazo producen unos cambios permanentes en la respiración mitocondrial que parecen ser específicos de tejido ¹¹¹. Esto haría del FP una herramienta terapéutica valiosa en las enfermedades neurodegenerativas agrupadas como mitocondriopatías (EP, EH o EM), en las cuales el desequilibrio en el balance oxidativo provocaría una afectación mitocondrial dramática ^{112 27}.

También encontramos un resultado similar en la respiración máxima, que es el porcentaje máximo de respiración logrado por una neurona tras la adición de FCCP y oligomicina ¹⁰⁹; esto es un indicador de posible daño mitocondrial ¹⁰⁹. En estos experimentos, la incubación de las neuronas con VitK3 provocó un claro descenso, del 32% en la respiración máxima comparado con el control; sin embargo, cuando se coincubaron en presencia de FP este descenso fue contrarrestado, siendo capaces de recuperar el 20% de la respiración máxima comparado con las neuronas tratadas con VitK3, tal y como podemos observar en la figura 13e.

El efecto del FP en la función mitocondrial puede ser también debido a la modulación de la expresión de la proteína translocadora mitocondrial (TSPO) ¹¹³. Esta es una proteína de la membrana mitocondrial, asociada con el poro de permeabilidad mitocondrial, que se expresa en todas las células de origen embrionario como las que hemos utilizado en este estudio ¹¹⁴. Esto se ha podido observar en la EM dónde el FP disminuyó la expresión de TSPO estabilizando la mitocondria. Tampoco podemos excluir la posibilidad de que el FP regule la expresión de prohibitinas, una chaperona que regula el ensamblaje de los complejos respiratorios mitocondriales y su actividad ^{115 116 117}. Además, existen algunos estudios sobre el efecto protector de la estimulación del receptor S1P₁ sobre genes implicados en la expresión de proteínas que mejoran la función mitocondrial en situaciones de estrés ¹¹³.

Podríamos también postular que el FP induce un aumento de los factores protectores como el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) que es un factor de transcripción que se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) en el núcleo, lo que conlleva la transcripción de los genes ARE. En trabajos previos ya hemos demostrado que FP facilita la translocación de Nrf2 al núcleo ¹¹, incrementando la síntesis de enzimas mitocondriales y mejorando la función mitocondrial. Estos efectos podrían retrasar o ralentizar el daño inducido por VitK3 ¹¹⁸. En todos los experimentos que hemos llevado a cabo, las células control que fueron incubadas con FP no presentaron ningún cambio significativo en los valores obtenidos comparados con las células control, tal y como podemos observar en la figura 13.

2. Estudios sobre las enzimas antioxidantes

2.1 Superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2)

En el estudio de las enzimas relacionadas con el metabolismo de O_2^- , encontramos en nuestros experimentos un incremento del 77,3% en la actividad de la SOD2 en las neuronas tratadas con Vitk3 comparadas con el control, como podemos apreciar en la tabla 2.

El incremento de la actividad de la SOD2 tendría como consecuencia un aumento de la concentración de H_2O_2 como producto derivado del metabolismo de O_2^- , que en condiciones normales debería ser continuado con un incremento de la actividad de las enzimas CAT y/o GPX para eliminar el exceso de H_2O_2 y evitar el daño oxidativo. Esto sugiere que las mitocondrias están implicadas en la generación de estrés oxidativo motivado por VitK3, coincidiendo con nuestros resultados previos ¹¹. La SOD 2 es un enzima mitocondrial inducible, siendo el radical O_2^- el principal inductor ¹¹⁹. Curiosamente, cuando coincubamos las neuronas tratadas con VitK3 con FP, la actividad de la SOD2 se recuperó a niveles similares al control, indicando que FP produciría una reducción en la producción de O_2^- y consecuentemente, un efecto protector en la función mitocondrial, como hemos visto en trabajos anteriores ¹¹, contribuyendo ambos en una disminución de la inducción de la SOD2.

2.2 Glutación peroxidasa (GPX)

GPX es una familia de enzimas con actividad peroxidasa que protege a la célula del daño oxidativo por medio de su habilidad para reducir H_2O_2 a H_2O cuando hay bajas concentraciones de H_2O_2 debido a su alta afinidad comparada con otras peroxidases.

En nuestros experimentos encontramos una disminución del 79,4% de la actividad de la GPX en neuronas tratadas con VitK3 comparadas con el control, probablemente como consecuencia de un incremento de O_2^-/SOD , una disminución de los tioles totales y un incremento del estrés nitrosativo ¹²⁰. En estos experimentos, cuando incluimos FP en el medio de incubación, se recuperó un 50% de la actividad de GPX, coincidiendo con los resultados de otros autores ¹²¹; este efecto podría estar mediado por un incremento en la traslocación de Nrf2 al núcleo, en consonancia con los resultados descritos por nuestro grupo y otros autores con anterioridad ^{11 122}.

2.3 Catalasas (CAT)

La CAT es una enzima que cataliza H_2O_2 a H_2O , y que tiene la particularidad de presentar una baja afinidad por este sustrato, pero sin embargo una alta efectividad, por lo tanto, CAT actuará solamente cuando existen concentraciones elevadas del oxidante. En nuestros experimentos, no encontramos modificaciones tras la incubación con VitK3 sólo, o en presencia de FP, aunque en las células control con FP hubo un claro incremento del 57% en la actividad de CAT. Esto podría ser debido a la capacidad del FP para promover un incremento en la translocación y expresión de Nrf2 como habíamos visto en trabajos previos ¹¹.

Una mayor producción de H_2O_2 por SOD2 en neuronas tratadas con VitK3 en comparación con el control, asociada con la disminución de la actividad de GPX sin aumento de CAT, puede causar un desequilibrio entre la sobreproducción y la degradación de H_2O_2 en estas neuronas como se observa en los ratios de SOD2/GPX y SOD2/CAT (tabla 2). Este desequilibrio desaparece con la coincubación en presencia de FP.

2.4 Nitrosilación de proteínas

Para evaluar el posible daño producido por el estrés oxidativo inducido por el tratamiento con VitK3, recurrimos al estudio de la nitrosilación de proteínas. NO es una molécula importante en la señalización celular, pero su sobreproducción puede ser tóxica, causando la nitrosilación de proteínas y daño mitocondrial y celular. La nitrosilación de proteínas desencadenada por NO aumenta en gran medida en presencia de O_2^- con la formación de $ONOO^-$ ¹²³, y es un regulador importante de la actividad mitocondrial ¹²⁴. En nuestros experimentos, encontramos un gran aumento (cerca de un 600%) en la nitrosilación de proteínas en neuronas tratadas con VitK3; pero de nuevo, la coincubación con FP restablece la nitrosilación a niveles similares al control, lo cual puede ser explicado por la capacidad de FP de inhibir NOS inducible y, por lo tanto, la nitrosilación de proteínas ⁹, tal y como como puede verse en la tabla 2.

También pudimos observar un incremento en las neuronas control tratadas con FP (246%), que puede ser debido a la estimulación de NOS neuronal ¹¹⁰. Además, FP ha demostrado tener efecto modulador, aumentando la plasticidad neuronal mediada por NO ^{125 126}, aunque son necesarios estudios que profundicen más en el tema con el objetivo de aclarar este punto.

3. Estudios sobre el metabolismo de la glucosa

Las células neuronales obtienen energía en forma de ATP a partir de la glucosa a través de distintas vías; la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (VPP) y la fosforilación oxidativa. Las neuronas activas obtienen su energía de la ruptura de la glucosa, principal fuente de energía, a través de la glucólisis. Esta es la vía metabólica por excelencia para la obtención de energía para ciertas funciones neuronales como el transporte axonal rápido ¹²⁷.

En este trabajo, observamos que se produjo una gran disminución en la glucólisis en presencia de VitK3, en torno al 46%, comparado con las neuronas control, este dato se pudo obtener a través de la medición de la tasa de acidificación extracelular (ECAR). La coincubación en presencia de FP recuperó los valores a los niveles de las neuronas control (figura 14a y 14b). Este hallazgo concuerda con lo encontrado con algunos estimulantes S1P, que incrementaron la expresión de genes relacionados con la glucólisis, ECAR y capacidad glucolítica ¹²⁸.

En el estudio de la capacidad glucolítica, que mide la proporción máxima de conversión de glucosa en piruvato o lactato, encontramos que la VitK3 producía una disminución del 47% comparado con el control; la inclusión de FP en el medio de incubación revirtió estos valores a niveles de las neuronas control (Figura 14a y 14c).

También estudiamos la reserva glucolítica que es la capacidad de las células para adaptarse a demandas energéticas extra cuando la función glucolítica está trabajando al máximo. Cuando las neuronas se incubaron en presencia de la VitK3 mostraron una reducción de la reserva glucolítica del 48% comparado con el control; de nuevo, al coincubarlas las neuronas en presencia de FP, los valores volvieron a los niveles del control, tal y como podemos observar en la figura 14a y 14d.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con los de Lee et al. ¹²⁸, al encontrar un incremento de la capacidad glucolítica con estimulantes S1P en células mesenquimales, aunque los autores no encontraron diferencias en la reserva glucolítica, posiblemente debido a los diferentes tipos de células. Esta recuperación de la capacidad glucolítica por medio de estimulantes S1P aportaría rápidamente ATP en las situaciones necesarias y cuando el metabolismo mitocondrial no es totalmente funcional, a pesar de tener generalmente una gran capacidad para generar ATP, tal y como demostramos anteriormente.

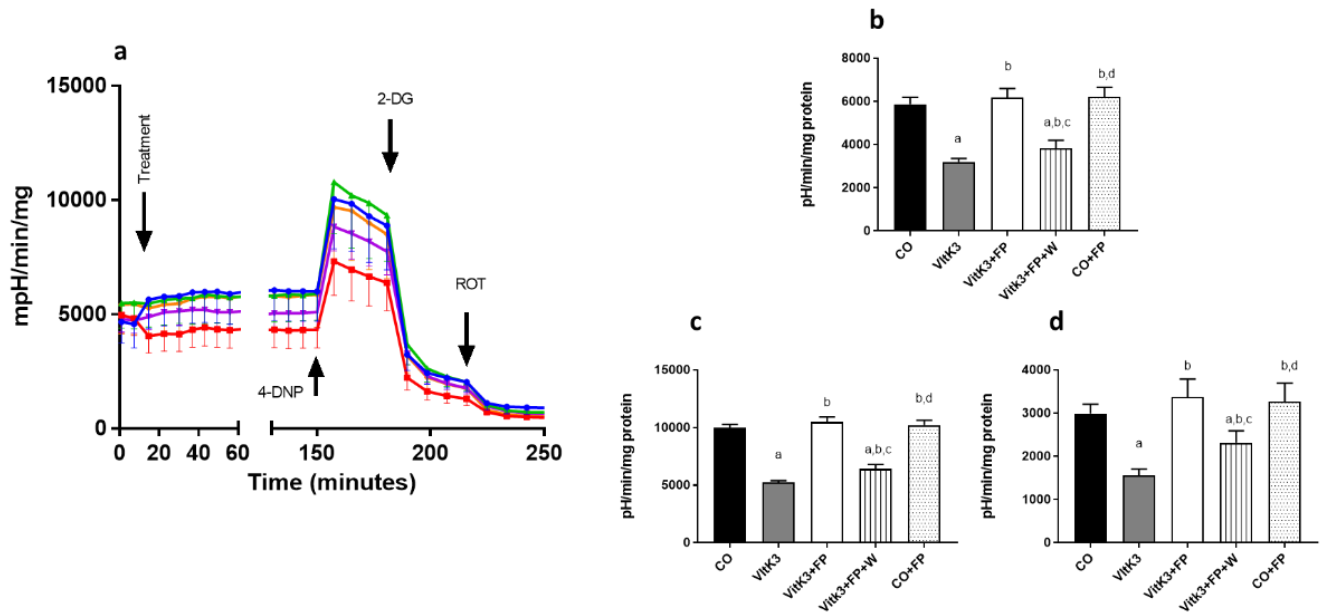


Figura 14: Efecto de FP sobre el daño glucolítico inducido por VitK3 en células neuronales SN4741. **a)** Evolución temporal de la función ECAR y glucolítica después de la incubación con VitK3 en presencia o ausencia de FP (línea azul: Control; línea roja: Vitk3; línea verde: Vitk3 + FP; línea púrpura: VitK3 + FP + W123). Para desacoplar la respiración mitocondrial de la síntesis de ATP usamos 2,4-DNP 100 μ M; Se usó 2-DG 100 mM para inhibir la glucólisis y se usó rotenona 1 μ M para inhibir NADH hidrogenasa/complejo I; **b)** Glucólisis basal después de dos horas de tratamiento con VitK3 en presencia o ausencia de FP; **c)** Capacidad glucolítica obtenida tras la incubación con 2,4-DNP y rotenona; **d)** Reserva glucolítica obtenida como la diferencia entre la capacidad glucolítica máxima y la basal. En todas las situaciones se restó el ECAR no glucolítico, obtenido tras la adición de rotenona. Los valores representan la media y la desviación estándar de al menos cinco experimentos por situación realizados por triplicado. (a: $p < 0.05$ versus control, b: $p < 0.05$ versus VitK3, c: $p < 0.05$ versus VitK3 + FP, d: $p < 0.05$ versus VitK3 + FP + W123).

Tal y como comentamos en los resultados de proteómica, encontramos un incremento en la expresión de enzimas metabólicas relacionados con la glucólisis, concordando con lo descrito en situaciones de estrés energético dónde se encontró un incremento de las enzimas metabólicas de la glucólisis en los botones presinápticos ¹²⁹. En algunas enfermedades neurodegenerativas, especialmente en aquellas donde la conducción axonal está dañada, las neuronas tienden a incrementar el consumo de energía con el objetivo de recuperar y restaurar la función axonal ¹³⁰. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, el metabolismo bajo de la glucosa está asociado con fallo cognitivo ¹³¹; además, Rone et al. destacó el papel de la glucólisis para obtener energía en células bajo estrés metabólico ¹³². Por último, la disminución de la actividad de las enzimas glucolíticas como consecuencia del daño oxidativo, visto en las etapas iniciales de las enfermedades neurodegenerativas, puede llevar a una disminución de la síntesis de ATP y, por lo tanto, a un incremento en la producción de radicales libres ¹³³.

En los experimentos de proteómica, también observamos que FP induce un incremento en la expresión de Aldolasa, una de las enzimas clave involucradas en la glucólisis. En este trabajo encontramos una disminución del 23% en la actividad de la aldolasa tras el tratamiento de las neuronas con VitK3; de nuevo, la coincubación en presencia de FP recupera los valores de aldolasa a niveles similares a los obtenidos en neuronas control (figura 15), coincidiendo con Lee et al. quién encontró también un incremento de la actividad de la aldolasa con estimulantes S1P ¹²⁸; además, Geffin et al. mostraron una regulación positiva de genes implicados en la glucólisis, incluyendo la aldolasa, en células expuestas al VIH y tratadas con FP ¹³⁴. Teniendo en cuenta estos hallazgos, FP puede ser considerado como un herramienta terapéutica para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas que muestran una disminución de la glucólisis, como la EP, EA o EM ¹⁰⁴.

Aunque nuestro modelo está basado en un daño oxidativo mitocondrial inducido por VitK3, hemos podido observar una disminución en la función glucolítica que fue recuperada en presencia de FP. En la actualidad, la indicación de FP es el tratamiento de la EM, y se ha visto que su retirada tras un periodo de tratamiento puede desencadenar una recaída en los pacientes de EM ¹³⁵, por lo que decidimos mantener el FP en uno de los grupos extendiendo el estudio en el tiempo para determinar la necesidad de mantener FP en el medio de incubación para preservar sus efectos beneficiosos. En este estudio encontramos una disminución de ECAR en neuronas tratadas con VitK3 comparado con las neuronas control y de nuevo, FP revirtió casi por completo el daño producido por VitK3 manteniendo la actividad glucolítica a niveles

cercanos al control a lo largo del máximo tiempo estudiado, mientras que en las neuronas sin FP el daño se mantuvo en el tiempo, tal y como podemos observar en la figura 16. Esto podría ser de gran interés ya que la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas tienen en común una disminución del metabolismo energético y de los niveles de ATP ¹³⁶. En estas situaciones, la mejora de los procesos glucolíticos podría representar un buen acercamiento para ralentizar la progresión y/o aliviar la sintomatología ^{136 137}.

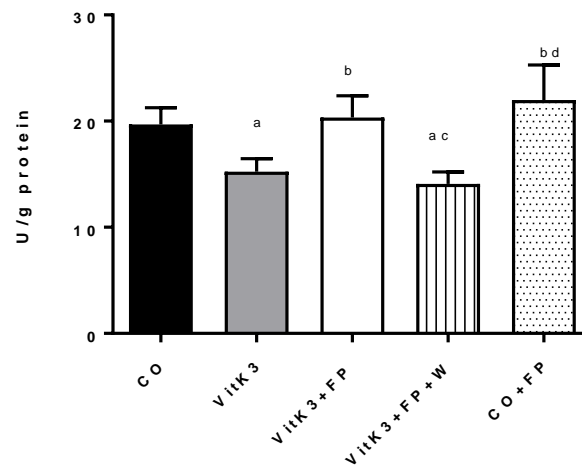


Figura 15. Efecto de FP sobre la enzima aldolasa tras la incubación de las neuronas en presencia de VitK3. La aldolasa se midió en un homogeneizado de neuronas después de dos horas de incubación con VitK3 en presencia o ausencia de FP. Los valores representan la media y la desviación estándar de al menos cinco experimentos por situación realizados por triplicado. (a: $p < 0.05$ versus control, b: $p < 0.05$ versus VitK3, c: $p < 0.05$ versus VitK3 + FP, d: $p < 0.05$ versus VitK3 + FP + W123).

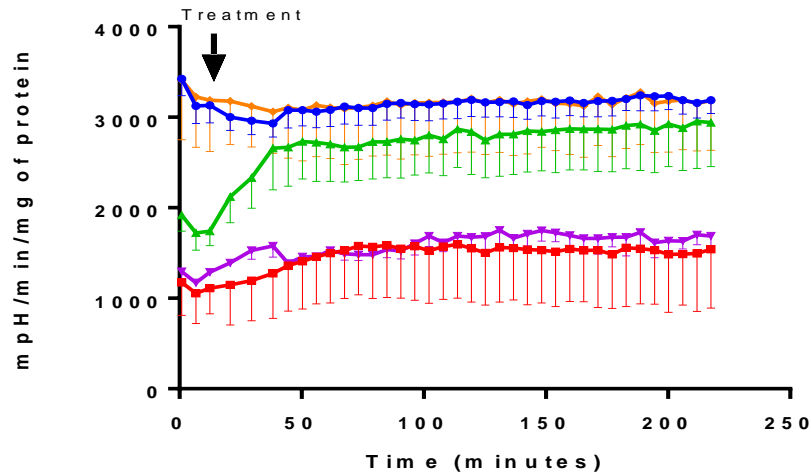


Figura 16: Evolución temporal de ECAR después de 2 h de incubación con Vitk3 en presencia o ausencia de FP. Después de 2 h de incubación, se retiró Vitk3 del medio y las células se incubaron durante cuatro horas adicionales en las siguientes condiciones: dos grupos se incubaron con medio (grupo Vitk3 (línea roja) y grupo de control (línea azul)); uno con FP (grupo VitK3 + FP (línea verde)); uno con FP + W123 (grupo VitK3 + FP + W (línea violeta)) y uno con FP (grupo FP (línea naranja)). Los valores representan la media y la DE de al menos cuatro experimentos por situación realizados por triplicado.

En el metabolismo de la glucosa, el equilibrio entre la glucólisis y la VPP es muy relevante, ya que el procesamiento de la glucosa por la VPP sirve como una fuente de NADPH que a su vez regeneraría antioxidantes oxidados tales como glutatión y tiorredoxina. El metabolismo exclusivo de la glucosa a través de la glucólisis provocaría una disminución de la disponibilidad de NADPH, incrementaría el estrés oxidativo y posiblemente provocaría la muerte celular ¹³⁸. NADPH también sirve como cofactor de la actividad detoxificante de NQO1 (gen que codifica la enzima NADPH deshidrogenasa), en la síntesis de ácidos grasos y mielina, en el recambio de neurotransmisores y en el mantenimiento de la homeostasis redox ^{11 139}.

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) es una enzima clave en la VPP y ha sido asociada a una mejora de la homeostasis redox debido a un incremento de los niveles de NADPH ¹⁴⁰. Además, enfermedades neurodegenerativas como la EP están relacionadas con una disminución de esta enzima ¹⁴¹. Debido a la importancia de la G-6-PDH, decidimos estudiar la actividad de esta enzima en cultivos neuronales después del daño oxidativo inducido por la VitK3 en presencia o ausencia de FP. Los resultados, representados en la figura 17, muestran una disminución en la actividad de esta enzima tras la incubación con VitK3; esta actividad, se recupera e incluso alcanza niveles muy superiores al control, cuando se incluye FP en el medio de incubación. Este incremento inducido por FP, puede ser debido a la estimulación en la síntesis y translocación de Nrf2, un inductor de la síntesis de las enzimas más importantes implicadas en la vía VPP ¹¹, como han puesto también de manifiesto otros autores ^{142 143}.

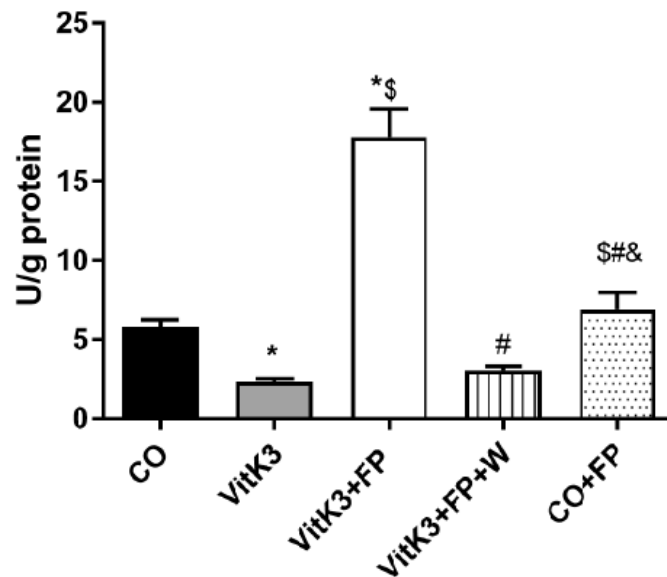


Figura 17: FP incrementa la actividad de la enzima G-6-PDH reducida por la VitK3. Determinaciones realizadas en un homogeneizado de neuronas tras 2 horas de incubación con VitK3 en presencia o ausencia de FP. Los valores representan la media y la desviación estándar de al menos cinco experimentos por situación realizados por triplicado (* $p < 0.05$ versus CO, \$ $p < 0.05$ versus VitK3, # $p < 0.05$ versus VitK3+FP, & $p < 0.05$ versus VitK3+FP+W).

4. *Influencia de los receptores S1P*

FP tiene reconocido en su indicación para el tratamiento de la EM, una interacción directa con los receptores S1P; además, podemos descartar la posibilidad de una interacción farmacológica directa entre FP y VitK3 ya que estos fármacos no comparten ni coinciden en su mecanismo de acción ni con ninguna de las enzimas implicadas en su metabolización¹⁴⁴. En este estudio demostramos la presencia de receptores S1P1 en el soma y los axones de las células neuronales SN4741 (figura 18).

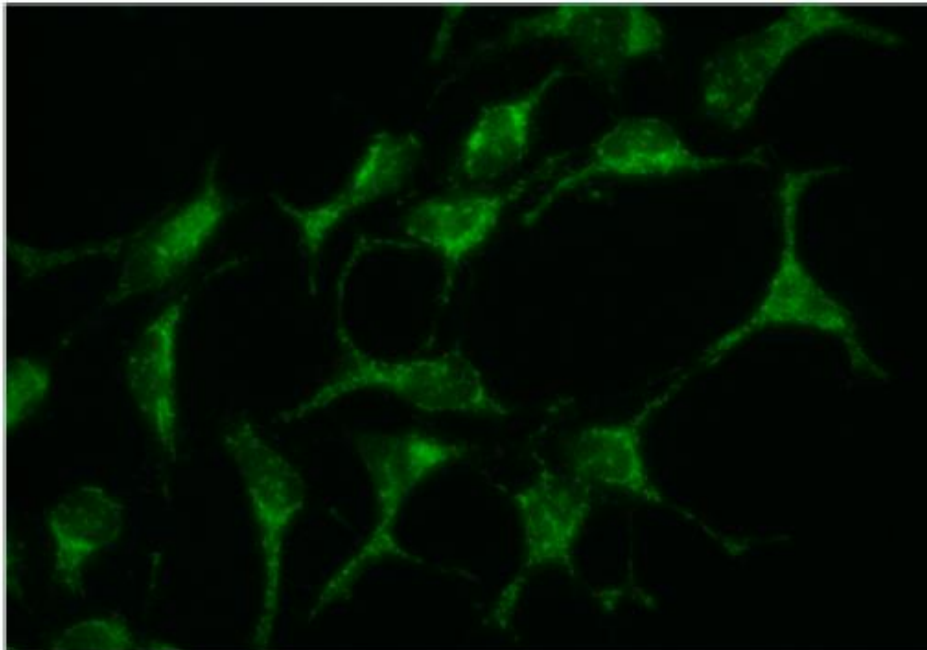


Figura 18: Inmunocitoquímica de los receptores S1P₁ en células neuronales SN4741. La imagen se obtuvo usando un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 a una magnificación de 40x.

Con el objetivo de determinar la contribución de estos receptores en el efecto protector del FP, realizamos experimentos en presencia de W123 (W), un antagonista competitivo selectivo del receptor S1P₁.

En este estudio encontramos resultados curiosos, ya que observamos un incremento de la SOD debido al aumento de radicales libres provocados por la VitK3, que se revirtió totalmente en presencia de FP. Cuando el receptor S1P₁ se bloqueó con el antagonista, los efectos beneficiosos desaparecieron, los radicales libres aumentaron de nuevo y los valores de SOD volvieron a ser similares a los encontrados en las neuronas tratadas con VitK3, por lo que el efecto sobre SOD puede atribuirse a la interacción del FP con los receptores S1P₁ (Tabla 2).

Sin embargo, la influencia de los receptores S1P₁ en GPX no fue tan clara. En estos experimentos, FP demostró su acción no sólo por su interacción con los receptores S1P₁, sino también por otros mecanismos que podrían incluir su interacción con otros subtipos de receptores S1P expresados en las células neuronales, como S1P₃ y S1P₅. FP es un agonista selectivo pero no específico para el subtipo S1P₁, de hecho, se une con mayor afinidad (triple) al receptor S1P₅ que es el menos expresado en las neuronas, y con menos afinidad (cinco veces) al S1P₃¹⁴⁵. Desafortunadamente, en la actualidad no disponemos de suficientes compuestos selectivos como para poder estudiar con claridad la unión de FP a receptores distintos del S1P₁. Suponiendo que el efecto de FP no sea debido a su interacción con los receptores S1P₁, podríamos estar ante mecanismos no receptoriales, los cuales incluirían un aumento en la expresión de Nrf2, hemo oxigenasa 1 (OH1) y tioredoxina, y también, un aumento en la translocación de Nrf2 al núcleo¹¹. Estos factores, especialmente Nrf2 y OH1, son importantes para aumentar las enzimas antioxidantes como la GPX.

Algo parecido ocurrió con CAT, donde no se obtuvieron resultados claros sobre la influencia de S1P₁. En estos experimentos no vimos efectos de la incubación de VitK3 en la actividad de CAT ni tampoco con la adición de FP. Aunque, al bloquear el receptor S1P₁ encontramos una disminución en la actividad de CAT sin una explicación clara, sin embargo, podríamos argumentar que esta disminución puede estar relacionada con el aumento de SOD y GPX comentados anteriormente, lo que reduciría el H₂O₂, y a su vez, reduciría la CAT¹⁴⁶.

En el estudio de la nitrosilación de proteínas encontramos un comportamiento similar al visto en el estudio de la SOD. Las neuronas incubadas con VitK3 mostraron un incremento en la nitrosilación de proteínas que fue revertido en presencia de FP. El bloqueo de los receptores S1P₁ eliminó los efectos beneficiosos del FP, incrementando la nitrosilación nuevamente a niveles cercanos a los encontrados en las neuronas tratadas con VitK3, coincidiendo con otros autores¹⁴⁷.

Todos los efectos beneficiosos del FP en la glucólisis fueron mediados a través de su interacción con los receptores S1P₁, ya que todos estos efectos desaparecieron cuando el antagonista de S1P₁ estaba presente, afectando a la glucólisis basal, la capacidad glucolítica, la reserva glucolítica y la capacidad de mantener la actividad de la aldolasa. Estos hallazgos son comunes con otros autores que también encontraron la necesidad de la interacción del FP con sus receptores para llevar a cabo sus acciones protectoras sobre la glucólisis^{128 134}. En el estudio de la actividad de la G-6-PDH, el efecto del FP fue mediado también por su interacción con los receptores S1P₁, ya que su efecto sobre esta enzima desapareció por completo cuando el antagonista de S1P₁ estaba presente en el medio de incubación.

Este estudio se ha realizado en cultivos de células neuronales, por lo que una de las limitaciones del trabajo es no conocer el efecto protector de la PF en el animal íntegro. En cualquier caso, un conocimiento más claro de estas vías podría ayudar a entender los mecanismos implicados en el daño oxidativo, común en varias enfermedades neurodegenerativas, como la EA, la EP, la ELA o EH permitiendo una mejora, disminución y/o retraso en la sintomatología y/o el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Se ha visto que en las enfermedades neurodegenerativas, cuando el tratamiento se instaura en las etapas iniciales de la enfermedad, el proceso se enlentece y la aparición de síntomas es más leve, lo que haría de Fingolimod una herramienta terapéutica importante en estas etapas tempranas; pero también actuaría en etapas avanzadas donde el aporte de energía mitocondrial se encuentra comprometido, por lo que el Fingolimod podría ser un candidato potencial para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas tanto en etapas iniciales como avanzadas de la enfermedad.

CONCLUSIONES

1. Fingolimod fosfato tiene un efecto protector frente al daño neuronal inducido por VitK3 en cultivos de neuronas dopaminérgicas SN4741.
2. Fingolimod fosfato restaura el equilibrio de enzimas antioxidantes en este modelo.
3. Fingolimod fosfato recupera la inhibición de la capacidad glucolítica neuronal inducida por VitK3.
4. Fingolimod fosfato restituye la actividad enzimática de G-6-PDH, enzima limitante de la VPP, inhibida por VitK3 en cultivos neuronales.
5. Fingolimod fosfato previene el daño mitocondrial inducido por VitK3, restaurando el metabolismo oxidativo en cultivos de neuronas dopaminérgicas SN4741.
6. La mayor parte de los efectos de Fingolimod fosfato vienen mediados por su interacción con los receptores S1P₁ en nuestro modelo experimental.
7. Por el momento no podemos descartar la implicación de otros subtipos S1P neuronales o a la existencia de mecanismos no receptoriales por los que FP pueda realizar sus efectos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scafari, A. *et al.* Early relapses, onset of progression, and late outcome in multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* **70**, 214–222 (2013).
2. Paul, A., Comabella, M. & Gandhi, R. Biomarkers in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, (2019).
3. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 531–564 (2012).
4. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. Multiple sclerosis. *Lancet* **391**, 1622–1636 (2018).
5. Scarlatti, D. Zeposia (ozanimod) An overview of Zeposia and why it is authorised in the EU. *Eur. Med. Agency* **31**, (2020).
6. Hafler, D. a. Fingolimod for Multiple Sclerosis — NEJM. *N. Engl. J. Med.* 339–347 (2012).
7. Chun, J. & Hartung, H. P. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* **33**, 91–101 (2010).
8. Islam, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological Research* vol. 39 73–82 (2017).
9. Miguez, A. *et al.* Fingolimod (FTY720) enhances hippocampal synaptic plasticity and memory in Huntington ' s disease by preventing p75 NTR up-regulation and astrocyte-mediated inflammation © The Author 2015 . Published by Oxford University Press . All rights reserved . Fo. 1–36 (2015).
10. Asle-Rousta, M., Kollahdoz, Z., Dargahi, L., Ahmadiani, A. & Nasoohi, S. Prominence of Central Sphingosine-1-Phosphate Receptor-1 in Attenuating A β -Induced Injury by Fingolimod. *J. Mol. Neurosci.* **54**, 698–703 (2014).
11. Martín-Montañez, E. *et al.* The S1P mimetic fingolimod phosphate regulates mitochondrial oxidative stress in neuronal cells. *Free Radic. Biol. Med.* **137**, 116–130 (2019).

12. Fredriksson, R. & Schiöth, H. B. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414–1425 (2005).
13. Bazúa-Valenti, S. La esfingosina 1-fosfato y su receptor S1P1: reguladores de la respuesta inmune. *Rev. Fac. Med. UNAM* **55**, 53–57 (2012).
14. Alvarez, S. E., Milstien, S. & Spiegel, S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 300–307 (2007).
15. Matloubian, M. *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* **427**, 355–360 (2004).
16. Urina, M. A., Rojas, C. & Urina, D. Efectos cardiovasculares de fingolimod en el tratamiento de la esclerosis múltiple. *Rev. Colomb. Cardiol.* **20**, 149–153 (2013).
17. Lee, M. J. *et al.* Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**, 301–312 (1999).
18. Cyster, J. G. & Schwab, S. R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 69–94 (2012).
19. Brinkmann, V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **115**, 84–105 (2007).
20. Baecher-Allan, C., Wolf, E. & Hafler, D. A. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells. *Clin. Immunol.* **115**, 10–18 (2005).
21. Brinkmann, V. *et al.* Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 9 883–897 (2010).
22. Signaling, R. & Retention, O. S1P 1 Receptor Signaling Overrides Retention Mediated by Ga. *Immunity* **1**, 1–12 (2008).
23. Johnson, D., Allman, E. & Nehrke, K. Regulation of acid-base transporters by reactive oxygen species following mitochondrial fragmentation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **302**, C1045–C1054 (2012).

24. Dröse, S. & Brandt, U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **748**, 145–169 (2012).
25. Dröse, S., Brandt, U. & Wittig, I. Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* vol. 1844 1344–1354 (2014).
26. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
27. Franco-Iborra, S., Vila, M. & Perier, C. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease. *Frontiers in Neuroscience* vol. 12 342 (2018).
28. Srivastava, S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders. *Genes* vol. 8 (2017).
29. Neves Carvalho, A., Firuzi, O., Joao Gama, M., van Horssen, J. & Saso, L. Oxidative Stress and Antioxidants in Neurological Diseases: Is There Still Hope? *Curr. Drug Targets* **18**, 705–718 (2016).
30. Baumruker, T., Billich, A. & Brinkmann, V. FTY720, an immunomodulatory sphingolipid mimetic: Translation of a novel mechanism into clinical benefit in multiple sclerosis. *Expert Opin. Investig. Drugs* **16**, 283–289 (2007).
31. Sheng, Z. H. Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications. *J. Cell Biol.* **204**, 1087–1098 (2014).
32. Yellen, G. Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *J. Cell Biol.* **217**, 2235–2246 (2018).
33. Tu, D. *et al.* The pentose phosphate pathway regulates chronic neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration. *J. Neuroinflammation* **16**, 1–17 (2019).
34. Alarcón-Aguilar, A., Maycotte-González, P., Cortés-Hernández, P., López-Diazguerrero, N. E. & Königsberg, M. Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. *Gac. México* **155**, 254–260 (2019).

35. Correia, S. C., Perry, G. & Moreira, P. I. Mitochondrial traffic jams in Alzheimer's disease - pinpointing the roadblocks. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 1909–1917 (2016).
36. Ventura-Clapier, R., Garnier, A. & Veksler, V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . *Cardiovasc. Res.* **79**, 208–217 (2008).
37. Wai, T. & Langer, T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 105–117 (2016).
38. Ding, W. X. & Yin, X. M. Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* **393**, 547–564 (2012).
39. Martín-Montañez, E. *et al.* Insulin-like growth factor II prevents oxidative and neuronal damage in cellular and mice models of Parkinson's disease. *Redox Biol.* **46**, (2021).
40. Witte, M. E., Mahad, D. J., Lassmann, H. & van Horssen, J. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine* vol. 20 179–187 (2014).
41. Lovas, J. R. & Wang, X. The meaning of mitochondrial movement to a neuron's life. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1833 184–194 (2013).
42. Martínez, C. D., Vargas, C. R. & Arancibia, S. R. edigraphic.com. **46**, (2003).
43. Vélez, G., Rocha, Y., Arias, A. & López, J. Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. y Hemoter.* **32**, 43–56 (2016).
44. Coussette, U. M., Piñeiro, J. C. G., Gastell, P. L. & Armenteros, A. A. Xantina oxidorreductasa, propiedades, funciones y regulación de su expresión genética. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* **24**, 1–7 (2005).
45. Figueroa-Vega, N. *et al.* Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias. *Endocrinol. y Nutr.* **55**, 340–345 (2008).
46. Carvajal Carvajal, C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med. Leg. Costa Rica* **36**, 91–100 (2019).

47. Meiser, J., Weindl, D. & Hiller, K. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun. Signal.* **11**, 1–18 (2013).
48. Votyakova, T. V. & Reynolds, I. J. $\Delta\psi_m$ -Dependent and -Independent Production of Reactive Oxygen Species By Rat Brain Mitochondria. *J. Neurochem.* **79**, 266–277 (2001).
49. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
50. Kluckova, K. *et al.* Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *Cell Death Dis.* **6**, e1749-13 (2015).
51. Bleier, L. & Dröse, S. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1827**, 1320–1331 (2013).
52. Lee, J. C., Son, Y. O., Pratheeshkumar, P. & Shi, X. Oxidative stress and metal carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 742–757 (2012).
53. Casas, A. I. *et al.* On the clinical pharmacology of reactive oxygen species. *Pharmacol. Rev.* **72**, 801–828 (2020).
54. Liang, H. *et al.* Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 312–320 (2009).
55. Murshudov, G. N. *et al.* The structures of *Micrococcus lysodeikticus* catalase, its ferryl intermediate (compound II) and NADPH complex. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **58**, 1972–1982 (2002).
56. Diaz, A. *et al.* La estructura de las catalasas. **22**, 76–84 (2003).
57. Turrens, J. F. Oxidative stress and antioxidant defenses: A target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol. Aspects Med.* **25**, 211–220 (2004).
58. Pasquali-Ronchetti, I. *et al.* Oxidative stress in fibroblasts from patients with pseudoxanthoma elasticum: possible role in the pathogenesis of clinical manifestations. *J. Pathol.* **208**, 54–61 (2006).

59. Liddell, J. R., Robinson, S. R. & Dringen, R. Endogenous glutathione and catalase protect cultured rat astrocytes from the iron-mediated toxicity of hydrogen peroxide. *Neurosci. Lett.* **364**, 164–167 (2004).
60. Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D. & Plotkin, J. B. Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in *Escherichia coli* Linked references are available on JSTOR for this article : Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in *Escherichia coli*. **324**, 255–258 (2016).
61. Mariaca, C. J., Zapata, M. & Uribe, P. Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev. la Asoc. Colomb. Dermatología y Cirugía Dermatológica* **24**, 162–173 (2016).
62. McCord, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**, 652–659 (2000).
63. González-Polo, R. A., Soler, G., Rodríguezmartín, A., Morán, J. M. & Fuentes, J. M. Protection against MPP+ neurotoxicity in cerebellar granule cells by antioxidants. *Cell Biol. Int.* **28**, 373–380 (2004).
64. Prineas, J. W. *et al.* Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **50**, 646–657 (2001).
65. Lassmann, H., Van Horssen, J. & Mahad, D. Progressive multiple sclerosis: Pathology and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 647–656 (2012).
66. Halestrap, A. P. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 46 821–831 (2009).
67. Godoy, J. A. *et al.* Mitostasis, calcium and free radicals in health, aging and neurodegeneration. *Biomolecules* **11**, 1012 (2021).
68. Aboul-Enein, F. *et al.* Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 25–33 (2003).
69. Smith, K. J., Kapoor, R. & Felts, P. A. Demyelination: The role of reactive oxygen and nitrogen species. *Brain Pathol.* **9**, 69–92 (1999).
70. Bechtold, D. A. *et al.* Axonal protection achieved in a model of multiple sclerosis using lamotrigine. *J. Neurol.* **253**, 1542–1551 (2006).
71. Veto, S. *et al.* Inhibiting poly(ADP-ribose) polymerase: A potential therapy against oligodendrocyte death. *Brain* **133**, 822–834 (2010).

72. Iovino, L., Tremblay, M. E. & Civiero, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. *J. Pharmacol. Sci.* **144**, 151–164 (2020).
73. Neira, F. & Ortega, J. L. Antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA en el tratamiento del dolor crónico. *Revista de la Sociedad Espanola del Dolor* vol. 11 210–222 (2004).
74. Lewerenz, J. & Maher, P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? *Front. Neurosci.* **9**, 1–20 (2015).
75. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
76. Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 49–63 (2014).
77. Izzo, V., Bravo-San Pedro, J. M., Sica, V., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol.* **26**, 655–667 (2016).
78. Angelova, P. R. & Abramov, A. Y. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters* vol. 592 692–702 (2018).
79. Casley, C. S., Canevari, L., Land, J. M., Clark, J. B. & Sharpe, M. A. β -Amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *J. Neurochem.* **80**, 91–100 (2002).
80. Manoharan, S. *et al.* The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, (2016).
81. Aslan, S. N. & Karahalil, B. Oxidative stress and Parkinson disease. *Ankara Univ. Eczac. Fak. Derg.* **43**, 94–116 (2019).
82. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J. & Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology* vol. 24 325–340 (2015).

83. Requejo-Aguilar, R. *et al.* DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1. *Biochem. J.* **467**, 303–310 (2015).
84. Delgado-Camprubi, M., Esteras, N., Soutar, M. P., Plun-Favreau, H. & Abramov, A. Y. Deficiency of Parkinson's disease-related gene Fbxo7 is associated with impaired mitochondrial metabolism by PARP activation. *Cell Death Differ.* **24**, 120–131 (2017).
85. Barber, S. C., Mead, R. J. & Shaw, P. J. Oxidative stress in ALS: A mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1762**, 1051–1067 (2006).
86. Cozzolino, M., Pesaresi, M. G., Gerbino, V., Grosskreutz, J. & Carrì, M. T. Amyotrophic lateral sclerosis: New insights into underlying molecular mechanisms and opportunities for therapeutic intervention. *Antioxidants Redox Signal.* **17**, 1277–1330 (2012).
87. Johri, A., Chandra, A. & Beal, M. F. PGC-1 α , mitochondrial dysfunction, and Huntington's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **62**, 37–46 (2013).
88. Quinti, L. *et al.* KEAP1-modifying small molecule reveals muted NRF2 signaling responses in neural stem cells from Huntington's disease patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E4676–E4685 (2017).
89. Martín-Montañez, E. *et al.* IGF-II promotes neuroprotection and neuroplasticity recovery in a long-lasting model of oxidative damage induced by glucocorticoids. *Redox Biol.* **13**, 69–81 (2017).
90. Lu, X. & Zhu, H. Tube-gel digestion: A novel proteomic approach for high throughput analysis of membrane proteins. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1948–1958 (2005).
91. Boraldi, F. *et al.* Fibroblast protein profile analysis highlights the role of oxidative stress and vitamin K recycling in the pathogenesis of pseudoxanthoma elasticum. *Proteomics - Clin. Appl.* **3**, 1084–1098 (2009).
92. Ishihama, Y. *et al.* Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1265–1272 (2005).

93. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
94. García-Fernández, M., Delgado, G., Puche, J. E., González-Barón, S. & Cortázar, I. C. Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology* **149**, 2433–2442 (2008).
95. Wu, M. *et al.* Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **292**, 125–136 (2007).
96. Heo, J. Y. *et al.* DJ-1 null dopaminergic neuronal cells exhibit defects in mitochondrial function and structure: Involvement of mitochondrial complex i assembly. *PLoS One* **7**, (2012).
97. Asle-Rousta, M., Kolahdooz, Z., Oryan, S., Ahmadiani, A. & Dargahi, L. FTY720 (Fingolimod) Attenuates Beta-amyloid Peptide (A β 42)-Induced Impairment of Spatial Learning and Memory in Rats. *J. Mol. Neurosci.* **50**, 524–532 (2013).
98. Milkovic, L., Cipak Gasparovic, A., Cindric, M., Mouthuy, P. A. & Zarkovic, N. Short Overview of ROS as Cell Function Regulators and Their Implications in Therapy Concepts. *Cells* vol. 8 793 (2019).
99. Armstrong, J. A. *et al.* Oxidative stress alters mitochondrial bioenergetics and modifies pancreatic cell death independently of cyclophilin D, resulting in an apoptosis-to-necrosis shift. *J. Biol. Chem.* **293**, 8032–8047 (2018).
100. Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q. & Griendling, K. K. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation Research* vol. 122 877–902 (2018).
101. Shi, Q. & Gibson, G. E. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *J. Neurochem.* **118**, 440–448 (2011).
102. Dai, M. *et al.* Expression of RBMX in the Light-Induced Damage of Rat Retina In Vivo. *Cell. Mol. Neurobiol.* **35**, 463–471 (2015).

103. Pathak, D., Berthet, A. & Nakamura, K. Energy failure: Does it contribute to neurodegeneration? *Ann. Neurol.* **74**, 506–516 (2013).
104. Tang, B. L. Glucose, glycolysis, and neurodegenerative diseases. *Journal of Cellular Physiology* vol. 235 7653–7662 (2020).
105. Zilberter, Y. & Zilberter, M. The vicious circle of hypometabolism in neurodegenerative diseases: Ways and mechanisms of metabolic correction. *Journal of Neuroscience Research* vol. 95 2217–2235 (2017).
106. Monteiro, J. P. *et al.* A biophysical approach to menadione membrane interactions: Relevance for menadione-induced mitochondria dysfunction and related deleterious/therapeutic effects. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 1899–1908 (2013).
107. Lakhter, A. J. *et al.* Ferroptosis: A cell death from modulation of oxidative phosphorylation and PKM2-dependent glycolysis in melanoma. *Oncotarget* **5**, 12694–12703 (2014).
108. Bai, B. *et al.* Fingolimod reduces axonal transection during demyelination. *Neurology* **84**, (2015).
109. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* vol. 435 297–312 (2011).
110. Tavakol, S. *et al.* Small molecule of sphingosine as a rescue of dopaminergic cells: A cell therapy approach in neurodegenerative diseases therapeutics. *J. Cell. Physiol.* **234**, 11401–11410 (2019).
111. Desler, C. *et al.* Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J. Aging Res.* **2012**, (2012).
112. Elfawy, H. A. & Das, B. Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sci.* **218**, 165–184 (2019).
113. Bajwa, A. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor-1 enhances mitochondrial function and reduces cisplatin-induced tubule injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 908–925 (2015).
114. Varga, B. *et al.* Translocator protein (TSPO 18 kDa) is expressed by neural stem and neuronal precursor cells. *Neurosci. Lett.* **462**, 257–262 (2009).

115. Strub, G. M. *et al.* Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB J.* **25**, 600–612 (2011).
116. Hong, S. W. *et al.* Deficiency of Sphingosine-1-Phosphate Reduces the Expression of Prohibitin and Causes β -Cell Impairment via Mitochondrial Dysregulation. *Endocrinol. Metab.* **33**, 403–412 (2018).
117. Anwar, M. R., Saldana-Caboverde, A., Garcia, S. & Diaz, F. The organization of mitochondrial supercomplexes is modulated by oxidative stress in vivo in mouse models of mitochondrial encephalopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
118. Lee, J. M., Shih, A. Y., Murphy, T. H. & Johnson, J. A. NF-E2-related factor-2 mediates neuroprotection against mitochondrial complex I inhibitors and increased concentrations of intracellular calcium in primary cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **278**, 37948–37956 (2003).
119. Cadenas, E. & Davies, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 222–230 (2000).
120. Benhar, M. Roles of mammalian glutathione peroxidase and thioredoxin reductase enzymes in the cellular response to nitrosative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **127**, 160–164 (2018).
121. Wu, H. *et al.* Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sci.* **173**, 43–54 (2017).
122. Bajpai, V. K. *et al.* Antioxidant efficacy and the upregulation of Nrf2-mediated HO-1 expression by (+)-lariciresinol, a lignan isolated from *Rubia philippinensis*, through the activation of p38. *Sci. Rep.* **7**, 1–10 (2017).
123. Koppenol, H. & Koppenol, H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. (2018).
124. Chang, A. H. K. K. *et al.* Respiratory substrates regulate S-nitrosylation of mitochondrial proteins through a thiol-dependent pathway. *Chem. Res. Toxicol.* **27**, 794–804 (2014).
125. Efstathopoulos, P. *et al.* Fingolimod induces neurogenesis in adult mouse hippocampus and improves contextual fear memory. *Transl. Psychiatry* **5**, e685–e685 (2015).

126. Hardingham, N., Dachtler, J. & Fox, K. The role of nitric oxide in pre-synaptic plasticity and homeostasis. *Front. Cell. Neurosci.* **7**, 1–19 (2013).
127. Díaz-García, C. M. *et al.* Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake. *Cell Metab.* **26**, 361-374.e4 (2017).
128. Lee, H. J. *et al.* O-cyclic phytosphingosine-1-phosphate stimulates HIF1 α -dependent glycolytic reprogramming to enhance the therapeutic potential of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
129. Ashrafi, G. & Ryan, T. A. Glucose metabolism in nerve terminals. *Curr. Opin. Neurobiol.* **45**, 156–161 (2017).
130. Trapp, B. D. & Stys, P. K. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **8**, 280–291 (2009).
131. Furst, A. J. *et al.* Cognition, glucose metabolism and amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **33**, 215–225 (2012).
132. Rone, M. B. *et al.* Oligodendroglial pathology in multiple sclerosis: Low glycolytic metabolic rate promotes oligodendrocyte survival. *J. Neurosci.* **36**, 4698–4707 (2016).
133. Hardas, S. S. *et al.* Oxidative modification of lipoic acid by HNE in alzheimer disease brain. *Redox Biol.* **1**, 80–85 (2013).
134. Geffin, R., Martinez, R., de las Pozas, A., Issac, B. & McCarthy, M. Fingolimod induces neuronal-specific gene expression with potential neuroprotective outcomes in maturing neuronal progenitor cells exposed to HIV. *J. Neurovirol.* **23**, 808–824 (2017).
135. Evangelopoulos, M. E. *et al.* Frequency and clinical characteristics of Multiple Sclerosis rebounds after withdrawal of Fingolimod. *CNS Neurosci. Ther.* **24**, 984–986 (2018).
136. Cai, R. *et al.* Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *J. Clin. Invest.* **129**, 4539–4549 (2019).
137. Manzo, E. *et al.* Glycolysis upregulation is neuroprotective as a compensatory mechanism in ALS. *Elife* 1–20 (2019).

138. Herrero-Mendez, A. *et al.* The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat. Cell Biol.* **11**, 747–752 (2009).
139. Camandola, S. & Mattson, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J.* **36**, 1474–1492 (2017).
140. Nóbrega-Pereira, S. *et al.* G6PD protects from oxidative damage and improves healthspan in mice. *Nat. Commun.* **7**, 1–9 (2016).
141. Dunn, L. *et al.* Dysregulation of glucose metabolism is an early event in sporadic Parkinson’s disease. *Neurobiol. Aging* **35**, 1111–1115 (2014).
142. Heiss, E. H., Schachner, D., Zimmermann, K. & Dirsch, V. M. Glucose availability is a decisive factor for Nrf2-mediated gene expression. *Redox Biol.* **1**, 359–365 (2013).
143. Hayes, J. D. & Ashford, M. L. J. Nrf2 orchestrates fuel partitioning for cell proliferation. *Cell Metab.* **16**, 139–141 (2012).
144. David, O. J., Kovarik, J. M. & Schmourder, R. L. Clinical pharmacokinetics of fingolimod. *Clinical Pharmacokinetics* vol. 51 15–28 (2012).
145. Brait, V. H., Tarrasón, G., Gavaldà, A., Godessart, N. & Planas, A. M. Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Agonist Is Protective Against Ischemia/Reperfusion in Mice. *Stroke* **47**, 3053–3056 (2016).
146. Kodydková, J., Vávrová, L., Kocík, M. & Žák, A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol. (Czech Republic)* **60**, 153–167 (2014).
147. Cantalupo, A. *et al.* S1PR1 (Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1) Signaling Regulates Blood Flow and Pressure. *Hypertension* **70**, 426–434 (2017).

ANEXO 1

Identificación proteica neuronal del grupo Control en comparación con el grupo FP o VitK3 o FP+VitK3, respectivamente.

FP frente al grupo control

Nº	Solo control		Comun pero diferente expresión		Solo FP	
	ID	Nombre	ID	Nombre	ID	Nombre
1	Q61210	ARHG1	P05064	ALDOA	Q9CQV8	1433B
2	Q9D9Q6	CALR3	P48036	ANXA5	P61982	1433G
3	Q64433	CH10	Q03265	ATPA	P07356	ANXA2
4	Q8VDW0	DX39A	P11499	HS90B	P35564	CALX
5	P52480	KPYM	P17742	PPIA	Q9DCH4	EIF3F
6	P24369	PIIB			P08113	ENPL
7	P62821	RAB1A			P20029	GRP78
8	Q9WV02	RBMX			Q8CCK0	H2AW
9	P62900	RL31			Q9QZQ8	H2AY
10	P99027	RLA2			Q8CGP0	H2B3B
11	P62320	SMD3			P84228	H32
12	P61957	SUMO2			P16627	HS71L
13	O08583	THOC4			P07901	HS90A
14					Q9D819	IPYR
15					Q9CPU0	LGUL
16					Q99LX0	PARK7
17					Q9DBJ1	PGAM1
18					Q99K51	PLST
19					P99029	PRDX5
20					P61027	RAB10
21					P34022	RANG
22					Q99020	ROAA
23					P62245	RS15A
24					P62270	RS18
25					P97461	RS5
26					P27048	RSMB
27					P16254	SRP14
28					Q9WVA4	TAGL2
29					P99024	TBB5
30					P80314	TCPB
31					Q01853	TERA
32					P40142	TKT

VitK3 frente grupo control						
	Solo Control		Comun pero diferente expresión		Solo Vit K3	
	ID	Name	ID	Name	ID	Name
1	P84078	ARF1	P48036	ANXA5	Q9CQV8	1433B
2	Q61210	ARHG1	Q9D9Q6	CALR3	Q9JJW6	ALRF2
3	Q8VDW0	DX39A	Q64433	CH10	P07356	ANXA2
4	Q64475	H2B1B	Q64522	H2A2B	P08030	APT
5	P34884	MIF	P08249	MDHM	Q8BSL7	ARF2
6	P35700	PRDX1	Q922R8	PDIA6	O35658	C1QBP
7	Q61171	PRDX2	P17742	PPIA	P35564	CALX
8	Q9WV02	RBMX	P61957	SUMO2	P21550	ENOB
9	P62900	RL31			Q91WJ8	FUBP1
10	P62984	RL40			P20029	GRP78
11	O08583	THOC4			P27661	H2AX
12					Q9QZQ8	H2AY
13					P15864	H12
14					Q8VEK3	HNRPU
15					P00493	HPRT
16					P16627	HS71L
17					P07901	HS90A
18					Q9QXL1	KI21B
19					P32067	LA
20					Q9CPU0	LGUL
21					Q8K595	MCLN2
22					P70670	NACAM
23					P15532	NDKA
24					P28656	NP1L1
25					Q99LX0	PARK7
26					P09103	PDIA1
27					Q99K51	PLST
28					P26350	PTMA
29					P61027	RAB10
30					P34022	RANG
31					Q9QUI0	RHOA
32					Q9CXW4	RL11
33					P35979	RL12
34					Q6ZWV7	RL35
35					P12970	RL7A
36					Q99020	ROAA
37					P62843	RS15
38					P62245	RS15A
39					P62270	RS18
40					P25444	RS2
41					P62849	RS24
42					P62983	RS27A
43					P62702	RS4X
44					P97461	RS5
45					P27048	RSMB

46	Q9WTM5	RUVB2
47	P16254	SRP14
48	Q62093	SRSF2
49	P54227	STMN1
50	P99024	TBB5
51	P80315	TCPD
52	P80318	TCPG
53	Q01853	TERA
54	Q8CAY6	THIC
55	Q60930	VDAC2

FP+VitK3 frente grupo control						
Nº	Solo Control		Comun pero diferente expresión		Solo FP+Vit K3	
	ID	Name	ID	Name	ID	Name
1	P48036	ANXA5	P05064	ALDOA	Q9CQV8	1433B
2	Q61210	ARHG1	P52480	KPYM	P07356	ANXA2
3	Q9D9Q6	CALR3	P24369	PPIB	P14211	CALR
4	Q8VDW0	DX39A	Q9WV02	RBMX	P35564	CALX
5	P34884	MIF	P62889	RL30	Q9D8N0	EF1G
6	P17742	PPIA	P62082	RS7	Q9DCH4	EIF3F
7	P35700	PRDX1	P05213	TBA1B	P21550	ENOB
8	Q61171	PRDX2			P08113	ENPL
9	P62984	RL40			P26040	EZRI
10	P99027	RLA2			Q91WJ8	FUBP1
11	P62320	SMD3			P38647	GRP75
12	P61957	SUMO2			P20029	GRP78
13	008583	THOC4			Q8R1M2	H2AJ
14					P27661	H2AX
15					Q9QZQ8	H2AY
16					Q9D2U9	H2B3A
17					Q7TMK9	HNRPQ
18					Q8VEK3	HNRPU
19					P00493	HPRT
20					P16627	HS71L
21					P07901	HS90A
22					Q9D819	IPYR
23					P07310	KCRM
24					Q9QXL1	KI21B
25					Q9CPU0	LGUL
26					Q60817	NACA
27					P70296	PEBP1
28					P09411	PGK1
29					Q99K51	PLST
30					P26350	PTMA
31					P61027	RAB10
32					P35283	RAB12
33					P34022	RANG
34					Q6ZWV7	RL35
35					P62918	RL8
36					Q99020	ROAA
37					P62245	RS15A
38					P62270	RS18
39					P25444	RS2
40					P62849	RS24
41					P62702	RS4X
42					P97461	RS5
43					P16254	SRP14
44					Q8VE97	SRSF4





45	Q9WVA4	TAGL2
46	P99024	TBB5
47	P11983	TCPA
48	P80314	TCPB
49	P80315	TCPD
50	P80318	TCPG
51	Q01853	TERA
52	Q8CAY6	THIC
53	Q8BKT7	THOC5
54	P40142	TKT
55	P15533	TR30A
56	Q60930	VDAC2

ANEXO 2

Artículos publicados

Article

Neuronal Metabolism and Neuroprotection: Neuroprotective Effect of Fingolimod on Menadione-Induced Mitochondrial Damage

Antonio Gil ^{1,†}, Elisa Martín-Montañez ^{1,2,†} , Nadia Valverde ^{2,3}, Estrella Lara ^{2,3}, Federica Boraldi ⁴, Silvia Claros ^{2,3}, Silvana-Yanina Romero-Zerbo ³ , Oscar Fernández ^{1,2}, Jose Pavia ^{1,2,*}  and Maria Garcia-Fernandez ^{2,3,*} 

¹ Department of Pharmacology and Pediatrics, Faculty of Medicine, Malaga University, 29010 Malaga, Spain; antoniogilcebrian@gmail.com (A.G.); emartinm@uma.es (E.M.-M.); oscar.fernandez.sspa@gmail.com (O.F.)

² Neuroscience Unit, Biomedical Research Institute of Malaga (IBIMA), Malaga University Hospital, 29010 Malaga, Spain; nadiavm@uma.es (N.V.); elara@uma.es (E.L.); silviacg@uma.es (S.C.)

³ Department of Human Physiology, Faculty of Medicine, Malaga University, 29010 Malaga, Spain; yaninaromero@uma.com

⁴ Department of Life Sciences, University of Modena e Reggio Emilia, 41125 Modena, Italy; federica.boraldi@unimore.it

* Correspondence: pavia@uma.es (J.P.); igf@uma.es (M.G.-F.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Imbalance in the oxidative status in neurons, along with mitochondrial damage, are common characteristics in some neurodegenerative diseases. The maintenance in energy production is crucial to face and recover from oxidative damage, and the preservation of different sources of energy production is essential to preserve neuronal function. Fingolimod phosphate is a drug with neuroprotective and antioxidant actions, used in the treatment of multiple sclerosis. This work was performed in a model of oxidative damage on neuronal cell cultures exposed to menadione in the presence or absence of fingolimod phosphate. We studied the mitochondrial function, antioxidant enzymes, protein nitrosylation, and several pathways related with glucose metabolism and glycolytic and pentose phosphate in neuronal cells cultures. Our results showed that menadione produces a decrease in mitochondrial function, an imbalance in antioxidant enzymes, and an increase in nitrosylated proteins with a decrease in glycolysis and glucose-6-phosphate dehydrogenase. All these effects were counteracted when fingolimod phosphate was present in the incubation media. These effects were mediated, at least in part, by the interaction of this drug with its specific SIP receptors. These actions would make this drug a potential tool in the treatment of neurodegenerative processes, either to slow progression or alleviate symptoms.

Keywords: sphingosine-1-phosphate receptor analogue; fingolimod phosphate; neuroprotection; mitochondrial damage; glycolytic pathway; pentose phosphate pathway; redox homeostasis



Citation: Gil, A.; Martín-Montañez, E.; Valverde, N.; Lara, E.; Boraldi, F.; Claros, S.; Romero-Zerbo, S.-Y.; Fernández, O.; Pavia, J.; Garcia-Fernandez, M. et al. Neuronal Metabolism and Neuroprotection: Neuroprotective Effect of Fingolimod on Menadione-Induced Mitochondrial Damage. *Cells* **2021**, *10*, 34. <https://doi.org/10.3390/cells10010034>

Received: 27 November 2020

Accepted: 24 December 2020

Published: 29 December 2020

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Energy is a key factor in maintaining brain function, especially for the generation of action potentials, axonal transport, synthesis and release of neurotransmitters, and synaptic function. In brain, the main sources of energy are based in the uptake and metabolism of glucose and oxygen [1], and the choice between one of those may have important consequences for brain function in both health and disease [2]. Several studies have demonstrated that many neurodegenerative diseases are triggered or maintained by metabolic alterations [3,4]. During aging, a certain decrease in glucose and oxygen metabolism can be seen [3], but a more dramatic decrease is found in disorders such as Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Parkinson's disease (PD), and Huntington's disease (HD) [5]. The need of energy to maintain its function and integrity is much

Article

Impact of Glucocorticoid on a Cellular Model of Parkinson's Disease: Oxidative Stress and Mitochondrial Function

Silvia Claros ¹, Antonio Gil ², Mauro Martinelli ^{1,3}, Nadia Valverde ² , Estrella Lara ¹ , Federica Boraldi ³ , Jose Pavia ² , Elisa Martín-Montañez ^{2,*}  and María Garcia-Fernandez ^{1,*} 

¹ Department of Human Physiology, Faculty of Medicine, Malaga University, Biomedical Research Institute of Malaga, 29010 Malaga, Spain; silviacg@uma.es (S.C.); mauro.o210431@gmail.com (M.M.); elara@uma.es (E.L.)

² Department of Pharmacology and Paediatrics, Faculty of Medicine, Malaga University, Biomedical Research Institute of Malaga, 29010 Malaga, Spain; antoniogilcebrian@gmail.com (A.G.); nadiavm@uma.es (N.V.); pavia@uma.es (J.P.)

³ Department of Life Sciences, University of Modena e Reggio Emilia, 41125 Modena, Italy; federica.boraldi@unimore.it

* Correspondence: emartinm@uma.es (E.M.-M.); igf@uma.es (M.G.-F.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Stress seems to contribute to the neuropathology of Parkinson's disease (PD), possibly by dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. Oxidative distress and mitochondrial dysfunction are key factors involved in the pathophysiology of PD and neuronal glucocorticoid-induced toxicity. Animal PD models have been generated to study the effects of hormonal stress, but no in vitro model has yet been developed. Our aim was to examine the impact of corticosterone (CORT) administration on a dopaminergic neuronal cell model of PD induced by the neurotoxin MPP⁺, as a new combined PD model based on the marker of endocrine response to stress, CORT, and oxidative-mitochondrial damage. We determined the impact of CORT, MPP⁺ and their co-incubation on reactive oxygen species production (O₂^{-•}), oxidative stress cellular markers (advanced-oxidation protein products and total antioxidant status), mitochondrial function (mitochondrial membrane potential and mitochondrial oxygen consumption rate) and neurodegeneration (Fluoro-Jade staining). Accordingly, the administration of MPP⁺ or CORT individually led to cell damage compared to controls ($p < 0.05$), as determined by several methods, whereas their co-incubation produced strong cell damage ($p < 0.05$). The combined model described here could be appropriate for investigating neuropathological hallmarks and for evaluating potential new therapeutic tools for PD patients suffering mild to moderate emotional stress.

Keywords: mitochondria; oxidative distress; hormonal stress; Parkinson's disease



Citation: Claros, S.; Gil, A.; Martinelli, M.; Valverde, N.; Lara, E.; Boraldi, F.; Pavia, J.; Martín-Montañez, E.; Garcia-Fernandez, M. Impact of Glucocorticoid on a Cellular Model of Parkinson's Disease: Oxidative Stress and Mitochondrial Function. *Brain Sci.* **2021**, *11*, 1106. <https://doi.org/10.3390/brainsci11081106>

Academic Editor: Gabriella Silvestri

Received: 27 July 2021

Accepted: 20 August 2021

Published: 22 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a progressive, multifactorial neurodegenerative disease affecting approximately 1–2% of the population over 65 years of age [1,2]. The pathogenesis of this disease is characterised by the involvement of multiple pathways and mechanisms, such as oxidative distress and mitochondrial dysfunction [3], that ultimately produce a loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra [4,5]. This loss leads to bradykinesia and other motor disorders which are key for diagnosis, although the disease comes with other non-motor symptoms, such as cognitive impairment, sleep disorders and depression, which increase disability [3]. Chronically repeated episodes of emotional stress, moreover, seem to have an impact on the development of neurodegenerative diseases such as PD [6,7], and it has been suggested that a dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) occurs in PD [8]. This dysregulation may be involved in triggering, exacerbation or progression of the disease.

The extensive production of reactive oxygen species (ROS) in the brain may provide an explanation for the magnitude of the role that these molecules play in PD. The brain