

Papel del estrés oxidativo y del coenzima Q en la patología asociada a procesos neurodegenerativos y neurooncológicos

Javier Frontiñán Rubio



Memoria del trabajo realizado para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Castilla-La Mancha

Departamento de Ciencias Médicas

Centro Regional de Investigaciones Biomédicas

Facultad de Medicina de Ciudad Real

Grupo de Estrés Oxidativo y Neurodegeneración (GEON)

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud

Directores: Mario Durán Prado y Fco. Javier Alcaín Tejada

Tutor: Fco. Javier Alcaín Tejada

D. Mario Durán Prado, Contratado Doctor del Área de Biología Celular del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla-La Mancha,

Certifica:

Que D. Javier Frontiñán Rubio, Licenciado en Biología por la Universidad de Córdoba y Máster en Biomedicina Experimental de la Universidad de Castilla la Mancha, ha realizado, bajo su dirección y con el máximo aprovechamiento, la Tesis Doctoral titulada: "Papel del estrés oxidativo y del coenzima Q en la patología asociada a procesos neurodegenerativos y neurooncológicos" para la obtención del grado de Doctor.

Y, para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado:

Mario Durán Prado

En Ciudad Real, a 29 de febrero de 2016

D. Francisco Javier Alcaín Tejada, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Castilla-La Mancha,

Certifica:

Que D. Javier Frontiñán Rubio, Licenciado en Biología por la Universidad de Córdoba y Máster en Biomedicina Experimental de la Universidad de Castilla la Mancha, ha realizado, bajo su dirección y con el máximo aprovechamiento, la Tesis Doctoral titulada: "Papel del estrés oxidativo y del coenzima Q en la patología asociada a procesos neurodegenerativos y neurooncológicos" para la obtención del grado de Doctor.

Y, para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firma el presente certificado:

Francisco Javier Alcaín Tejada
En Ciudad Real, a 29 de febrero de 2016

Este trabajo de investigación ha sido financiado por la Universidad de Castilla-La Mancha (GE20112221), la Fundación James S. MacDonnell (220020351), la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha (PPII-2014-010-P), la Diputación Provincial de Ciudad Real (DIPUCR-3) y Kaneka Corporation.

Asimismo, el doctorando D. Javier Frontiñán Rubio ha sido beneficiario de una beca de la Diputación Provincial de Ciudad Real (DIPUCR-3), contrato asociado al proyecto 220020351 de la James S. MacDonnell y una beca asociada a la ayuda a grupos de investigación 2015-BCL-5486 de la UCLM.

El doctorando también ha obtenido ayudas y becas para la asistencia a congresos de carácter nacional e internacional de la Sociedad Española de Biología Celular (SEBC).



Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al colérico Poseidón,
seres tales jamás hallarás en tu camino,
si tu pensar es elevado, si selecta
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al salvaje Poseidón encontrarás,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no los yergue tú alma ante ti.

Pide que el camino sea largo.
Que muchas sean las mañanas de verano
en que llegues -¡con qué placer y alegría!-
a puertos nunca vistos antes.
Detente en los emporios de Fenicia
y hazte con hermosas mercancías,
nácar y coral, ámbar y ébano
y toda suerte de perfumes sensuales,
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.
Ve a muchas ciudades egipcias
a aprender, a aprender de sus sabios.

Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Más no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca.

Ítaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Ítacas

C.P. Kavafis

Agradecimientos

A todos los que en algún momento han puesto de su parte para que me dedique a la investigación científica, profesores, compañeros, escritores, etc. A todos mis amigos de Córdoba y de Ciudad Real por haber hecho de la época universitaria y de este periodo predoctoral un cúmulo de buenos recuerdos.

A mis compañeros de la Facultad de Medicina de Ciudad Real por haberme facilitado el trabajo en todo momento y haberme apoyado. A mis compañeros del Grupo de Estrés oxidativo y neurodegeneración por haberme acogido desde el primer día. A mis directores de tesis Mario Durán y Fco. Javier Alcaín por haber aguantado todos mis despistes.

A mi familia por haber estado siempre a mi lado y a Alicia por aguantarme cada día.

Y a ti lector, solo por el hecho de tener este libro en tus manos, significa que ya has hecho algo por él.

Índice

Resumen	5
Palabras clave	7
Abreviaturas	9
Introducción	11
Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno	15
Especies reactivas de oxígeno	17
Principales ROS y RNS	18
Maquinaria antioxidante	19
Implicación del estrés oxidativo en estados patológicos.....	22
Coenzima Q10	25
Distribución del CoQ10 y actividad antioxidante.....	27
Uso terapéutico del CoQ10.....	29
Enfermedad de Alzheimer	32
Estrés oxidativo.....	35
Patología vascular	37
Terapia con antioxidantes	39
Modelos murinos.....	40
Glioblastoma Multiforme	43
Principales <i>hallmarks</i> del GBM	45
Estrés oxidativo.....	54
Terapia con antioxidantes	55
Modelos murinos.....	56
Hipótesis y objetivos	59
Material y métodos	63
Experimentación <i>in vitro</i>	67
Líneas celulares.....	67
Tratamientos	67
Técnicas de biología celular	69
Técnicas para el estudio del estrés oxidativo	74
Técnicas para el estudio de la motilidad e invasión celular.....	77
Técnicas para determinar niveles de proteínas, lípidos y metabolitos	80
Experimentos <i>in vivo</i>	86
Modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer	86
Modelos para el estudio del glioblastoma multiforme	88
Técnicas para el estudio de muestras de sangre	91
Técnicas histológicas.....	92

Cuantificación y obtención de resultados	97
Análisis estadístico.....	105
Tabla de anticuerpos.....	107
Resultados.....	109
Resumen general de los resultados	111
Capítulo I. La neofobia, NQO1 y SIRT1 como indicadores de la fase prodrómica de la enfermedad de Alzheimer en ratones 3xTg-AD.....	118
Capítulo II. El Coenzima Q10 protege a células endoteliales humanas del daño inducido por β -amiloide y el estrés oxidativo.....	121
Capítulo III. El CoQ10 reduce el depósito de placas de β A, la hipoxia y el grosor de la lámina basal de la microvasculatura cerebral en ratones 3xTg-AD	132
Capítulo IV. El CoQ10 sensibiliza a la línea celular humana de glioblastoma U251 frente a radiación y a temozolomida	145
Capítulo V. El CoQ10 regula la proliferación, motilidad y capacidad invasiva de células de GBM U251 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	164
Capítulo VI. El CoQ10 regula la angiogénesis e inflamación en GBM <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	182
Discusión	193
Enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo y patología vascular.....	197
Modulación espaciotemporal de los sistemas antioxidantes en cerebros de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 3xTgAD	197
Efecto del CoQ10 exógeno sobre la muerte celular inducida por el péptido β A en células endoteliales humanas.....	200
Efecto del ubiquinol sobre la patología amiloidea y la patología vascular en el modelo de ratón 3xTgAD	205
El CoQ10 modula características fisiopatológicas del GBM	214
Efecto del CoQ10 exógeno sobre el nivel de ROS, balance redox, respuesta radioadaptativa y quimioresistencia	215
Efecto del CoQ10 sobre el crecimiento, remodelación energética, motilidad e invasión tumoral	223
El CoQ afecta a los procesos de angiogénesis y a la infiltración de células inflamatorias en modelos de GBM	231
Conclusiones.....	239
Anexos	243

Anexo I. Información adicional de Materiales y Métodos	245
Anexo 1.1. Cultivos celulares	245
Anexo 1.2. Soluciones y reactivos.....	247
Anexo 1.3. Modelos animales.....	250
Anexo 1.5. Otros	252
Anexo II. Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral	255
Anexo III. Resultados adicionales	275
<i>Bibliografía.....</i>	<i>277</i>

Resumen

El estrés oxidativo subyace a una gran variedad de enfermedades, entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer. En la enfermedad de Alzheimer (EA), el estrés oxidativo aparece en etapas muy iniciales de la enfermedad y está asociado con alteraciones clave como la patología vascular. El β -amiloide (β A), proteína patológica de la EA, es un fuerte inductor de estrés oxidativo y de la patología vascular.

El glioblastoma multiforme, es el principal tipo tumoral del sistema nervioso central. Es un tumor muy agresivo, altamente infiltrativo y resistente a terapias. Subyaciendo a estas características aparece el estrés oxidativo y la alteración de la maquinaria antioxidante.

La hipótesis de la presente Tesis Doctoral, propone el uso del coenzima Q10, un antioxidante lipofílico, para reducir el incremento de estrés oxidativo (EO) detectado en etapas iniciales de ambas patologías.

En la enfermedad de Alzheimer, se observó como en el modelo animal 3xTg-AD existe una alteración en la expresión de enzimas antioxidantes en etapas muy iniciales de la enfermedad, tanto en hipocampo como en corteza cerebral, lo que sugiere un sistema de defensa frente al daño oxidativo temprano que con el avance de la enfermedad se vuelve ineficaz. Este daño oxidativo, actúa también sobre el endotelio cerebral, produciendo la patología vascular que acompaña a la EA. Por ello, se estudió el uso de CoQ10 para reducir el daño oxidativo inducido por el β -amiloide en células endoteliales de vasculatura humana, *in vitro*. Se observó como el pre-tratamiento con CoQ10, protege frente al daño inducido por el β A, disminuyendo su capacidad de incorporarse a mitocondrias, a través de una modulación de los niveles de ROS y de la homeostasis de Ca^{2+} . El siguiente paso fue estudiar el efecto del CoQ10 sobre la vasculatura y el daño inducido por el β A en el modelo 3xTg-AD. Se observó como el tratamiento con CoQ10 desde los primeros meses, redujo marcadores de estrés oxidativo en plasma, se vio un menor engrosamiento de la lámina basal en vasculatura cerebral, un descenso en el depósito de placas de β A y de hipoxia, y un descenso en los niveles de BACE-1, enzima clave en la producción de β A.

En el glioblastoma multiforme (GBM), el CoQ10 moduló la resistencia a terapias y redujo el crecimiento, y la capacidad invasiva y migratoria de las células *in vivo* e *in vitro*. En primer lugar, el pre-tratamiento de células de GBM humano con CoQ10 reguló la cantidad de anión superóxido mitocondrial, reduciéndose los niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa 2 o de moléculas como el lactato. Este descenso de las enzimas antioxidantes potenció el efecto citotóxico inducido por la radiación ionizante. También se estudió el efecto

quimiosensibilizador del CoQ10 junto a temozolomida *in vitro* e *in vivo*. Se vio que el tratamiento combinado de ambos incrementó la apoptosis y también procesos de senescencia y de autofagia. En el modelo de xenoinplante los tumores de ratones tratados con CoQ10 y TMZ apenas mostraron un incremento en el tamaño. Además, se produjo un incremento en la muerte celular en el co-tratamiento con radioterapia y el citotóxico temozolomida. El CoQ10 redujo la respuesta hipóxica disminuyendo el nivel de HIF-1 α , un factor de transcripción que afecta a procesos clave para el crecimiento del GBM. También se redujeron los niveles de metabolitos esenciales como aminoácidos o ATP y de la fosforilación de las quinasas Akt, AMPK y Erk. El tratamiento redujo la motilidad celular e invasión *in vitro* disminuyendo la secreción de factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios. Se desarrolló un modelo de xenoinplante y uno ortotópico en ratones inmunodeficientes, el tratamiento con CoQ10 redujo el crecimiento tumoral y se produjo una disminución en la migración e infiltración de estas células tumorales, y descenso de la inflamación y reclutamiento de nuevos vasos.

En definitiva, el CoQ10 podría ser una molécula clave en la modulación de la homeostasis que subyace en diferentes enfermedades. En la presenta Tesis Doctoral, hemos demostrado como su uso tanto *in vitro* como *in vivo* reduce procesos clave en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y del glioblastoma multiforme.

Palabras clave



Abreviaturas

·NO	Óxido nítrico
3xTg-AD	Modelo triple transgénico de Alzheimer
4HNE	4-hidroxinonal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
APOE ₄	Apolipoproteína E ϵ_4
APP	Precursor del péptido amiloide
BACE-1	B-secretasa
BBB	Barrera hematoencefálica
BCA	Ácido bicinconínico
BPSD	Síntomas comportamentales y psicóticos asociados a la demencia
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CAT	Catalasa
CoQ ₁₀	Coenzima Q ₁₀
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECM	Matriz Extracelular
ECs	Células endoteliales
ecSOD	Superóxido dismutasa extracelular
EO	Estrés oxidativo
EtBr	Bromuro de Etidio
EtOH	Etanol
FBS	Suero Fetal Bovino
FOXO	<i>Transcription Factor of the forkhead box</i>
GBM	Glioblastoma Multiforme
GPx	Glutación peroxidasa
GSC	Células madre glial
GSH	Glutación
Gy	Grey
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HIF-1	Factor Inducible por hipoxia 1
HO·	Radical hidroxilo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
ICC	Inmunocitoquímica
IHC	Inmunohistoquímica
IL-8	Interleuquina 8
MDA	Malondialdehído
MGMT	O ⁶ -metilguanina metil transferasa

mtETC	Cadena de transporte electrónico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NOS	Óxido nítrico sintasa
NQO1	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1
O ₂ ⁻	Anión superóxido
ONOO-	Oxinitrito
oxLDL	Lipoproteína de baja densidad oxidada
OXFOS	Fosforilación oxidativa
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PFKP	Isoforma plaquetaria de la fosfofructoquinasa
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Kinasa
PMRS	Sistema redox de la membrana plasmática
PS1	Presenilina 1
PSEN1	Presenilina 1
PTEN	Homólogo de la fosfatasa y tensina
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SIRT1	Sirtuína 1
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD2	Superóxido dismutasa 2
TMZ	Temozolomida
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UQ10	Ubiquinona oxidada
UQ10H ₂	Ubiquinol reducido
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
WHO	Organización Mundial de la Salud
βA	β-amiloide

Introducción



Javier Frontiñán Rubio

**Hay que estudiar la enfermedad con la
sensibilidad de un novelista**

Oliver Sacks

Índice de figuras de la "Introducción"

Figura 1. Balance oxidativo celular

Figura 2. Formación de las principales ROS

Figura 3. Principales reacciones de detoxificación de ROS

Figura 4. Regulación de ROS

Figura 5. Esquema que representa el sistema PMRS

Figura 6. Efectos del incremento de hipoxia y ROS en cáncer

Figura 7. Estructura y síntesis del CoQ10

Figura 8. Procesamiento del APP

Figura 9. Relación del estrés oxidativo con la enfermedad de Alzheimer

Figura 10. Daño endotelial generado por el β A

Figura 11. Modelos animales utilizados para el estudio de la EA

Figura 12. Modelo 3xTg-AD

Figura 13. Ejemplo de pseudoempalizada

Figura 14. Principales *hallmarks* del GBM

Figura 15. Regulación y funciones del HIF-1 α

Figura 16. Esquema del desarrollo temporal de la terapia frente al GBM

Índice de tablas de la "Introducción"

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno

Tabla 2. Funciones del CoQ10

Tabla 3. Relación fisiológica y clínica del CoQ10 con diferentes patologías

Tabla 4. Ensayos clínicos con terapias antioxidantes

Tabla 5. Ensayos con terapias antioxidantes

Javier Frontiñán Rubio

Estrés oxidativo y especies reactivas de oxígeno

El estado rédox celular es el resultado del balance entre elementos prooxidantes y antioxidantes/reductores en la célula. Este balance juega un papel decisivo para la propia supervivencia de la célula y en la homeostasis fisiológica del organismo, pues determina el estado en que se encuentran muchas de sus moléculas así como las interacciones que podrían darse entre ellas. Las células presentan de modo natural componentes muy diversos con propiedades oxidantes y reductoras o antioxidantes. Se habla de estrés oxidativo (EO) cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes, independientemente de su origen. Helmut Sies, que introdujo esta expresión, lo define como una alteración en el balance prooxidante-antioxidante a favor del primero, dando lugar a un daño potencial (Sies and Cadenas 1985) conocido como daño oxidativo.

El daño oxidativo lo causan las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se definen como moléculas que tienen uno o más átomos de oxígeno químicamente reactivos. Las ROS pueden ser radicales libres, que son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados. Las principales ROS (Tabla 1) son el radical hidroxilo, el superóxido, el óxido nítrico, el peróxido de hidrogeno, el peroxinitrito, el radical alcoxilo y el radical peroxilo.

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno

Intermediario	Fórmula	Vida Media
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	10^{-9} seg
Radical alcoxilo	$\text{RO}\cdot$	10^{-6} seg
Peroxinitrito	$\text{RNOO}\cdot$	0,05 – 1,0 seg
Radical peroxilo	$\text{ROO}\cdot$	7 seg
Óxido Nítrico	$\cdot\text{NO}$	1 – 10 seg
Radical semiquinona	----	días
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Desc. enzimática
Anión superóxido	O_2^-	Desc. enzimática

Un incremento de ROS en las células y tejidos produce un daño celular y tisular, ya que produce la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y lipoproteínas produciéndose un daño en las membranas. Las ROS también pueden romper la doble hélice del DNA nuclear produciendo mutaciones que pueden originar cáncer (Halliwell 1989). Dicho daño puede ocurrir sobre el DNA mitocondrial (mtDNA) produciendo una disfunción mitocondrial y envejecimiento. También afectan a las proteínas, oxidándolas y produciendo su agregación, fragmentación o pérdida de funcionalidad. Aunque los radicales libres y el estrés oxidativo se consideran elementos perjudiciales para las células, niveles bajos de

Javier Frontiñán Rubio

radicales libres son necesarios para el mantenimiento de procesos celulares (Castagne, Gautschi et al. 1999).

Algunos ROS tienen una causa externa como la contaminación ambiental, pesticidas, aditivos alimentarios, fuentes de radiación o hábitos como el tabaquismo (Lushchak 2014), pero muchos de estos radicales se originan como consecuencia del propio metabolismo celular. Sus niveles se mantienen dentro de unos márgenes compatibles con el buen funcionamiento de la célula, gracias a moléculas pequeñas con capacidad antioxidante que sintetizamos de manera natural, como el CoQ10 o ingerimos con la dieta, como el tocoferol o el ascorbato y por la acción de un sistema de enzimas antioxidantes.

Las células, por lo tanto, contrarrestan esta producción de radicales libres por medio de una gran variedad de mecanismos antioxidantes. El balance reducción/oxidación (redox) de la célula se mantiene en condiciones fisiológicas gracias al equilibrio entre especies pro-oxidantes (especies reactivas de oxígeno o ROS y especies reactivas de nitrógeno o RNS) y compuestos antioxidantes. Dicho balance determinará el estado de la homeostasis redox celular o estado de equilibrio entre reacciones de oxidación y reducción.

El estrés oxidativo (EO) ocurre cuando se altera este equilibrio hacia un estado pro-oxidante. Ocurre por un incremento en las ROS y RNS o por un descenso en la maquinaria antioxidante. El descenso en la maquinaria antioxidante, a su vez, puede ocurrir por la inactivación de enzimas antioxidantes, el descenso en la producción de moléculas antioxidantes, o una combinación de ambos (Figura 1). Estas alteraciones subyacen a una gran variedad de enfermedades y condiciones patológicas (Liu and Schubert 2009).

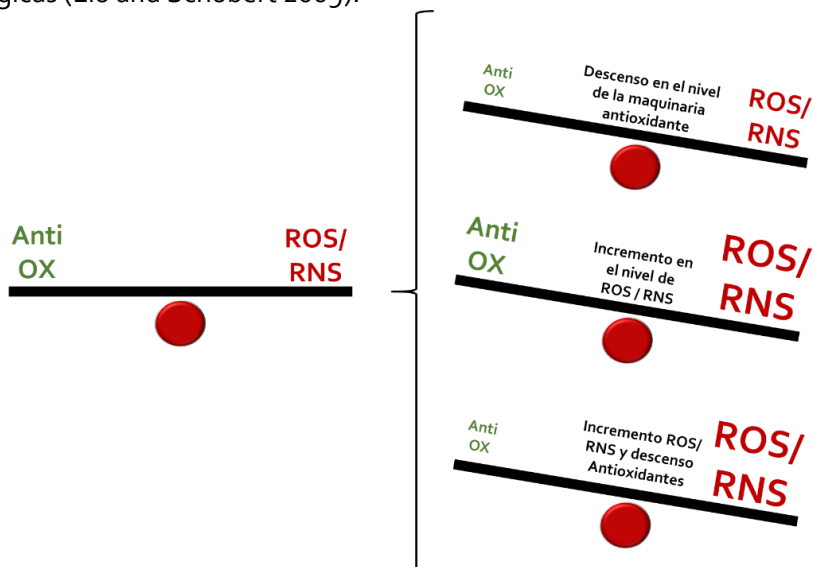


Figura 1. Balance oxidativo celular. El estrés oxidativo puede ocurrir por un desbalance en los niveles de ROS/RNS, de la maquinaria antioxidante o por una combinación de ambos.

El concepto de EO surgió hace 30 años y en un principio, se definió como el exceso de agentes pro-oxidativos sobre la maquinaria antioxidante (Sies and Cadenas 1985, Sies 2015). En los 10 años siguientes el concepto se redefinió y el EO se asoció gran variedad de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o cáncer. Durante los últimos años, este concepto se ha seguido modificando al observar su relación con la mayoría de los procesos celulares hasta llegar al concepto más reciente de "señalización redox" (Jones 2006). Este concepto se basa en que las ROS pueden actuar como moléculas señalizadoras regulando diferentes procesos biológicos y fisiológicos (Finkel 2011), mediante mecanismos como la oxidación de residuos de cisteína por medio del peróxido de hidrógeno (Rhee 2006).

Para entender el concepto del estrés oxidativo hay que conocer sus elementos en profundidad, tanto las especies pro-oxidativas como la maquinaria antioxidante.

Especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres son moléculas que presentan un electrón desapareado. Esto les ofrece una propensión a interactuar con diferentes moléculas, ya sea cediéndoles dicho electrón (reducción) o captando otro electrón (oxidación) para estabilizar su orbital. En el interior de las células, estos radicales, suelen actuar sobre moléculas que no lo son, induciendo la formación de nuevos radicales libres (Cabiscol, Tamarit et al. 2000). Esto implica una pérdida de función de la molécula que reacciona y el inicio de una cascada de formación de radicales libres (Mark, Pang et al. 1997).

Las ROS engloban los radicales libres que contienen átomos de oxígeno y las moléculas que no son radicales libres pero que tienen gran capacidad de reaccionar y convertirse en ellos, como es el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Saran, Michel et al. 1990, Halliwell 1992, Halliwell 1997). También existen las especies reactivas de nitrógeno (RNS) en las cuales los radicales libres contienen oxígeno y nitrógeno. Estas RNS también juegan un papel crucial en el daño oxidativo que acontece en las células (Adams, Franco et al. 2015).

Las ROS derivan del O_2 consumido en reacciones metabólicas que llevan a cabo mitocondrias, peroxisomas y retículo endoplasmático (Handy and Loscalzo 2012). Se considera que las mitocondrias son las mayores productoras de ROS, de hecho se estima que el 2% del O_2 consumido en la respiración celular se transforma en radicales libres en forma de superóxido (Handy and Loscalzo 2012). Por tanto, la mitocondria es considerada la mayor fuente de ROS, generando más del 90% (Handy and Loscalzo 2012). Esta producción de ROS está asociada a la producción de ATP por parte de la cadena de transporte electrónico (mtETC) (Kussmaul and Hirst 2006).

Javier Frontiñán Rubio

Las ROS son producidas constantemente tanto por procesos enzimáticos como no enzimáticos. Entre las enzimas que catalizan la formación de ROS podemos encontrar la NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidasa, xantina oxidasa y enzimas metabólicas como lipoxigenasa o ciclooxigenasa (Handy and Loscalzo 2012). La mtETC es la principal fuente no enzimática de ROS.

Debido a su naturaleza inestable, las ROS producen daños sobre lípidos, proteínas y DNA:

- Sobre lípidos producen peroxidación lipídica, un proceso que afecta a ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la membranas lipídicas (Handy and Loscalzo 2012). Esto induce una alteración de la permeabilidad de las membranas celulares y la pérdida de la asimetría lipídica pudiendo inducir la muerte de las células (Cheeseman and Slater 1993).
- Sobre las proteínas, las ROS pueden actuar tanto sobre residuos aminoacídicos como sobre los grupos hidroxilo. Son especialmente vulnerables aminoácidos como la cisteína, tirosina o triptófano (entre otros). La oxidación de estos residuos puede inducir cambios conformacionales que lleven a la pérdida de función proteica (Davies 1987, Cabiscol, Tamarit et al. 2000).
- Sobre el DNA, los procesos oxidativos actúan a diferentes niveles, como oxidación de bases nitrogenadas, deleciones, fragmentaciones, demetilaciones, etc. (Fraga, Shigenaga et al. 1990). La actividad de las ROS puede afectar a oncogenes y genes supresores de tumores, teniendo un papel crucial en la carcinogénesis (Fraga, Shigenaga et al. 1990).

Principales ROS y RNS

Diferentes radicales libres como el anión superóxido o el radical hidroxilo, junto con moléculas altamente reactivas como el peróxido de hidrógeno son las principales ROS. Es importante destacar también el papel que tienen algunas RNS, junto a las ROS pueden interactuar favoreciendo un *feedback* pro-oxidativo (Figura 2):

- Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A pesar de que no es una especie altamente reactiva, puede desencadenar la activación de otras ROS, ya que dismuta a H_2O_2 por acción de superóxido dismutasas, induciendo peroxidación lipídica y oxidación de proteínas (Fridovich 1997). Indirectamente puede actuar sobre rutas de señalización inflamatorias como la del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Aluise, Miriyala et al. 2011).
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). No es un radical libre, aun así tiene gran facilidad de ser oxidado en presencia de hierro. Se produce por acción de diferentes enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) o la glucosa oxidasa que procesan el superóxido producido por las mitocondrias y la

NADPH oxidasa. Produce radical hidroxilo y puede actuar oxidando grupos tioles de cisteínas, modificando la actividad de proteínas (Rahal, Kumar et al. 2014). Tiene gran facilidad para atravesar membranas (Janolino and Swaisgood 1975).

- Radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$). Se le atribuye más del 50% del daño ocasionado por las ROS. A nivel biológico se forma por la reacción de Fenton, a partir de peróxido de hidrógeno y en presencia de Fe^{2+} o Cu^+ (Halliwell 1989). Oxida lípidos, proteínas y DNA indistintamente, llegando a producir inestabilidad genómica.
- Óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Se forma enzimáticamente a partir de la arginina, por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS). Tiene funciones beneficiosas como la de neurotransmisor, relajación del músculo liso vascular o funciones antitumorales y antimicrobianas (Shinde, Mehta et al. 2000). En concentraciones elevadas puede actuar sobre el DNA produciendo mutaciones y rotura, provocando apoptosis (Bonfoco, Krainc et al. 1995). Puede reaccionar con el $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar peroxinitrito.
- Peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\cdot-}$). Se puede formar por la reacción del $\cdot\text{NO}$ con el $\text{O}_2^{\cdot-}$. Induce degradación de hidratos de carbono, iniciar peroxidación lipídica y fragmentar el DNA (Beckmann, Ye et al. 1994).

Maquinaria antioxidante

Las células han desarrollado una compleja maquinaria antioxidante para protegerse del daño producido por elevadas concentraciones de ROS y RNS. En condiciones de homeostasis, se produce un equilibrio entre la maquinaria antioxidante y las especies reactivas (Liu and Schubert 2009).

Una molécula antioxidante es aquella que retrasa o inhibe la oxidación de otras moléculas. La defensa antioxidante de la célula se basa en moléculas pequeñas con capacidad antioxidante que sintetizamos de manera natural o ingerimos con la dieta, como el CoQ10, ácido lipóico, bilirrubina, urato, glutatión, β -carotenos, tocoferol, vitamina C. Además de diversos sistemas enzimáticos con actividad antioxidante que están regulados principalmente por los factores de transcripción Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor* que regula a las enzimas NAD(P)H:quinone oxidoreductasa 1 (NQO1), glutatión reductasa, hemoxygenasa 1 tioredoxina reductasa, etc.), FOXO (*Transcription factors of the forkhead box class O*) que regula a las enzimas catalasa (CAT) y las superóxido dismutasas 1 y 2 (SOD1 y 2) entre otras (Frei, Stocker et al. 1988, Gorrini, Harris et al. 2013, Klotz, Sanchez-Ramos et al. 2015).

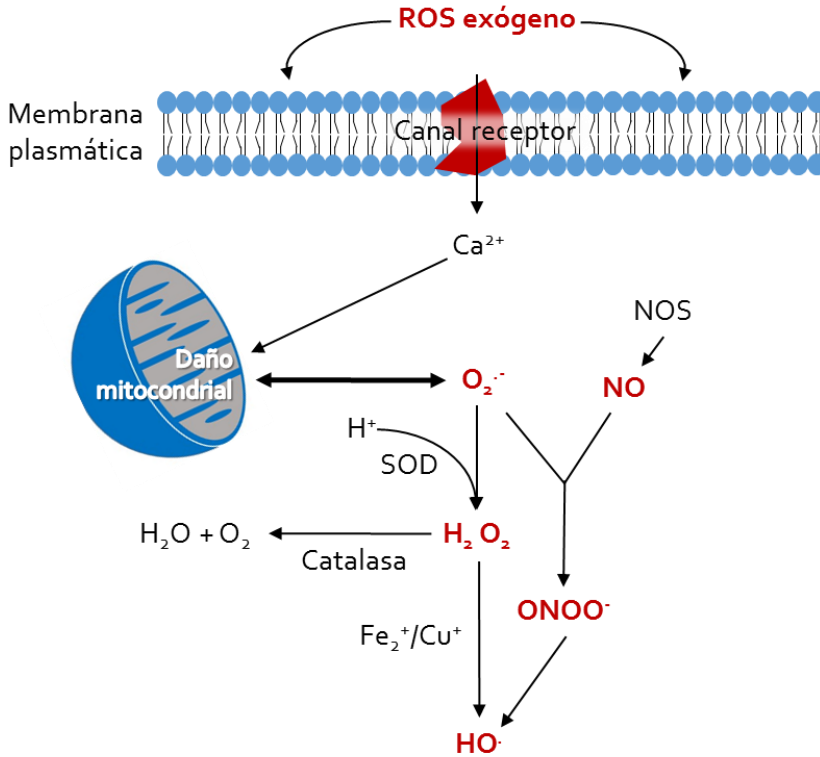


Figura 2. Formación de las principales ROS. Formación de las diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS, en negrita y rojo), a partir de efectos endógenos o exógenos. La principal fuente de formación de ROS es la mitocondria, pero otros orgánulos, como el retículo endoplasmático y los peroxisomas o efectos exógenos también pueden ser una fuente de ROS y RNS.

Los sistemas enzimáticos son los más eficaces, impiden la formación de radicales libres a partir de otras moléculas como la NQO1 (Alcain and Villalba 2007) y si ya se han formado dichos radicales libres, catalizan su conversión en moléculas menos dañinas para el organismo (Alcain and Villalba 2007). Los ejemplos más destacados son las SOD1 del citosol y SOD2 de la matriz mitocondrial, CAT, Glutatión peroxidasa (GPx) y tiorredoxina reductasa (TrxR) (Shivakumar, Anandatheerthavarada et al. 1991). Normalmente, ante un incremento del estrés oxidativo se incrementa la expresión de las enzimas antioxidantes, siendo el principal sistema de defensa antioxidante celular.

Los antioxidantes no enzimáticos, son aquellos compuestos que donan sus electrones a los radicales libres para neutralizarlos. Entre estos destaca el glutatión (GSH), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), coenzima Q10 (CoQ10), polifenoles, antocianinas, carotenoides, etc. (Lushchak 2014). El GSH juega un papel fundamental ya que actúa como cofactor de diferentes enzimas que detoxifican ROS y se regula estrictamente por diferentes rutas. Además de actuar

como cofactor, también neutraliza el óxido nítrico (Lushchak 2012, Uys, Mulholland et al. 2014) (Figura 3).

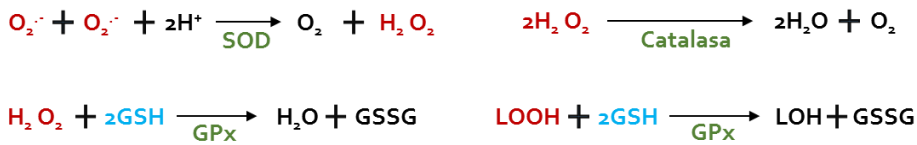


Figura 3. Principales reacciones de detoxificación de ROS. Algunas de las principales reacciones de detoxificación de ROS mediadas por el sistema antioxidante. En rojo se muestran las ROS, en verde, las enzimas antioxidantes y en azul, compuestos antioxidantes no enzimáticos

Las ROS están reguladas por una serie de factores prooxidantes o antioxidantes. Entre los factores prooxidantes destacan las alteraciones metabólicas, el estrés de retículo, la hipoxia y la acción de oncogenes como Myc y Ras. Los niveles de ROS se reducen por las enzimas y compuestos antioxidantes, así como por ciertos genes supresores de tumores como *breast cancer susceptibility 1* (BRCA1), p53, *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), FOXO (Gorrini, Harris et al. 2013) (Figura 4).

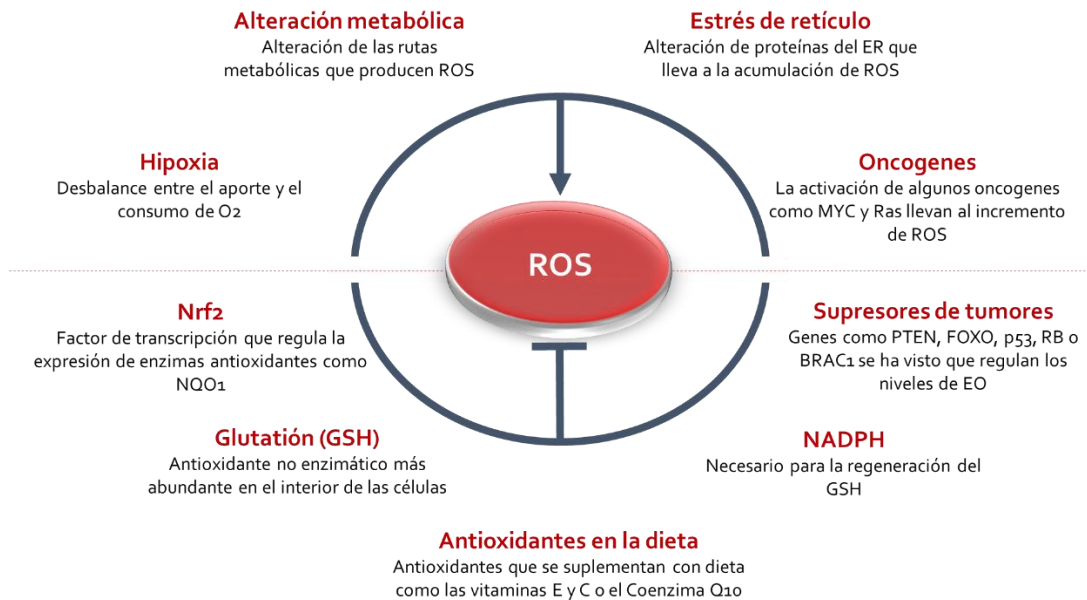


Figura 4. Regulación de ROS. Muchos procesos celulares como el estrés de retículo y la activación de oncogenes, o sistémicos como la hipoxia o alteraciones metabólicas generan ROS. El incremento en los niveles de ROS contrarrestados por la presencia de moléculas antioxidantes de síntesis endógena como el GSH, CoQ, NADH, por la acción de antioxidantes de la dieta y por la inducción de enzimas. Algunos genes supresores de tumores como, FOXO, BRAC1 o PTEN también regulan los niveles de ROS (modificado de Gorrini, Harris et al. 2013).

Uno de los mecanismos de defensa celulares frente al estrés oxidativo es el sistema redox de la membrana plasmática (PMRS) (Figura 5). Entre sus componentes, destacan las quinonas reductasas asociadas a la membrana como la NQO1 y

citocromo b₅ reductasa y antioxidantes lipofílicos como el CoQ₁₀ y tocoferol (Navas, Villalba et al. 2007, Adlard and Bush 2011). Este sistema reduce el nivel de ROS a través de distintos componentes tanto enzimáticos como no enzimáticos, y por tanto, ejerce una función protectora frente al estrés oxidativo (Navas, Villalba et al. 2007).

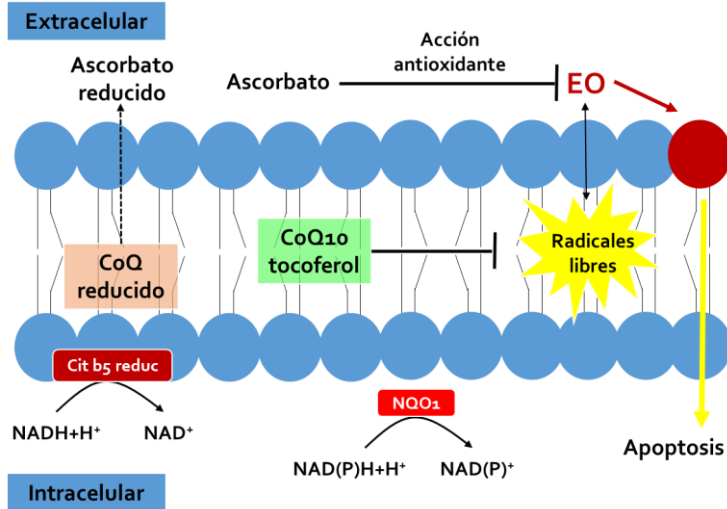


Figura 5. Esquema que representa el sistema PMRS. Lo componen la actividad de distintos componentes antioxidantes como el CoQ₁₀, el tocoferol, o las enzimas citocromo b₅ reductasa y NQO₁. Su función es esencial para el mantenimiento de la célula ya que el exceso de EO puede inducir apoptosis (modificado de (Villalba J.M. 2001)).

Implicación del estrés oxidativo en estados patológicos

Se ha descrito un incremento en el nivel de estrés oxidativo en mecanismos naturales de senescencia celular y envejecimiento (Kirkwood and Austad 2000). Igualmente, se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en enfermedades tan variadas en su etiología y sintomatología como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, y enfermedades neurodegenerativas, debidas, en última instancia, a un cambio en el balance entre las reacciones redox celulares (Villalba, Parrado et al. 2010).

El cerebro es uno de los órganos que se ve más afectado por las ROS. Pesa alrededor de 1,2 Kg pero consume el 20% del O₂ total. Además, presenta una serie de condiciones que lo hacen especialmente propenso al daño por ROS, entre ellas su elevada concentración en ácidos grasos susceptibles de ser oxidados (vaina de mielina), el alto contenido en metales pesados como el Fe²⁺ y el Cu⁺, el ya mencionado consumo de O₂ y su bajo nivel de antioxidantes. Todo ello hace que en la mayoría de las patologías neurodegenerativas haya un elevado nivel de ROS (Liu and Schubert 2009).

Factores de riesgo vascular como la hipertensión, hipercolesterolemia, la resistencia a la insulina y diabetes, originan estrés oxidativo e inflamación, tanto en modelos animales como en humanos. En los vasos, las principales fuentes de ROS son la xantina oxidasa (XO), la mitocondria y la NADPH oxidasa, que generan especies reactivas a partir de sus sustratos. El anión superóxido generado reacciona con el NO y produce peroxinitrito, eliminando el NO disponible para la vasodilatación. El peroxinitrito y las ROS oxidan al cofactor de la NO sintasa tetrahidrobiopterina (BH₄), que origina el desacoplamiento de la NO sintasa y genera más ROS. El peroxinitrito y las ROS también rompen la doble hélice del DNA activando la enzima reparadora poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) que consume una gran cantidad de energía y compromete la función endotelial. Además el peroxinitrito inhibe la síntesis del vasodilatador prostaciclina PGI₂, dificultando aún más la capacidad de los vasos para dilatarse (Iadecola 2004, Park, Anrather et al. 2005).

El estrés oxidativo también está directamente ligado con la aterosclerosis (Lum and Roebuck 2001). La lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) está directamente relacionada con la apoptosis de células endoteliales. El proceso aterosclerótico se inicia por el acúmulo de oxLDL y la activación de las células endoteliales que incrementan la expresión de moléculas de adhesión de interleuquina 8 (IL-8) y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Todo ello lleva al descenso de los niveles del óxido nítrico endotelial, ya que las ROS generadas por el oxLDL, en especial el superóxido, reaccionan con el NO para formar peroxinitrito, incrementando aún más los niveles de ROS y de RNS y por lo tanto de daño celular (Cominacini, Pasini et al. 2000), incrementando los niveles de hipoxia e isquemia originándose un círculo vicioso.

Las alteraciones metabólicas y las señales de supervivencia inducen un desbalance en los niveles de ROS en cáncer. Se producen alteraciones a diferentes niveles que varían en función del tipo tumoral (Singer, Judkins et al. 2015). Una gran variedad de medicamentos contra el cáncer dañan las células diana incrementando los niveles de ROS. El concepto de la activación por drogas bioreductoras se basa en la premisa de que el déficit de oxígeno en los tumores sólidos puede hacerlos vulnerables y susceptibles a un ataque terapéutico por agentes quimioterápicos. De hecho, se considera que el descubrimiento de moléculas no tóxicas que alteren el nivel de las ROS de forma selectiva podría ser una vía terapéutica de elevado interés (Sies 2015). Estudios recientes muestran como numerosos oncogenes y genes supresores de tumores están asociados a alteraciones en los niveles de ROS (Wondrak 2009).

El metabolismo alterado característico del cáncer permite a sus células un incremento en el consumo de nutrientes y por lo tanto una ventaja a la hora de proliferar. Esto se debe a una alteración mitocondrial, donde se produce un elevado

grado de glicolisis. Dicho metabolismo afecta a la mtETC generando un exceso de electrones que reaccionan con el O_2 formando $O_2^{\cdot-}$. Este dismuta a H_2O_2 por acción de las SOD1 y SOD2 por lo que se forma un elevado nivel de ROS (Wallace 2012, Weinberg and Chandel 2015).

Dicho cambio metabólico basado en la alteración de la vía de las pentosas fosfato y glicolisis, favorece la proliferación, migración, invasión, etc., pero también produce un incremento en la generación de ROS en mitocondria y retículo (Singer, Judkins et al. 2015). Oncogenes como *c-myc* también incrementan los niveles de ROS (Qiu and Simon 2015). Este incremento genera inestabilidad genómica y promueve la tumorigénesis (Szatrowski and Nathan 1991). Desde hace más de dos décadas se viene observando un nivel de ROS incrementado en las células tumorales y estos afectan en última instancia a la ruta de PI3K-PTEN-AKT, promoviendo el crecimiento tumoral (Ishikawa, Takenaga et al. 2008). Otro factor de transcripción cuya actividad es mediada por ROS es NF- κ B, que induce supervivencia de células tumorales (Schreck, Rieber et al. 1991). Por otra parte, el incremento de ROS mediado por hipoxia, estabiliza el factor inducible por hipoxia 1- α (HIF-1 α), induciendo angiogénesis, proliferación, migración e invasión celular (Horak, Crawford et al. 2010). El incremento de ROS, por lo tanto, induce muerte celular, por lo que las células tumorales incrementan sus niveles de maquinaria antioxidante, principalmente a través de la activación de los factores de transcripción Nrf2 y FoxO (Sporn and Liby 2012) (Figura 6).

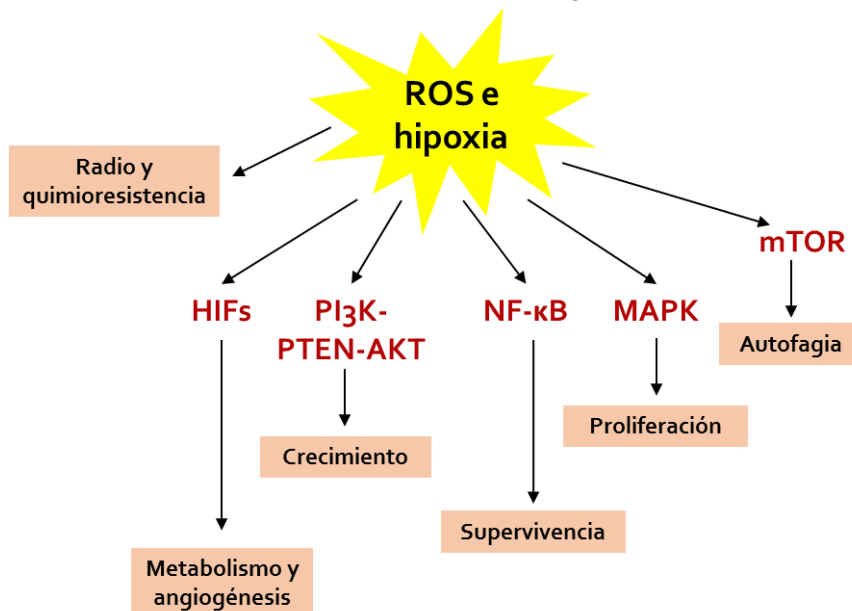


Figura 6. Efectos del incremento de hipoxia y ROS en cáncer. El incremento en las ROS genera en células tumorales alteraciones metabólicas, de crecimiento, resistencia a terapias convencionales, supervivencia, evasión de la apoptosis y proliferación y también un incremento en la angiogénesis, esencial para aportar nutrientes necesarios para todo lo anterior (Modificado de Ishikawa, Takenaga et al., 2008).

Coenzima Q10

El coenzima Q10 (CoQ 10), también conocido como ubiquinona, es una molécula lipídica con múltiples funciones biológicas que está presente en todos los organismos vivos.

Fue aislado y caracterizado por el grupo del profesor R. Morton, en la Universidad de Liverpool, a mediados del siglo pasado (Cain and Morton 1955). Dos años más tarde, Crane y colaboradores descubrieron su papel crucial en la mtETC (Crane, Hatefi et al. 1957). A lo largo de más de 50 años, se han ido conociendo nuevas funciones, entre las que cabe destacar su actividad antioxidante.

Su estructura compleja, donde el anillo benzoquinona (redox activo) está conectado a una cadena isoprenoide larga, fue determinada por el grupo de D.E. Wolf (Wolf DE 1958). Es el único antioxidante soluble lipídico sintetizado endógenamente y está presente en todas las membranas celulares y en la sangre, en lipoproteínas de alta y baja densidad. Juega un papel fundamental en el metabolismo celular, como transportador de electrones en la membrana mitocondrial y en membranas extramitocondriales. Además, protege a las membranas y lipoproteínas de la oxidación proteica y de la peroxidación lipídica, esta función la lleva a cabo principalmente su forma reducida (Ubiquinol, $UQ_{10}H_2$) (Navarro, Villalba et al. 1995, Villalba, Navarro et al. 1995, Crane 2001). El precursor del anillo de benzoquinona es el 4-hidroxibenzoato. La cadena lateral isoprenoide, comienza a formarse a partir de acetil-CoA y termina a través de la vía del mevalonato. El 4-hidroxibenzoato y el decaprenil pirofosfato se condensan por la enzima propenil 4-hidroxibenzoato transferasa (codificada por el COQ2). Tras la condensación, al menos seis enzimas (codificadas por COQ3-9) catalizan reacciones de metilación, descarboxilación e hidroxilación para sintetizar el CoQ10 (Figura 7) (Feigin, Kieburz et al. 1996, Turunen, Olsson et al. 2004, Wang and Hekimi 2013, Laredj, Licitra et al. 2014).

Javier Frontiñán Rubio

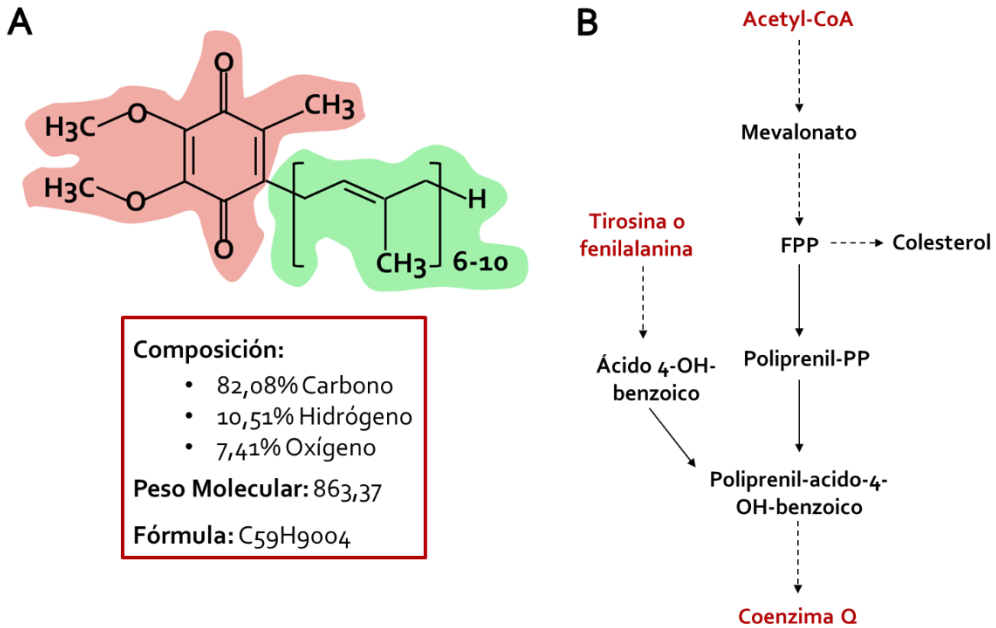


Figura 7. Estructura y síntesis del CoQ₁₀. El CoQ₁₀ presenta una estructura formada por una benzoquinona (A, rojo) y una cadena de isoprenos (A, verde). El carbono predomina en su estructura donde también aparece oxígeno e hidrógeno (A). Se forma a partir de la tirosina o fenilalanina y del Acetyl-CoA y a partir de la ruta del mevalonato en la que también se produce colesterol (B).

La mayor actividad del CoQ₁₀ (Tabla 2) dentro de las células ocurre en la membrana mitocondrial interna, donde transfiere electrones desde substratos primarios hasta el sistema oxidasa, al mismo tiempo que transfiere protones fuera de la membrana mitocondrial. Hay dos complejos en la membrana donde electrones y protones son transferidos por el CoQ₁₀, la NADH deshidrogenasa (complejo I) y la succinato deshidrogenasa (complejo II) (Crane 2001). En la mitocondria, el CoQ₁₀ también actúa como un inhibidor de la formación del poro de transición en la membrana interna (Walter, Nogueira et al. 2000). También se ha estudiado el efecto inhibitorio del ubiquinol sobre la actividad esfingomielinasa en la membrana plasmática, asociando una actividad relacionada con la regulación de la apoptosis (Martin, Navarro et al. 2001). La suplementación dietética que afecta a los niveles de CoQ₁₀ ha mostrado, una serie de cambios fenotípicos, que se explican por el efecto del CoQ₁₀ exógeno sobre la expresión de diferentes genes relacionados con la señalización celular, el metabolismo intermediario, el control de la transcripción y la inflamación, entre otros, indicando un papel de creciente importancia del CoQ₁₀ como regulador genético (Groneberg, Kindermann et al. 2005, Santos-Gonzalez, Gomez Diaz et al. 2007, Schmelzer, Kitano et al. 2009). Estudios recientes han demostrado su función sobre la expresión de más de 700 genes que intervienen en la señalización celular, inflamación, metabolismo y en el transporte celular,

actuando sobre rutas esenciales como JAK/STAT, integrinas o la mediada por NF- κ B (Groneberg, Kindermann et al. 2005, Schmelzer, Lindner et al. 2007, Schmelzer, Lindner et al. 2008, Jung, Park et al. 2009)(Tabla 2).

En los distintos procesos fisiológicos en los que interviene, lo podemos encontrar en su forma oxidada como ubiquinona (UQ₁₀) y en su forma reducida como ubiquinol (UQ₁₀H₂), predominando la segunda forma. Sus principales funciones están basadas en sus propiedades redox (Hargreaves 2015).

Tabla 2. Funciones del CoQ₁₀ (adaptado de Turunen, Olsson, & Dallner, 2004)

- Transportador de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial
- Regulación mitocondrial de la permeabilidad de los poros de transición
- Regulación fisicoquímica de membranas
- Modulación de las β -integrinas en la superficie de monocitos sanguíneos
- Regulación de la apoptosis a través de la inhibición de la esfingomielinasa
- Promueve la reparación de la membrana plasmática
- Disminuye el daño muscular tras el ejercicio
- Disminuye la hipertensión mediada por daño oxidativo
- Mejora de la disfunción endotelial
- Incrementa la capacidad antioxidante del glutatión y de la SOD
- Reduce el daño oxidativo en obesidad
- Afecta la expresión de genes relacionados con la ruta JAK/STAT
- Su consumo diario disminuye los niveles de LDL e incrementa los de HDL

Distribución del CoQ₁₀ y actividad antioxidante

El CoQ₁₀ se sintetiza en todas las células humanas, en las que aparece asociada específicamente a mitocondria, lisosomas, vesículas de Golgi y membrana plasmática (Turunen, Olsson et al. 2004). Su distribución en los diferentes órganos también varía. Aparece en mayor concentración en corazón, riñones e hígado, en contraste con pulmones y colon donde aparece en un nivel 10 veces menor. Se desconoce si las diferencias de concentración a nivel tisular se deben a alteración en la síntesis, a variaciones asociadas a la actividad o asociado al envejecimiento en ciertos órganos (Sohal and Forster 2007).

En el cerebro de rata se han visto que los niveles de CoQ₁₀ solo representan un 33% del total, siendo el resto CoQ₉ (Aberg, Appelkvist et al. 1992). Los niveles de CoQ₁₀ en la materia blanca de cerebro bovino son de 3pg/g mientras que en el cuerpo estriado aparece a concentraciones de 25pg/g (Runquist, Parmryd et al. 1995). La vida media del CoQ en los diferentes órganos varía entre las 49 y 125 horas (Aberg, Appelkvist et al. 1992).

El consumo diario a través de la dieta está estimado entre los 3 a 5 mg al día, aunque solo el 6% es absorbido por el tracto gastrointestinal. Los alimentos con mayores concentraciones de CoQ₁₀ son la carne de pollo y de ternera, pescado azul como

Javier Frontiñán Rubio

sardinas, boquerones, arenques, truchas, los frutos secos o en derivados de la soja entre otros (Garrido-Maraver, Cordero et al. 2014), pero el CoQ10 ingerido en la dieta es insuficiente para elevar la concentración de CoQ10 en caso de deficiencia en este antioxidante (Crane 2001). Por lo tanto, la suplementación con CoQ10 no aumenta los niveles de este en tejidos por encima de lo normal (excepto en hígado y bazo). Esto se cumple especialmente en animales jóvenes sanos. En animales mayores con disminución de la CoQ10, se ha observado que la suplementación con CoQ10 puede restaurar los niveles de este en algunos tejidos (Beal 1999, Crane 2001). Estudios en rata han mostrado como la absorción de CoQ10 sigue un proceso similar al que siguen los lípidos en el tracto gastrointestinal, y parece ser muy limitada (Zhang, Aberg et al. 1995).

El CoQ10 aparece localizado en membranas muy próximo a cadenas lipídicas insaturadas, para actuar neutralizando radicales libres. Dado que la mayoría del CoQ10 que aparece en las membranas está en forma ubiquinol (Takahashi, Okamoto et al. 1993), es un antioxidante muy efectivo (Quinn, Fabisiak et al. 1999). Son realmente importantes las enzimas que aparecen en todas las membranas con capacidad de reducir cualquier radical generado por el CoQ10 al reaccionar con lípidos y ROS. Se conocen tres enzimas con la capacidad de mantener al CoQ10 reducido en plasma y membranas, la NADH citocromo b5 reductasa (Villalba and Navas 2000), la NADH/NADPH oxidoreductasa (Villalba and Navas 2000) y la NADPH CoQ reductasa (Takahashi, Okamoto et al. 1996). Su localización, por lo tanto, es de una importancia esencial para su función antioxidante ya que se encuentra en las regiones donde puede producirse la alteración de proteínas y lípidos por EO, y en contraste con otros antioxidantes, inhibe tanto la iniciación como la propagación de la oxidación de lípidos y proteínas (Bentinger, Tekle et al. 2010).

Como antioxidante, inhibe la peroxidación de lípidos de membrana y de lipoproteínas circulantes (Forsmark, Aberg et al. 1991). Esta efectividad del CoQ10 como inhibidor de la peroxidación lipídica se debe a una inhibición durante el inicio y la propagación de la misma, ya que actúa sobre el radical perferril ($\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$) durante el inicio y eliminando el radical peroxilo ($\text{LOO}\cdot$). Además, puede interferir y ralentizar la peroxidación lipídica actuando como antioxidante o indirectamente interviniendo en la regeneración del estado oxidado del α -tocoferol (vitamina E) y en el reciclado del ascorbato (vitamina C), actuando como fuente de electrones para su estabilización (Frei, Kim et al. 1990, Santos-Ocana, Villalba et al. 1998).

De una forma similar, es muy eficiente previniendo la oxidación de proteínas, actuando sobre la formación del radical perferril y reaccionando con radicales libres (Forsmark-Andree, Dallner et al. 1995).

El CoQ10 juega un papel fundamental en la prevención del daño oxidativo del DNA. Previene la interacción del H₂O₂ con iones metálicos para unirse al DNA, siendo especialmente sensible a nivel de mtDNA, ya que no hay histonas protectoras y los mecanismos de reparación son limitados (Bentinger, Tekle et al. 2010).

Diferentes estudios y ensayos clínicos, que han probado su efecto antioxidante, no han mostrado un efecto citotóxico secundario a dosis elevadas de CoQ10. Estudios recientes recomiendan dosis de hasta 1200 mg/día para adultos, aunque se indican dosis menores (Hathcock and Shao 2006) y de hasta 10 mg/día para niños, según un estudio en niños con síndrome de Down (Miles, Patterson et al. 2006).

Uso terapéutico del CoQ10

Existen distintas patologías relacionadas con el CoQ10, entre ellas, las asociadas a deficiencias en CoQ10 y otras donde el CoQ10 tiene un interés terapéutico.

En el caso de patologías relacionadas con el déficit en CoQ10, a diferencia de otras alteraciones asociadas a la mtCTE, los pacientes mejoran cuando se les suministra CoQ10 exógeno. Estas deficiencias tienen por causa primaria, la mutación en genes responsables o relacionados con la biosíntesis del CoQ10, en el caso de la secundaria son mutaciones o alteraciones desconocidas (Hargreaves 2015).

La relación del CoQ10 con patologías no asociadas al déficit del mismo, se basa en el efecto beneficioso del CoQ10 como tratamiento, debido a su actividad antioxidante, por lo tanto se trata de enfermedades donde el estrés oxidativo juega un papel fundamental (Villalba, Parrado et al. 2010). En diferentes estudios se ha visto como los niveles de CoQ10 descienden con el envejecimiento, se ha observado como en humanos desciende significativamente en hígado, riñones, pulmón, corazón y cerebro (Soderberg, Edlund et al. 1990, Edlund, Soderberg et al. 1992). Por lo que el uso del CoQ10 como suplemento dietético podría ser muy recomendable para evitar ciertas patologías asociadas al envejecimiento (Lopez-Lluch, Rodriguez-Aguilera et al. 2010).

Entre las principales enfermedades donde se ha estudiado el efecto del CoQ10 destacan las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer y fibromialgia (Tabla 3).

Todas las enfermedades neurodegenerativas presentan disfunción mitocondrial que desencadena un incremento del estrés oxidativo (Chaturvedi and Beal 2008). En la enfermedad de Huntington, se ha visto como en pacientes tratados con CoQ descienden los niveles de lactato cortical, un indicador de la alteración del metabolismo en esta enfermedad (Feigin, Kiebertz et al. 1996, Koroshetz, Jenkins et al. 1997, Delanty and Dichter 1998). En pacientes con enfermedad de Parkinson se ha visto un descenso en los niveles de CoQ10 y se ha estudiado *in vitro* e *in vivo*

Javier Frontiñán Rubio

como la suplementación con CoQ10 protege el sistema nigroestriatal dopaminérgico (Shults 2005, Cleren, Yang et al. 2008). En esclerosis lateral amiotrófica se ha observado un incremento en los niveles de CoQ10 oxidado en plasma de pacientes, asociado al incremento en los niveles de EO en esta enfermedad (de Bustos, Jimenez-Jimenez et al. 2000, Sohmiya, Tanaka et al. 2005).

Desde su descubrimiento, se ha estudiado el efecto del CoQ10 sobre la patología cardiovascular. Ya en 1981, Folkers y colaboradores, empezaron a estudiar el efecto del CoQ10 sobre la hipertensión (Folkers, Drzewoski et al. 1981). Diez años más tarde, Montaldo y colaboradores, observaron cómo el tratamiento con CoQ10 durante 3 meses reducía la presión arterial en pacientes hipertensos (Digiesi, Cantini et al. 1994).

Previamente describimos el papel del EO en el compromiso endotelial al reducir los niveles de NO, por lo que se ha sugerido que el CoQ podría mejorar la función vascular indirectamente al inhibir la reacción del NO con los radicales superóxido para formar peroxinitrito (Tiano, Belardinelli et al. 2007, Belardinelli, Tiano et al. 2008).

El uso del CoQ10 en el tratamiento del cáncer se ha estudiado de una forma muy limitada, principalmente como terapia adyuvante. Diferentes estudios han mostrado como los niveles sanguíneos de CoQ10 aparecen disminuidos en pacientes con cáncer de mama, cervical, intraepitelial, etc. (Lockwood, Moesgaard et al. 1995, Folkers 1996, Ren and Lien 1997). Además este descenso puede estar asociado con una peor prognosis (Jolliet, Simon et al. 1998). En el caso de cáncer de mama, se han desarrollado diferentes ensayos clínicos donde pacientes tomaron dosis elevadas de CoQ (entre 300 y 390 mg/día) durante largos periodos. Estos estudios han mostrado una mejoría en la prognosis, aunque faltaría ampliar el número de pacientes e incluir pacientes control para determinar la influencia del CoQ10 sobre dicha mejora (Lockwood, Moesgaard et al. 1995, Rusciani, Proietti et al. 2006). Se considera que los mecanismos por los que el CoQ10 puede ser beneficioso en el tratamiento del cáncer se basan en la mejora del sistema inmune y en su actividad antioxidante (Hargreaves 2015).

Por otra parte, los niveles de CoQ10 pueden disminuir drásticamente por el uso del quimioterapéutico doxorubicina (Adriamycin®), lo que pudo suponer cardiotoxicidad (Domae, Sawada et al. 1981). El suplemento con CoQ10 (100-200 mg / día) previene el daño cardiaco, así como la diarrea y la estomatitis que son causadas por este agente, sin disminuir su eficacia quimioterapéutica (Domae, Sawada et al. 1981). Finalmente, se recomienda el consumo de alimentos y bebidas con CoQ10 reducido para la prevención del cáncer y para mitigar reacciones adversas producidas por quimioterápicos (Villalba, Parrado et al. 2010).

Tabla 3. Relación fisiológica y clínica del CoQ10 con diferentes patologías (Garrido-Maraver, Cordero et al. 2014)

Indicaciones clínicas	
Deficiencias en CoQ10	(Quinzii and Hirano 2010)
Patología mitocondrial	(Kerr 2010)
Fallo cardiaco	(Adarsh, Kaur et al. 2008)
Isquemia cardiaca	(Celik and Iyisoy 2009)
Hipertensión	(Rosenfeldt, Haas et al. 2007)
Función endotelial	(Tiano, Belardinelli et al. 2007)
Diabetes	(Golbidi, Ebadi et al. 2011)
Cáncer	(Jolliet, Simon et al. 1998)
Enfermedades neurodegenerativas	
Enfermedad de Parkinson	(Cleren, Yang et al. 2008)
Enfermedad de Huntington	(Koroshetz, Jenkins et al. 1997)
Enfermedad de Alzheimer	(Lee, Boo et al. 2009)
Ataxia de Fiedreich	(Cooper, Korlipara et al. 2008)
Otras condiciones	
Astenozoospermia	(Balercia, Buldreghini et al. 2009)
Patología periodontal	(Prakash, Sunitha et al. 2010)
Migraña	(Sandor, Di Clemente et al. 2005)
Pre-eclampsia	(Teran, Hernandez et al. 2009)
Síndrome de Down	(Tiano, Carnevali et al. 2011)
Envejecimiento	(Lopez-Lluch, Rodriguez-Aguilera et al. 2010)

Javier Frontiñán Rubio

Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa dependiente de la edad, que implica una pérdida gradual de las capacidades cognitivas. La mayoría de los casos son esporádicos, donde el principal factor de riesgo es la edad y menos del 5% se deben a causas genéticas (EA familiar) (Cummings 2004). Por su elevada prevalencia e incidencia, actualmente se considera la neuropatología de mayor importancia, ya que 1 de cada 3 personas de más de 80 años la padecen, apareciendo en porcentajes menores en personas más jóvenes (1 de cada 8 a partir de los 65 años) (Tanzi and Bertram 2005). Por tanto, es una enfermedad directamente asociada con el envejecimiento, que en sociedades con mayor esperanza de vida puede alcanzar proporciones epidémicas. En la Web del NIH se encuentran actualmente 137 ensayos clínicos con el término de búsqueda Alzheimer (<https://www.nia.nih.gov/alzheimers/clinical-trials>). Este es un claro ejemplo del esfuerzo que se está haciendo para buscar nuevas moléculas y dianas terapéuticas.

La enfermedad recibe este nombre por Alois Alzheimer, un psiquiatra bávaro experto en neuropatología, que en 1906 describió por primera vez la enfermedad, y sus características neuropatológicas, como son la presencia de placas seniles de β -amiloide (β A) extracelulares y de ovillos neurofibrilares intraneuronales y cambió por completo el paradigma del concepto de demencia (Alzheimer, Stelzmann et al. 1995). La localización de estas estructuras patológicas definen las diferentes etapas de la enfermedad a nivel histopatológico (Braak and Braak 1995). No existe tratamiento y se desconoce el origen de la enfermedad. En los últimos años se han desarrollado diferentes hipótesis (Hyman and Gomez-Isla 1997, Swerdlow, Burns et al. 2010, Swomley, Forster et al. 2014).

Hipótesis de la enfermedad de Alzheimer. A lo largo de los años, han surgido diferentes hipótesis, no excluyentes, sobre el origen de la EA.

La principal, es la hipótesis amiloidogénica, basada en la producción y acumulación de β -amiloide (β A) como eje central de la patogénesis de la enfermedad. Esta hipótesis se basa en que mutaciones en el precursor del péptido amiloide (APP), o de las presenilinas PS1 y PS2 están asociadas a un desarrollo precoz de la enfermedad (Selkoe 1991, Hardy and Higgins 1992). Todas las mutaciones asociadas a la EA desencadenan la acumulación de β A originando las placas seniles, que son neurotóxicas *in vitro* e *in vivo*. El incremento en la carga de β A produce la hiperfosforilación de la proteína tau que forma los ovillos neurofibrilares. La función fisiológica del APP, aún no está totalmente dilucidada (Hardy and Selkoe 2002). Es una proteína transmembrana de tipo I (su porción N-terminal es extracelular) que podría estar relacionada con la formación de sinapsis (Priller, Bauer et al. 2006), con la plasticidad neuronal (Turner, O'Connor et al. 2003), el transporte de hierro (Duce, Tsatsanis et al. 2010) o con la supervivencia celular (O'Brien and Wong 2011).

El procesamiento del APP puede ocurrir de forma no amiloidogénica (no patológico) o amiloidogénica (patológico) (Figura 8) (LaFerla, Green et al. 2007). En la forma no amiloidogénica, la α -secretasa realiza el procesamiento proteolítico del APP generando una forma truncada de APP CTF (aCTF o C83), que carece de la porción aminoterminal del dominio β A, esta es procesada posteriormente por la γ -secretasa, produciendo un fragmento pequeño llamado p3 (Figura 8A) (Haass, Hung et al. 1993).

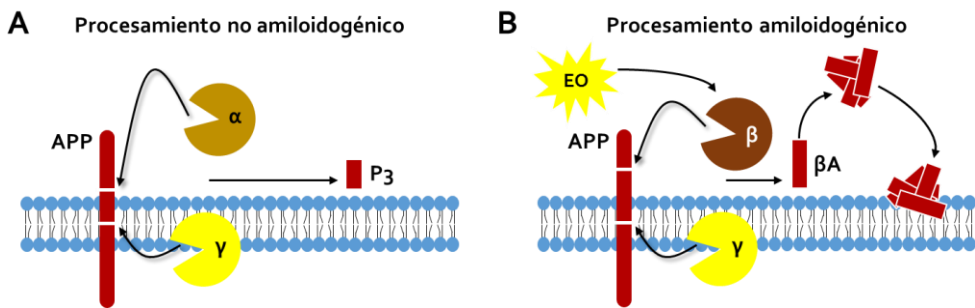


Figura 8. Procesamiento del APP. Esquema que representa el procesamiento fisiológico (A) y patológico (B) del APP. Durante el procesamiento amiloidogénico se sobreexpresa BACE-1 (β -secretasa), inducido por estrés oxidativo.

En la forma amiloidogénica (Figura 8B), se produce el procesamiento proteolítico del APP por parte de la BACE-1 (que es la única enzima con actividad β -secretasa), que inicia la generación de β A cortando una secuencia más larga del ectodominio de APP (APPs β) y genera un fragmento carboxiterminal de APP (β CTF o C99), que posteriormente es procesado por la γ -secretasa (Haass, Kaether et al. 2012). La mayoría del β A producido corresponde al péptido de 40 residuos (β A₁₋₄₀), mientras que el 10% corresponde al péptido de 42 residuos (β A₁₋₄₂). Esta forma es mucho más hidrofóbica y con mayor capacidad de formar agregados (Jarrett, Berger et al. 1993). El β A se puede depositar tanto en el parénquima cerebral como en vasos sanguíneos (Vassar, Bennett et al. 1999), predominando la forma β A₁₋₄₂ en las placas seniles del parénquima cerebral (Dickson, Farlo et al. 1988) y la forma β A₁₋₄₀ en los depósitos en vasculatura (Suzuki, Iwatsubo et al. 1994). Los avances de las técnicas de imagen han permitido en los últimos años estudiar la deposición amiloidogénica pre-mortem, mostrando que personas ancianas sin demencia, pueden presentar depósitos de β A (Rodrigue, Kennedy et al. 2009).

La causa del procesamiento anómalo del APP para formar las placas aún no se ha dilucidado. Entre las distintas hipótesis se habla de heredabilidad, polimorfismos genéticos, hipoperfusión cerebral, inflamación cerebral y lesiones moleculares (Selkoe 1999, Randall, Witton et al. 2010). El péptido extracelular se puede insertar

Javier Frontiñán Rubio

en la membrana celular, induciendo la peroxidación lipídica y formando canales de Ca^{2+} que desregulan aún más la homeostasis celular (Bouron, Mbebi et al. 2004).

Tras la formación de las placas de βA , aparecen los ovillos neurofibrilares intracelulares de la proteína hiperfosforilada Tau. Tau es una proteína que en condiciones normales actúa estabilizando los microtúbulos (Medina and Avila 2015). Cuando la agregación del βA ocurre en la membrana celular, se produce un estrés oxidativo que origina peroxidación lipídica y la generación del 4-hydroxynonenal (4HNE), un aldehído neurotóxico que se une covalentemente y modifica Tau en residuos de cisteína, lisina e histidina. También se ha observado que el 4HNE inhibe la defosforilación de tau en neuronas hipocampales en cultivo (Mattson, Fu et al. 1997), afectando a su función y alterando el tráfico intracelular (Medina and Avila 2015). El 4HNE está presente en cerebros de pacientes con EA y colocaliza con ovillos neurofibrilares (Sayre, Zelasko et al. 1997, Lovell, Xie et al. 2001). Todo esto afecta a su función y altera por completo el tráfico intracelular

Sin embargo, en autopsias *postmortem* se ha visto que pacientes con una alta carga de placas seniles no mostraban ningún déficit cognitivo, siendo este uno de los principales motivos que ha originado la búsqueda de nuevas hipótesis no excluyentes con la amiloide.

En 2004 se planteó la hipótesis mitocondrial para la EA por Russell Swerdlow, que postulaba que una serie de alteraciones críticas en la mitocondria estaban directamente asociadas a la enfermedad esporádica (Swerdlow, Burns et al. 2010). Entre estas alteraciones se encuentran mutaciones en genes que codifican proteínas mitocondriales que inducen un mal funcionamiento mitocondrial, incrementando la formación de ROS (Swerdlow, Burns et al. 2010). Además, las mitocondrias más afectadas son las que se encuentran en la sinapsis (Swerdlow, Burns et al. 2010). En muestras de pacientes con EA *post-mortem* se ha visto un descenso en el número de mitocondrias en hipocampo de pacientes con EA (Hirai, Aliev et al. 2001) y que las mitocondrias son más pequeñas y por lo tanto menos funcionales (Hirai, Aliev et al. 2001).

Un número creciente de investigadores plantean que la patología vascular asociada a la EA y el estrés oxidativo, podrían ser cruciales en el inicio y desarrollo de la enfermedad. En los siguientes puntos hablaremos detalladamente sobre la relación entre dichas alteraciones y la EA.

Estrés oxidativo

El procesamiento amiloidogénico ocurre por la sobreexpresión de BACE-1 que se ve incrementada por EO (figura 9) (Vassar, Bennett et al. 1999). Apelt y colaboradores, observaron una correlación entre el nivel de ROS y RNS respecto a la deposición y formación de placas de β A y la actividad β -secretasa en ratones transgénicos de EA (Tg2576) (Apelt, Bigl et al. 2004). En casos de Alzheimer familiar se ha visto como mutaciones de uno o dos aminoácidos del APP favorecen la actividad de la β -secretasa mientras que en casos de EA esporádico no se han observado dichas mutaciones (LaFerla, Green et al. 2007).

El péptido β A induce la generación de ROS y la alteración de la homeostasis celular de calcio. La interacción entre los oligómeros de β A y Fe^{2+} o Cu^+ genera H_2O_2 . Cuando los agregados de β A aparecen, se da peroxidación lipídica en la membrana y se forma 4HNE , un aldehído neurotóxico que modifica residuos de cisteína, lisina e histidina en proteínas (Hardas, Sultana et al. 2013). Entre las proteínas que se alteran por el daño oxidativo del β A se encuentran transportadores de membrana, receptores, canales de iones y proteínas G (Hardas, Sultana et al. 2013).

El 4HNE y el incremento de ROS inducen modificaciones oxidativas en la proteína Tau, incrementando su capacidad de autoagregarse. En la mitocondria, el β A incrementa el estrés oxidativo y altera la homeostasis del Ca^{2+} , se daña la mtETC e incrementan los niveles de anión superóxido y disminuye la producción de ATP (Mattson, Fu et al. 1997). El anión superóxido puede interactuar con el NO, llevando a un incremento en los niveles de peroxinitrito (ONOO^\cdot) y de OH^\cdot (Mattson 2004) (Figura 9). Además, se ha visto que el incremento del 4HNE incrementa la expresión de BACE1 (Ortega, Stott et al. 2013).

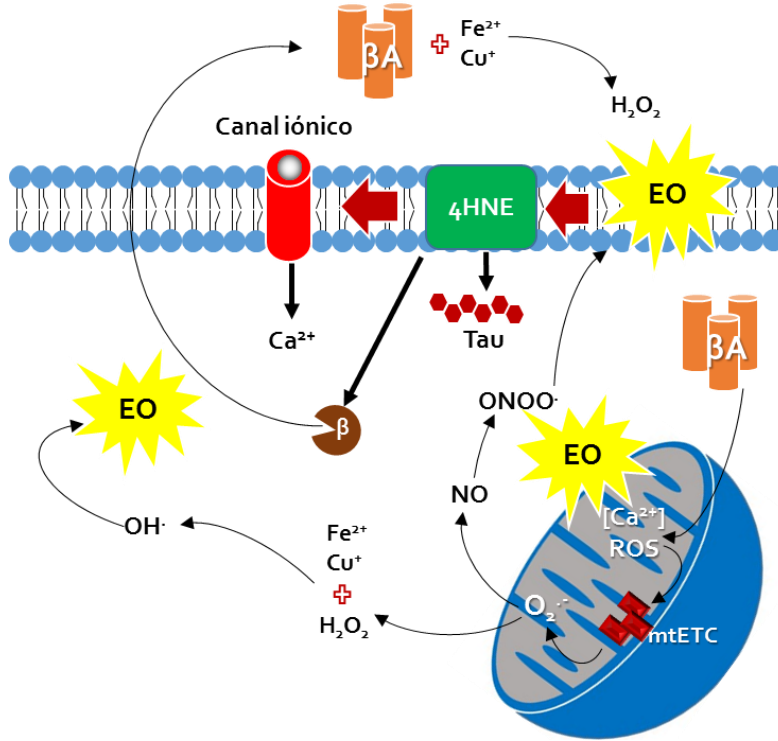


Figura 9. Relación del estrés oxidativo con la enfermedad de Alzheimer. La acción neurotóxica del β A induce la generación de ROS y la disrupción de la homeostasis celular de calcio. Interacciones de β A con Fe^{2+} o Cu^+ genera H_2O_2 . Se produce EO en la membrana que desemboca en la generación de 4HNE que acaba estabilizando Tau. Incrementa el nivel de ROS en el interior celular que genera más β A por la inducción de BACE, originándose un *feedback* positivo de β A y ROS (modificado de Mattson 2004).

El incremento exacerbado de ROS, acaba afectando la maquinaria antioxidante celular. Se ha observado como el incremento de ROS está directamente relacionado con el descenso en los niveles de Nrf2, disminuyendo drásticamente la maquinaria antioxidante de cerebros de pacientes con EA y modelos murinos transgénicos (Mota, Costa et al. 2015). También se ha descrito un descenso en los niveles de NQO1 y CoQ10 en ratones 3xTg-AD de 15 meses de edad, en hipocampo y córtex (Hyun, Mughal et al. 2010), regiones donde previamente se había observado un incremento de los niveles de β A en este mismo modelo (Oddo, Caccamo et al. 2003). Diferentes estudios han mostrado un incremento en el nivel de NQO1 en los ovillos neurofibrilares y el citoplasma de las neuronas hipotalámicas de pacientes con EA frente a individuos control jóvenes y ancianos (Raina, Templeton et al. 1999) y en astrocitos y placas seniles de la corteza frontal (SantaCruz, Yazlovitskaya et al. 2004), indicando un intento de activación de mecanismos de defensa frente al daño oxidativo. La sobreexpresión de NQO1 incrementa la resistencia de neuronas al daño inducido por el péptido β A (Hyun, Mughal et al. 2010).

Las innumerables evidencias que asocian la enfermedad de Alzheimer con el EO han llevado a varios grupos de investigadores a situarlo como un proceso clave en la aparición y desarrollo de la enfermedad (Butterfield, Drake et al. 2001, Butterfield, Castegna et al. 2002, Swomley, Forster et al. 2014).

Patología vascular

Aunque la EA no se considera, por definición, una demencia vascular, la idea de que la disfunción neurovascular puede contribuir al desarrollo y progresión de la EA se basa en datos epidemiológicos y experimentales, cada vez más abundantes.

El péptido β A no sólo se encuentra formando parte de las placas seniles en el parénquima cerebral, sino que también se ha encontrado depositado en las paredes de los vasos cerebrales (Damoiseaux, Prater et al. 2012). Estudios epidemiológicos demuestran que diversos factores de riesgo para enfermedades vasculares, incluyendo hipertensión arterial (HTA), diabetes, hipercolesterolemia, hiperhomocisteinemia y el genotipo apolipoproteína ϵ_4 , son también factores de riesgo para la EA (Hayden, Zandi et al. 2006). Se ha demostrado que los pacientes diabéticos acumulan β A en la vasculatura cerebral (Takeda, Sato et al. 2010). Además, la apolipoproteína E ϵ_4 (APOE ϵ_4), que es el principal factor genético de riesgo en la EA, predispone a sufrir patología cerebrovascular (Carter 2005). Así diversos estudios objetivan mayor incidencia de compromiso cognitivo en pacientes con HTA, incluso en aquellos sin eventos vasculares clínicos que pudiesen sugerir una demencia vascular (Girouard and Iadecola 2006, Skoog and Gustafson 2006). Además, los pacientes de EA presentan aterosclerosis más severa en las arterias cerebrales del polígono de Willis que los individuos control sin EA de la misma edad (Iadecola 2004).

También se han descrito numerosas anomalías estructurales y funcionales en la microvasculatura de los pacientes con EA: atrofia e irregularidades de las arteriolas y capilares, incremento en el número y tamaño de las vesículas pinocíticas de las células endoteliales, rotura de la lámina basal del endotelio, reducción de la densidad microvascular, disminución del flujo de sangre cerebral y disminución del número de mitocondrias en el endotelio de los vasos (Fischer, Siddiqi et al. 1990, Buee, Hof et al. 1994, Grammas 2011).

Además, se demostró una asociación topográfica entre los capilares y las placas amiloides (Miyakawa, Shimoji et al. 1982). Se ha visto como existe una extensa degeneración del endotelio durante el desarrollo de la enfermedad (Kalaria and Hedera 1995) y una mayor deposición de colágeno IV en la lámina basal (Kalaria and Pax 1995). También se ha estudiado como los pacientes con EA presentan un incremento de aterosclerosis cerebral y alteraciones en la materia blanca similares a las observadas en pacientes con daño isquémico (Roher, Esh et al. 2003, van Dijk, Prins et al. 2004). Relacionado con inflamación, se ha visto como la

Javier Frontiñán Rubio

microvasculatura cerebral de los pacientes de EA secreta mayor número de factores inflamatorios, que la de individuos control de similar edad, y la inflamación precede a la deposición de βA , que a su vez, promueve la liberación de mediadores inflamatorios (Grammas 2011).

El endotelio de la neurovasculatura cerebral es el elemento esencial para el funcionamiento de la microvasculatura. Las células endoteliales (ECs) regulan la homeostasis entre el parénquima cerebral y el flujo sanguíneo y son esenciales en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BBB), cuya alteración está íntimamente relacionada con enfermedades neurodegenerativas (Iadecola 2004, Grammas 2011). Diferentes estudios han mostrado como el estrés oxidativo y la deposición de βA daña las ECs causando hipoperfusión en el parénquima cerebral. Estudios de imagen han demostrado una reducción en el flujo cerebrovascular y de consumo de glucosa en los pacientes de EA (Rapoport 2000).

El daño vascular subyace a la EA en etapas anteriores a los patofisiológicos. En el ratón transgénico Tg256, un modelo murino de EA, el βA circulante aparece en vasculatura mucho antes de que se encuentren depósitos de βA en el parénquima cerebral, dañando a las células endoteliales (Park, Anrather et al. 2004). El βA circulante afecta la permeabilidad y la integridad de la barrera hematoencefálica (Biron, Dickstein et al. 2011) alterando el intercambio de gases y nutrientes (Marchesi 2011). Las ECs son más sensibles al péptido βA_{1-40} en mayor medida que el péptido βA_{1-42} (Iadecola, Zhang et al. 1999, Niwa, Carlson et al. 2000). También se ha visto que son mucho más sensibles al fragmento βA_{25-35} que las neuronas y células de músculo liso (Akiyama, Ikeda et al. 1992, Behl, Davis et al. 1994, Suo, Fang et al. 1997). El concepto de daño endotelial viene reforzado por el hecho de que las células endoteliales están en contacto directo con el βA circulante generando un daño directo (Park, Anrather et al. 2004).

El daño vascular está directamente ligado a un incremento en los niveles de ROS y este está asociado a un incremento de la actividad de la NADPH oxidasa. Esta enzima, presenta niveles 10 veces superiores en vasculatura cerebral que en otros órganos de pacientes con EA (Park, Anrather et al. 2005). La NADPH oxidasa se puede activar por distintas causas, como hipertensión, concentración de glucosa elevada o de oxLDL elevado (Faraci 2003, Li and Shah 2004) y actúa transfiriendo electrones desde el NADPH hasta el oxígeno molecular, generando superóxido. El incremento en el nivel de esta enzima en vasculatura cerebral reduce los niveles de NO (Park, Anrather et al. 2005), comprometiendo el correcto funcionamiento del entramado vascular cerebral. El descenso de NO propiciado por el incremento de los niveles de ROS tiene efectos nefastos en la célula endotelial debido al descenso de la vasodilatación. Se produce una menor irrigación en el parénquima cerebral, generando isquemia e hipoxia, que a su vez, induce mayor incremento de ROS. El

incremento de ROS en el parénquima cerebral, induce la sobreexpresión de BACE-1 (Tamagno, Guglielmotto et al. 2012). Se genera más β A que se inserta en los vasos y reiniciando otro círculo vicioso.

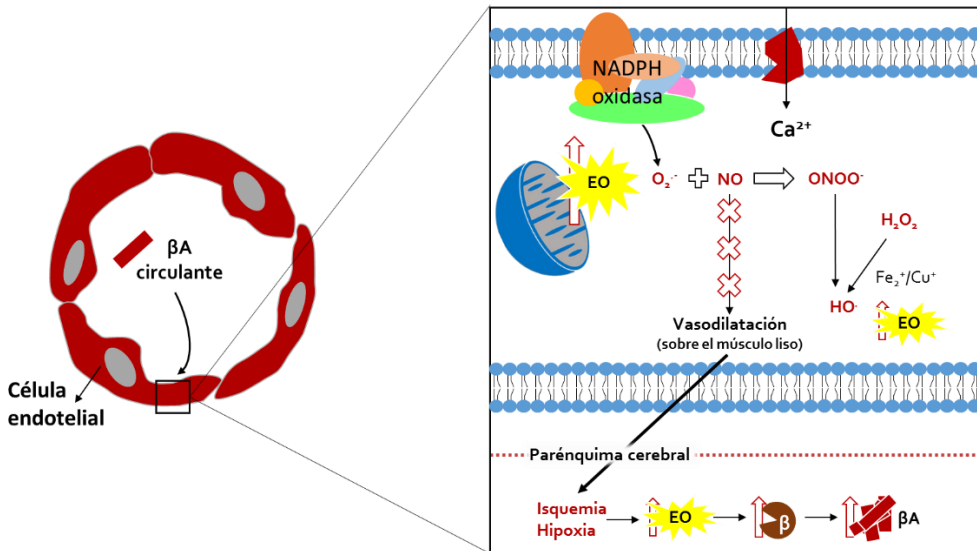


Figura 10. Daño endotelial generado por el β A. El β A circulante está en contacto directo con las células endoteliales generando estrés oxidativo en el interior celular. Se genera un incremento en los niveles de ROS que disminuye la vasodilatación. Esto produce isquemia e hipoxia que acaba incrementando el estrés oxidativo en células del parénquima cerebral, afectando la expresión de BACE-1, lo que genera mayor β A, que reiniciará el ciclo afectando a las células endoteliales.

Es posible que una reducción del flujo sanguíneo cerebral sea más importante para la pérdida cognitiva que la carga de β A. En un estudio de Park y colaboradores, se bloqueó la subunidad catalítica Nox2 de la NADPH oxidasa en el modelo Tg2576, y se vio como no desarrollaron estrés oxidativo ni disfunción cerebrovascular ni déficits conductuales. Estas mejoras se observaron sin un descenso en los niveles de placas amiloideas, proporcionando un vínculo entre la disfunción neurovascular y el deterioro cognitivo asociado a la patología amiloide (Park, Anrather et al. 2005).

Terapia con antioxidantes

Los diferentes estudios que relacionan EO y la patología vascular asociada a la EA han supuesto evidencias suficientes para desarrollar aproximaciones terapéuticas con antioxidantes. En los últimos años se ha estudiado en efecto de vitamina C, tempol, resveratrol, o CoQ10 en modelos animales y pacientes con EA.

La inyección intraperitoneal (IP) de ascorbato mostró una mejora cognitiva en ratones transgénicos APP/PSEN1, pero no se observó cambio alguno en el patrón de deposición de placas de β A en hipocampo (Harrison, Hosseini et al. 2009). Más tarde, se vio como inducía una mejora cognitiva y atenuaba la oligomerización de

Javier Frontiñán Rubio

β A, aunque sin alteración del patrón de deposición de las placas de β A (Murakami, Murata et al. 2011). Recientemente, Kook y colaboradores trabajaron en un modelo obtenido del cruce entre ratones 5xFAD con ratones K.O. para la síntesis de ascorbato (Kook, Lee et al. 2014). Los resultados mostraron como el suplemento con altas dosis de ascorbato en la dieta disminuía el depósito de placas y aminoraba los cambios patológicos en estos modelos murinos (Kook, Lee et al. 2014).

Diversos estudios han mostrado un efecto positivo de la suplementación oral de CoQ10, atenuando la patología amiloide en diferentes modelos murinos de la enfermedad (Li, Jack et al. 2008, Yang, Dai et al. 2010).

En humanos, no se han observado diferencias en la concentración de CoQ en plasma entre pacientes con EA y control (Battino, Bompadre et al. 2003), pero el porcentaje de CoQ10 oxidado/total en líquido cerebroespinal es significativamente más elevado en pacientes con EA que en pacientes control, lo cual correlacionaba directamente con el progreso de la enfermedad (Isobe, Abe et al. 2009). Estos resultados sugieren que la suplementación con CoQ10 podría mejorar el pronóstico de la enfermedad.

Modelos murinos

Para la mejor comprensión de la EA y para el desarrollo de posibles fármacos, se han utilizado gran variedad de modelos animales, desde invertebrados hasta mamíferos. La mayoría de los modelos utilizados son modelos genéticos donde se alteran genes que aparecen dañados en la EA familiar (Figura 11). A lo largo del reino animal, hay distintas especies que desarrollan alteraciones patológicas similares a la EA, entre ellos destacan los perros, gatos, ovejas o algunos primates no humanos. Estos modelos apenas se utilizan en fases preclínicas, su uso es casi exclusivamente asociado a ensayos clínicos (Laurijsens, Aujard et al. 2013).

Los modelos murinos son los más usados. Se han desarrollado diferentes modelos entre los que destacan el Tg2576, APP/PS1, 3xTg-AD y 5xFAD (Figura 11).

Diversos modelos murinos de la EA se han utilizado para estudiar los mecanismos patogénicos, interacciones genéticas, factores ambientales de riesgo, así como el efecto terapéutico de nuevas drogas contra la neuropatología. Aunque los diferentes modelos animales desarrollan algunas de las características de la EA, ninguno de ellos recapitula la totalidad de ellas (Shineman, Basi et al. 2011).

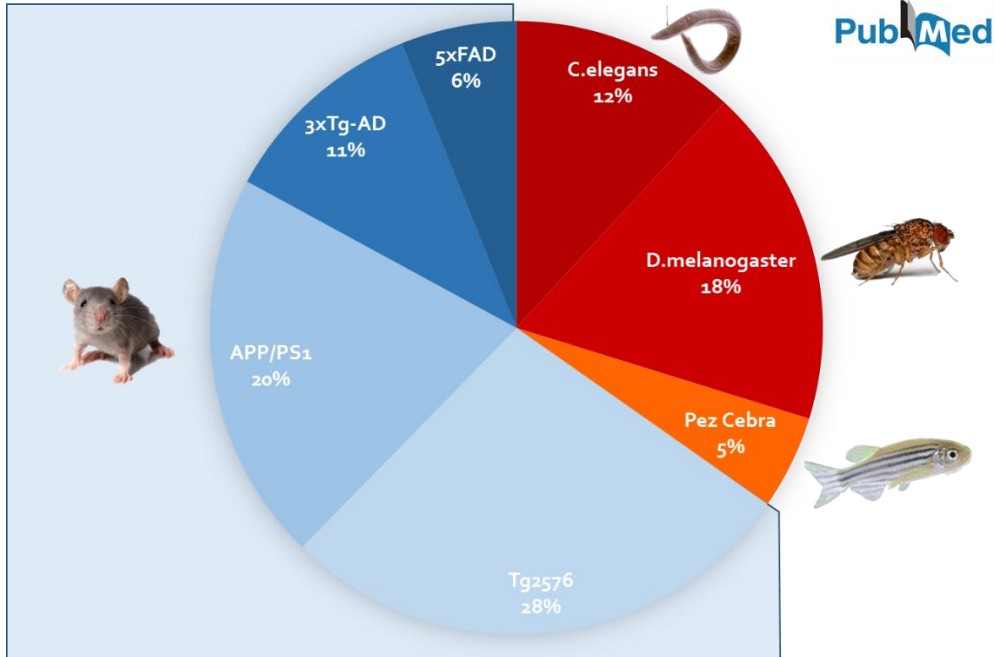


Figura 11. Modelos animales utilizados para el estudio de la EA. Mediante el buscador bibliográfico PubMed, se ha observado que en torno al 35% de los artículos publicados sobre EA en modelos animales, pertenecen a los principales modelos animales "no murinos" (*C. elegans*, *Drosophila melanogaster* y pez cebra). Dentro de los modelos murinos, el Tg2576 y el APP/PS1 representan el mayor porcentaje en artículos publicados, en base a que fueron dos de los primeros modelos desarrollados. En los últimos años, el modelo 3xTg-AD se ha convertido en uno de los modelos más utilizados.

El modelo utilizado en el presente estudio es el mejor modelo de ratón para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Se trata del triple transgénico 3xTg-AD (Figura 12), que reproduce las principales alteraciones fisiopatológicas de la enfermedad siguiendo un patrón temporal similar a la patología en humanos (Oddo, Caccamo et al. 2003). Se considera el modelo que mejor reproduce los cambios y alteraciones patológicas en comparación con humanos (Bilkei-Gorzo 2014) y que correlaciona temporalmente con la acumulación intraneuronal de β -amiloide. Además este modelo muestra déficits cognitivos asociados a la edad de los ratones. El modelo, también permite por primera vez, estudiar las diferentes interacciones patológicas entre el β -amiloide y la proteína tau.

Este modelo fue creado por el laboratorio del Dr. LaFerla, en la Universidad de California Irvine (Oddo, Caccamo et al. 2003). Estos ratones además de sobreexpresar APP_{SWE}, también sobreexpresan presenilina 1, la cual constituye un elemento esencial del complejo γ -secretasa, y la proteína Tau. En el modelo 3xTg-AD, la aparición de las placas de β -amiloide en córtex e hipocampo precede a la formación de ovillos neurofibrilares, bajo un patrón similar al que se observa en

Javier Frontiñán Rubio

humanos. El modelo surge de la inserción de dos transgenes (APP_{SWE} y τ_{P301L}) en el modelo de ratón $PS1_{M146V}$ (Figura 11).

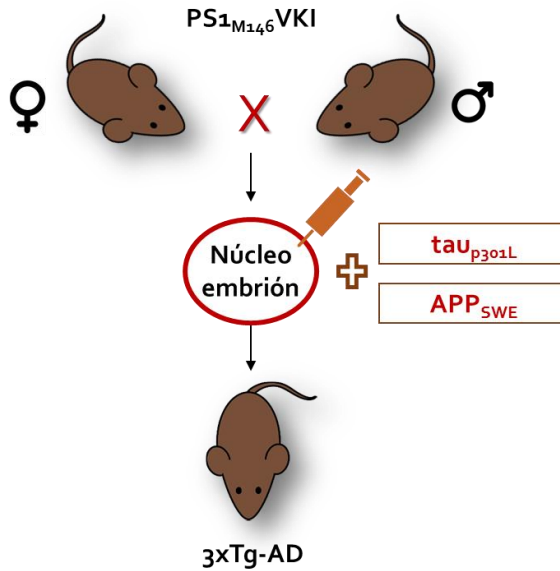


Figura 12. Modelo 3xTg-AD. El modelo animal 3xTg-AD creado por LaFerla, presenta transgenes humanos necesarios para desarrollar las estructuras histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer.

A nivel histopatológico, en primer lugar aparecen acúmulos de β -amiloide a nivel intracelular en corteza e hipocampo, seguido de la hiperfosforilación de la proteína tau, el depósito de placas de β -amiloide extracelulares y por último la aparición de neurofibrillas de tau fosforilada a nivel intracelular (Oddo, Caccamo et al. 2003, Gimenez-Llort, Blazquez et al. 2007, Mastrangelo and Bowers 2008). Estas alteraciones van acompañadas de una pérdida de neuronas noradrenérgicas (Manaye, Mouton et al. 2013) y colinérgicas (Girao da Cruz, Jordao et al. 2012) y de un incremento en la actividad microglial (Mastrangelo and Bowers 2008).

La deposición amiloidogénica puede ser difusa en diferentes regiones de la corteza frontal, mientras en otras regiones como CA1 se observan deposiciones mucho más concentradas que correlacionan con un incremento en los niveles de BACE1 dependientes de la edad (Cai, Zhang et al. 2012). En este modelo animal las hembras presentan una mayor carga de βA y una patología más agresiva que los machos, pudiendo ser responsables las hormonas sexuales esteroideas durante el desarrollo post-natal (Hirata-Fukae, Li et al. 2008, Carroll, Rosario et al. 2010).

Relacionado con la patología vascular, se ha observado como la supervivencia de estos ratones desciende drásticamente al ser alimentados con una dieta rica en colesterol (Hohsfield, Daschil et al. 2014).

Glioblastoma Multiforme

Etiología, prevalencia y mortalidad. El Glioblastoma Multiforme (GBM) o glioma astrocítico de grado IV (Organización Mundial de la Salud) (Louis, Ohgaki et al. 2007) es el tumor primario más agresivo y frecuente, de los más de 130 tipos de tumores que afectan al sistema nervioso central (SNC). Supone entre el 3 y el 4% de las muertes causadas por cáncer (Louis, Ohgaki et al. 2007) y la supervivencia media tras el diagnóstico ronda los 14-16 meses (Louis, Ohgaki et al. 2007). Solo en EEUU se diagnostican 10.000 casos nuevos al año, cifras similares a las observadas en Europa (Wen, Kesari et al. 2006). Esta elevada mortalidad es debida fundamentalmente a que no ha ocurrido ningún avance significativo para el tratamiento de esta patología en los últimos 30 años. Dicho tratamiento se compone de la resección quirúrgica agresiva, seguido de radioterapia y quimioterapia con el agente alquilante del DNA temozolomida (TMZ) (Stupp and Newlands 2001). A pesar del tratamiento, el tumor recidiva porque las células infiltradas no eliminadas por la cirugía escapan de los tratamientos citotóxicos y siguen proliferando e invadiendo, lo cual pone de manifiesto la necesidad de búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan solventar estos problemas. Resistencia a terapias y su elevada capacidad invasiva e infiltrativa son dos de los sellos de identidad clave en la búsqueda de nuevas terapias.

Origen y subtipos celulares. Este tipo de tumor puede aparecer *de novo* (tumores primarios) o desarrollarse a partir de astrocitomas de bajo grado (WHO grado II) o de astrocitomas anaplásicos (WHO grado III) (tumores secundarios), siendo la aparición *de novo* la más común y la de peor pronóstico (Louis, Ohgaki et al. 2007). La teoría más aceptada sobre el origen de los tumores *de novo*, es que surgen a partir de células iniciadoras de tumores (TICs) con características de células madre gliales (GSC). En diferentes estudios se ha visto como estas células expresan CD-133 (prominina-1) y tiene capacidad de regenerar tumores *in vitro* y en modelos *in vivo* (Hadjipanayis and Van Meir 2009, Hadjipanayis and Van Meir 2009).

Mediante técnicas genómicas se han identificado varios subtipos de GBM, agrupados según perfiles de expresión característicos de células progenitoras neurales (subclase proneural, PN), de neuronas (subclase neural N), de células proliferativas (subclase clásica, CLAS) y de células mesenquimales (subclase mesenquimal, MES) (Huse, Phillips et al. 2011). Estudios recientes han demostrado que las diferentes subclases pueden ser indicativo de pronóstico clínico. Dentro de estas subclases, la MES, es la más común en tumores primarios, la más agresiva y más resistente a tratamientos citotóxicos y citostáticos.

A nivel genómico, el GBM presenta varias alteraciones características (Cancer Genome Atlas Research 2008) como las mutaciones de Rb /p53;

Javier Frontiñán Rubio

PI3K/AKT/PTEN/mTOR y RTK/RAS/RAF/MEK/ERK, destacando esta última ruta, ya que aparece alterada en el 88% de los casos estudiados.

Características histopatológicas. A nivel tisular, el GBM se caracteriza por necrosis e hiperproliferación microvascular, características que le diferencian del resto de gliomas, donde la alteración de la vasculatura peritumoral es menor. Las muestras histológicas de estos tumores muestran vasos trombosados con núcleos necróticos, donde se generan elevados niveles de hipoxia ($pO_2 = 2.5-5\%$). Esto produce que las células tumorales migren huyendo de esta falta de oxígeno y nutrientes, formando unas regiones invasivas hipercelulares (pseudoempalizadas) que rodean a los núcleos necróticos (Rong, Durden et al. 2006) (Figura 13). Se ha propuesto que estas regiones multicelulares están formadas, fundamentalmente, por células con una elevada tasa de motilidad, ya que la tasa de proliferación de las mismas es 25% menor que el resto de células de GBM. Estas pseudoempalizadas (Figura 13) se caracterizan por una elevada hipoxia y la expresión de factores inducidos por hipoxia (HIF-1) que estimulan la secreción de factores de crecimiento endotelial (VEGF), actuando sobre sus receptores específicos en células endoteliales (VEGFR-1 & VEGFR-2), promoviendo angiogénesis aberrante y neovascularización en las regiones cercanas a las pseudoempalizadas (Brat and Van Meir 2004).

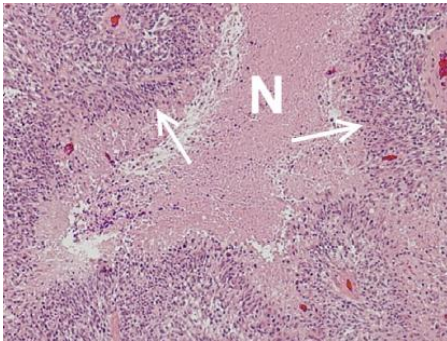


Figura 13. Ejemplo de pseudoempalizada. Pseudoempalizada (Cavazos et al., 2015) de una muestra de GBM humano, donde se observa una región necrótica (N) y las células migrando desde esa zona (Flechas).

Los pasos por los que se forman estas estructuras son los siguientes (Brat and Van Meir 2004):

1. Oclusión vascular asociada a una trombosis intravascular.
2. Hipoxia en las regiones que rodean a esta patología vascular asociada a un incremento en la expresión de HIF-1 α .
3. Migración de células de GBM alejándose de las regiones hipóxicas, formando las pseudoempalizadas.
4. Muerte de las células que no han migrado y formación del núcleo necrótico.
5. Secreción de factores proangiogénicos (VEGF e IL-8) inducida por la hipoxia.

6. Angiogénesis exacerbada que genera una gran proliferación microvascular en regiones que rodean a la hipoxia.
7. Expansión de las células infiltrativas hacia la nueva vasculatura.

Principales *hallmarks* del GBM

La malignidad del GBM se debe a una serie de *hallmarks*, relacionados todos ellos en mayor o menor medida con la hipoxia y la sobreexpresión del factor de transcripción HIF-1 α (Figura 14).

La remodelación metabólica juega un papel clave en la obtención de energía, pero también en la generación de ROS. Este proceso favorece la elevada proliferación celular del GBM que viene acompañada de una gran invasión e infiltración celular en el cerebro. Para que estos procesos sean posibles es necesario una producción de vasculatura y una interacción con el microambiente tumoral basada en alteraciones inflamatorias. El GBM también se caracteriza por una resistencia a las terapias convencionales, tanto radio como quimioterapia (Figura 14).

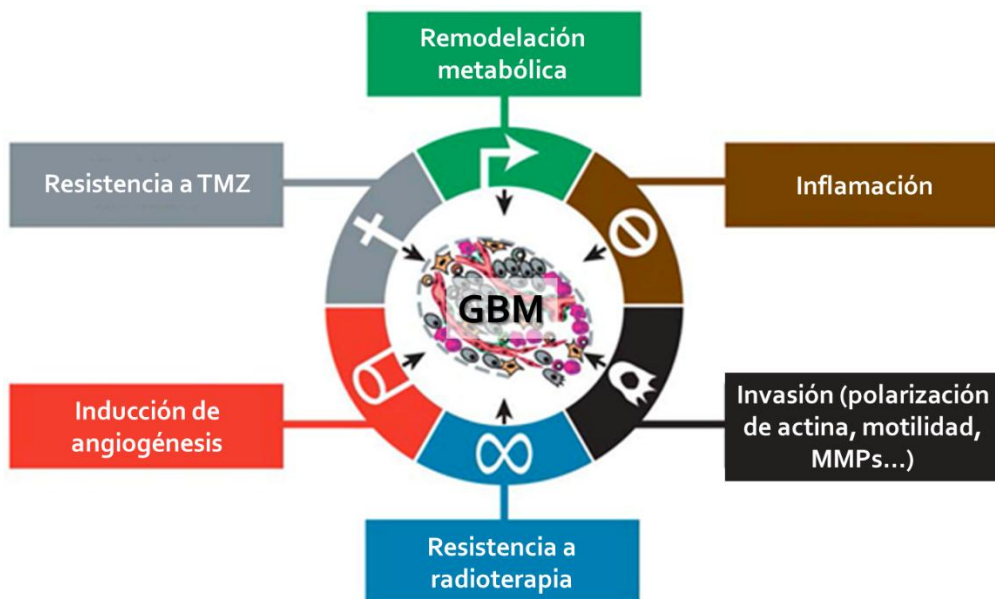


Figura 14. Principales *hallmarks* del GBM. Modificación del clásico esquema de Hanahan sobre los *hallmarks* del cáncer (Hanahan and Weinberg 2000). Se representan los principales *hallmarks* del GBM. Sobre todos ellos la hipoxia y HIF-1 juegan un papel clave.

La hipoxia y la sobreexpresión de HIF-1 son los principales responsables de estas alteraciones. Se trata de un heterodímero formado por una subunidad α , cuya estabilidad se regula por O_2 , y una subunidad β expresada de forma constitutiva (Dewhirst, Cao et al. 2008). En condiciones normoxicas y en células no tumorales, la subunidad α se degrada por vía proteolítica. En células tumorales, el incremento de

ROS generado por la remodelación metabólica inhibe la degradación proteosomal de la subunidad α , estabilizándola (Dewhirst, Cao et al. 2008, Semenza 2010). HIF-1 α (Figura 15) estabilizado actúa sobre numerosos genes relacionados con angiogénesis, proliferación tumoral, supervivencia celular, resistencia a estrés oxidativo, resistencia a terapias, metabolismo glicolítico aeróbico, etc., por activación de la vía PI3K/Akt/Tor5, Ras/MEK/ERK, EGFR y NF- κ B, principalmente (Dewhirst, Cao et al. 2008). Paralelamente, induce la actividad ciclooxigenasa y metaloproteasa, facilitando la capacidad invasiva del GBM (Rademakers, Span et al. 2008).

HIF-1 α a su vez está regulado por la hipoxia, pero también intervienen en su regulación factores de crecimiento, estrés metabólico y mitocondrial o ROS a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional (Dewhirst, Cao et al. 2008) (Figura 15).

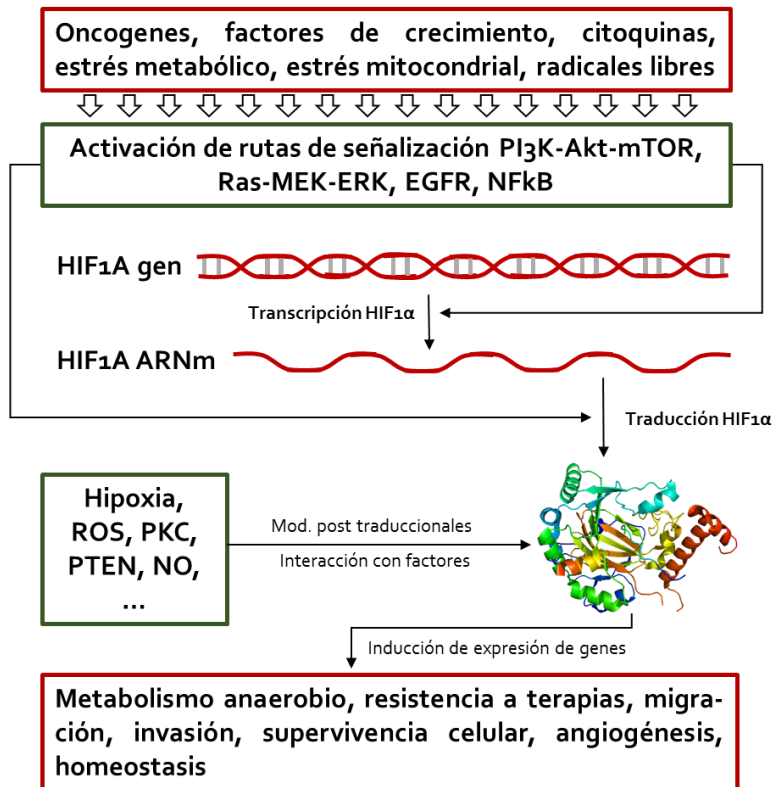


Figura 15. Regulación y funciones de HIF-1 α . La subunidad α de HIF-1 se regula a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional por diferentes factores, entre los que destacan la hipoxia, el estrés oxidativo, estrés metabólico, etc. La síntesis está regulada principalmente por rutas de señalización PI3K y Ras (modificado de Dewhirst, Cao et al., 2008).

HIF-1 α regula procesos relacionados con los principales *hallmarks* del GBM, pero sobre estos, intervienen una gran variedad de alteraciones que se describirán en los siguientes apartados.

Remodelación metabólica. La elevada proliferación en cáncer supone un auténtico desafío energético para el metabolismo celular. De hecho numerosas mutaciones observadas en cáncer están relacionadas con el control metabólico alternativo (Levine and Puzio-Kuter 2010). La remodelación metabólica hace referencia al uso de vías alternativas de metabolitos importantes, como la glucosa, el glucógeno, ácidos grasos, aminoácidos y glutamina por parte de células tumorales. El primero en observar este proceso fue Otto Warburg en 1956. Las células normales generan el 10% del ATP usando la glucólisis y el 90% a través de la mitocondria por la fosforilación oxidativa (OXPHOS). En cambio, en gran variedad de tumores más del 50% del ATP se genera por glucólisis, con la particularidad que ésta ocurre en condiciones aeróbicas. Este proceso se conoce como efecto Warburg (Warburg 1956, Vander Heiden 2011). La exacerbada producción de lactato intracelular está directamente relacionado con la radioresistencia, mientras que el secretado promueve la neovascularización, tumoral y la evasión de la respuesta inmune (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011). Por tanto, el efecto Warburg es clave en la progresión del GBM (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011).

Por otra parte, la glucólisis aeróbica favorece la supervivencia tumoral por diferentes vías, por ejemplo permitiendo la adaptación a las fluctuaciones en los niveles de oxígeno derivados de la alteración vascular que caracteriza al GBM (Gatenby and Gillies 2004). También el lactato secretado favorece la activación de catepsinas y metaloproteasas, induciendo el crecimiento y promoviendo la motilidad e invasión de las células tumorales (Swietach, Vaughan-Jones et al. 2007). El lactato generado por células del estroma cerebral es incorporado por las células tumorales que sobreexpresan los transportadores de lactato, y lo utilizan para generar energía (Pavlides, Whitaker-Menezes et al. 2009). Además, se ha observado que el lactato generado por glucólisis en regiones hipóxicas, es utilizado por células de regiones cercanas donde el aporte de oxígeno es mayor (Koukourakis, Giatromanolaki et al. 2006).

Migración e invasión: polarización y metaloproteasas. Las células que incrementan su capacidad de migrar e invadir, en primer lugar cambian su morfología, polarizándose e interaccionando de forma diferencial con componentes de la matriz extracelular (ECM) (Paw, Carpenter et al. 2015). Esta elevada motilidad está relacionada con la estabilización de la subunidad α del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) (Shi, Zheng et al. 2015) y la activación de rutas clave como la de Akt (Wang, Zhan et al. 2014) o TGF- β (Zhong, He et al. 2015). También se ha observado como el incremento en los niveles de lactato, consecuencia del

Javier Frontiñán Rubio

metabolismo glicolítico, propio de estas células, favorece la motilidad (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011).

En el proceso de invasión celular es esencial la degradación de la matriz extracelular, donde juegan un papel clave las metaloproteasas (MMPs), un conjunto de proteasas de matriz que aparecen sobreexpresadas en células de GBM, al igual que en múltiples tipos de cáncer (Paw, Carpenter et al. 2015). Las principales MMPs que regulan la invasión en GBM son la 2, 7 y 9 (Paw, Carpenter et al. 2015), regulados principalmente por vías que implican la activación de Akt y NF- κ B (Paw, Carpenter et al. 2015). Es más, se ha observado un incremento en la capacidad degradativa de componentes de la matriz extracelular en células que componen las pseudoempalizadas, donde se sobreexpresa la metaloproteasa 2 (Ben-Yosef, Lahat et al. 2002). Esta capacidad invasiva viene regulada en última instancia por la sobreexpresión de HIF-1 α (Semenza 2012, Semenza 2013).

Angiogénesis aberrante. Folkman hipotetizó en 1971 la relación directa entre angiogénesis y crecimiento tumoral, sugiriendo que la inhibición de procesos angiogénicos podría mantener el tumor en un estado de quiescencia (Folkman 1971). Desde entonces se ha observado que el proceso angiogénico aparece en todos los tumores sólidos, motivado por la elevada tasa de crecimiento y su necesidad continua de nutrientes.

El GBM se caracteriza por una gran hiperplasia microvascular, la más elevada de todos los tumores sólidos. De hecho, en modelos de xenoinplante se ha comprobado que existe una gran correlación entre el desarrollo del tumor y la hiperplasia microvascular (Ricard, Stanchi et al. 2013), considerándose el nivel de vasculatura como un factor de pronóstico negativo. Hay varios factores que regulan el proceso angiogénico en el GBM. Como en otros tipos tumorales, el principal factor es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). Este factor está incrementado más de 10 veces en GBM frente a gliomas de bajo grado (Schmidt, Westphal et al. 1999). También se han identificado otros factores angiogénicos muy potentes en GBM como las angiopoyetinas 1 y 2, PDGF, interleuquina-8 (IL-8) o el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Schmidt, Westphal et al. 1999).

La angiogénesis del GBM es compleja. En primer lugar, el rápido crecimiento del tumor propicia la necesidad de nutrientes y oxígeno y para solventar el problema induce la formación de nuevos vasos. Hasta el momento, se han descrito 5 tipos diferentes de mecanismos de neovascularización en GBMs (Hardee and Zagzag 2012).

- Asociación vascular: es el primer mecanismo por el que los GBM desarrollan vasculatura. Se basa en la agrupación de células tumorales alrededor de

vasos formando pseudoempalizadas. Se ha visto que estos vasos sobreexpresan angiopoyetina 2 (Holash, Maisonpierre et al. 1999)

- Neovangiogénesis: tras el proceso anterior, se empiezan a formar nuevos vasos a partir de vasos ya formados. Este proceso ocurre en condiciones fisiológicas y patológicas y fue observado como un proceso exacerbado en GBMs por primera vez en 1976 (Brem 1976). La hipoxia es el principal inductor de este proceso en GBM a través de la activación del HIF-1 α (Dewhirst, Cao et al. 2008).
- Vasculogénesis: es un proceso que varía en función del subtipo tumoral. Se basa en el reclutamiento y diferenciación de progenitores endoteliales procedentes de la médula ósea (Brown 2014). Estudios recientes muestran como procesos hipóxicos inducen este mecanismo a través de la regulación de TIE-2 y de la ruta SDF-1/CXCR4 (Aghi, Cohen et al. 2006).
- *Mimetismo vascular*: se basa en la capacidad de las células tumorales de formar redes funcionales similares a los vasos. A pesar de que es un proceso que se observó por primera vez en melanoma (Demou and Hendrix 2008). Estudios recientes han identificado este proceso en gliomas (Yue and Chen 2005), llegando incluso a asociarlo con mecanismos de radioresistencia (Shaifer, Huang et al. 2010).
- Transdiferenciación GBM/EC: es el proceso descubierto más recientemente y aún está en fase de estudio. Implica la dediferenciación de la célula de GBM y su diferenciación a un fenotipo endotelial (Hardee and Zagzag 2012).

De todos los procesos mencionados, destaca la generación de pseudoempalizadas, uno de los principales *hallmarks* del GBM, del que ya se ha hablado previamente.

Estudios recientes identifican la leptina como un factor angiogénico relevante en tumores cerebrales ya que esta hormona está regulada por hipoxia (entre otros factores) y su receptor específico (Obr) se expresa en células endoteliales (Morash, Johnstone et al. 2000). De hecho, en GBM se han encontrado niveles muy elevados tanto del receptor como de la leptina, sobre todo en regiones perivasculares. La leptina secretada por la célula de GBM actúa de forma paracrina sobre células endoteliales induciendo su proliferación y migración por activación de la vía de Akt (Ferla, Bonomi et al. 2011).

Sin embargo, la vasculatura exacerbada del GBM es aberrante. Los nuevos vasos suelen ser defectuosos, presentando un endotelio permeable, pocos pericitos y una estructura anormal, indicativa de su escasa madurez. En consecuencia, se ve alterada su función (Dvorak 2003). Para la correcta función de la microvasculatura son necesarios los pericitos. Estos ejercen un papel de sustento y protección de las ECs (Cheng, Huang et al. 2013). La vasculatura inmadura presenta una menor

Javier Frontiñán Rubio

cobertura de pericitos, lo que está ligado no sólo a una mayor permeabilidad vascular y a una dificultad en el intercambio de metabolitos, sino también en una disminución en la respuesta a terapias (Franco, Roswall et al. 2011). El control de la interrelación entre ECs, pericitos y células del GBM supone una diana para el abordaje terapéutico de la patología.

Alteraciones inflamatorias. Estudios recientes muestran como la capacidad invasiva viene, también, determinada por el microambiente tumoral, donde juegan un papel clave los neovasos, macrófagos infiltrados y microglía (Charles, Holland et al. 2012). Esta microglía y macrófagos asociados a gliomas, suponen el 30% de las células inflamatorias tumorales y juegan un papel fundamental mediante la secreción de quimioquinas, citoquinas y proteínas asociadas a la matriz extracelular, entre otras muchas funciones (Charles, Holland et al. 2012).

El microambiente tumoral en el GBM está formado por varios tipos celulares, incluyendo células con propiedades inflamatorias, células con características "stem" y células con marcadores gliales, entre otras (Li and Graeber 2012). Condiciones como la elevada hipoxia y la formación de nuevos vasos, inducen la infiltración de macrófagos, eosinófilos, neutrófilos y linfocitos T (Sowers 2014). Se establece un complejo sistema de señalización entre todos estos tipos celulares y también con las células tumorales, en el que intervienen citoquinas tanto autocrinas como paracrinas, alterando múltiples rutas de señalización. De este modo se induce la proliferación tumoral, angiogénesis e invasión (Sowers 2014).

Las células de GBM secretan citoquinas e interleuquinas responsables de la quimioatracción de macrófagos y monocitos. Entre estas moléculas destacan la interleuquina 6 (IL-6), el factor quimioattractor de macrófagos (MCP-1) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), entre otros. Estas moléculas regulan factores de transcripción que regulan positivamente la proliferación celular, supervivencia, invasión y resistencia a terapias (McFarland, Hong et al. 2013), como los factores NF-kB y STAT3, cuya regulación es mediada por un mecanismo dependiente de un aumento de ROS (McFarland, Hong et al. 2013). De hecho, se propone que controlando el nivel de ROS en el microentorno tumoral se podría normalizar el nivel de NF-kB y STAT3, reduciendo la respuesta pro-inflamatoria asociada al desarrollo del tumor (Bhat, Balasubramanian et al. 2013).

Los macrófagos, bien sean infiltrados o diferenciados a partir de monocitos, contribuyen a la progresión tumoral mediante la secreción de factores de crecimiento y también por secreción de metaloproteasas (MMPs) que degradan la matriz extracelular favoreciendo la migración (Fiaschi and Chiarugi 2012). A su vez, liberan VEGF, promoviendo angiogénesis y favoreciendo el crecimiento tumoral (Fiaschi and Chiarugi 2012). Por otra parte, cuando los macrófagos son estimulados

por citoquinas secretadas por células de GBM producen O_2 , H_2O_2 y NO generando un incremento en el EO.

Resistencia a radioterapia. Una etapa clave en el tratamiento del GBM es la resección quirúrgica radical, que busca eliminar la mayor parte de la masa tumoral, afectando lo menos posible al tejido sano. Las nuevas técnicas de imagen han permitido optimizar este proceso obteniendo resecciones más completas (Anton, Baehring et al. 2012). Sin embargo, a pesar de estos avances, la naturaleza infiltrativa del GBM dificulta la resección completa. Tras la resección quirúrgica se inician los tratamientos de radioterapia y quimioterapia con temozolomida (TMZ) (Figura 16) (Laperriere, Zuraw et al. 2002), si bien los pacientes pueden ser tratados previamente con antiepilépticos, heparina de bajo peso molecular y esteroides durante un periodo máximo de 6 semanas.

El tratamiento citotóxico mediante radioterapia, actualmente consiste en la irradiación con 50-60 Greys (Gy) de forma fraccionada en dosis de 1,8 a 2 Gy (Laperriere, Zuraw et al. 2002). El efecto de la radioterapia es doble. De forma directa impacta en lípidos y proteínas y también en el DNA, produciendo roturas en la doble hélice y conduciendo a apoptosis. Por otra parte, el efecto indirecto es debido por ionización de la fracción acuosa del citosol y nucleoplasma, induciendo la formación de radicales libres que impactan nuevamente sobre lípidos, proteínas y el DNA, produciendo más mutaciones irreparables (Laperriere, Zuraw et al. 2002). Este incremento de ROS genera un elevado EO que contribuye a la muerte celular por apoptosis en paralelo a los efectos directos.

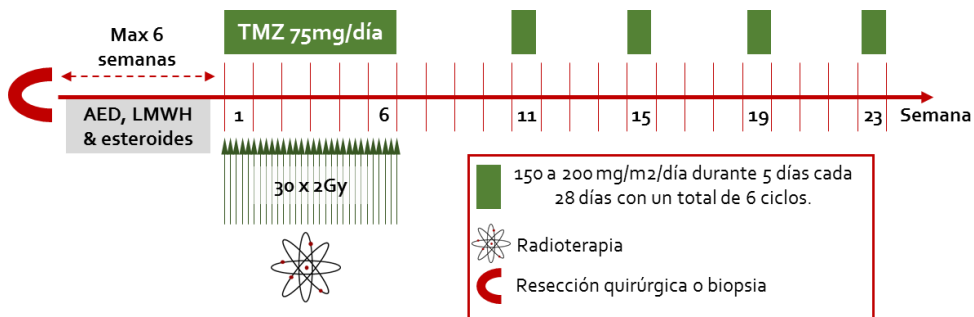


Figura 16. Esquema del desarrollo temporal de la terapia frente al GBM. Tras la resección quirúrgica y durante un periodo máximo de 6 semanas se puede tratar a los pacientes con heparina de bajo peso molecular, esteroides y anti-epilépticos. Posteriormente se inicia la radioterapia y los ciclos de quimioterapia. Estudios recientes muestran como el tratamiento con TMZ puede radiosensibilizar las células de GBM por lo que este esquema ya se está modificando (Adaptado de Laperriere, Zuraw et al. 2002; Stupp and Newlands 2001).

Sin embargo, el GBM se caracteriza por ser extremadamente radio-resistente, ya que es capaz de poner en marcha la respuesta radioadaptativa (Olivieri, Bodycote et al. 1984, Jamal, Rath et al. 2010). El concepto de respuesta radioadaptativa surgió

Javier Frontiñán Rubio

en 1984 (Olivieri, Bodycote et al. 1984). Se basa en la sobreproducción de enzimas antioxidantes y proteínas que reparan el daño en el DNA (Bravard, Luccioni et al. 1999). Hay múltiples estudios que muestran como p53 juega un papel fundamental en esta respuesta (Dahm-Daphi 2000), aunque el origen está orquestado, fundamentalmente por la mitocondria. En GBM, como en otros tipos de cáncer, las mitocondrias disfuncionales producen altos niveles del $O_2^{\cdot-}$ que dismuta a H_2O_2 . El H_2O_2 se trasloca al citosol donde induce la expresión de enzimas antioxidantes (Murphy 2009, Fiaschi and Chiarugi 2012). Los niveles elevados de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 son tóxicos para las células de GBM, por lo que contrarrestan estos niveles incrementando sus mecanismos de defensa antioxidante, sobreexpresando enzimas como la SOD2, CAT o GSH. Los niveles de CAT y SOD2 aparecen incrementados (Lee, Kim et al. 2004, Deighton, Le Bihan et al. 2014) por mecanismos dependientes de factores de transcripción FOXO (Nogueira, Park et al. 2008, Gorrini, Harris et al. 2013). El elevado nivel de lactato producido por la glucólisis aerobia, también juega un papel clave, ya que se comporta como antioxidante (Groussard, Morel et al. 2000), y está correlacionado con resistencia a radiación (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011). Esta hipertrofia en la maquinaria antioxidante, orquestada por enzimas y pequeñas moléculas, impide los daños celulares inducidos de forma secundaria por la radioterapia, al reducir los niveles de ROS (Fiaschi and Chiarugi 2012).

Otro factor asociado a la respuesta radioadaptativa del GBM es NF- κ B. Su activación está asociada con la resistencia a radioterapia en células de GBM, en concreto de subtipo mesenquimal (Bhat, Balasubramaniyan et al. 2013). Esto es debido, principalmente, a la activación por parte de NF- κ B de potentes rutas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL (Basseres and Baldwin 2006). En diferentes estudios se ha observado como la radioterapia y también la quimioterapia inducen la expresión de NF- κ B (Russo, Tepper et al. 2001, Nakanishi and Toi 2005).

Resistencia a quimioterapia con TMZ. El uso de la TMZ en el tratamiento del GBM supone tan solo un incremento de 2 meses en la supervivencia media de los pacientes. Sin embargo, desde su paso a la clínica tras un exitoso uso en modelos murinos, se ha convertido en un estándar. La TMZ daña a las células produciendo O^6 -metilguanina, N^7 -metilguanina y N^3 -metiladenosina. Estas alteraciones generan tras varias replications del DNA, roturas de doble cadena (DSBs). La O^6 -metilguanina es la que produce una mayor citotoxicidad (Villalva, Cortes et al. 2012) desencadenando la apoptosis celular (Hirose, Berger et al. 2001, Hermisson, Klumpp et al. 2006) pero también autofagia (Kanzawa, Germano et al. 2004, Filippi-Chiela, Villodre et al. 2011), senescencia y catástrofe mitótica (Hirose, Berger et al. 2001). En la mayoría de las células, la TMZ genera una detención del ciclo celular en la fase G2/M, por la activación de las quinasas ATM y ATR (Newlands, Stevens et al.

1997), que lleva a la catástrofe mitótica, basada en la entrada de la células en mitosis con el DNA dañado, lo que lleva, en última instancia a la muerte celular (Castedo, Perfettini et al. 2004, Huang, Fletcher et al. 2008).

La TMZ muestra una toxicidad periférica mínima a dosis usadas en terapia concomitante con radioterapia (75mg/m²/día o 150-200 mg/m²/día) durante 5 días cada 28 días con un total de 6 ciclos tras la irradiación (Stupp and Newlands 2001). Sin embargo, hay tumores resistentes a la TMZ. Esta resistencia parece estar correlacionada con el grado de metilación del promotor del gen que codifica la O⁶-metilguanina metil transferasa (MGMT). Cuanto mayor es el grado de metilación, menor expresión de MGMT y por lo tanto una mejor respuesta a TMZ (Villalva, Cortes et al. 2012). MGMT es un mediador en la reparación del daño en el DNA ya que elimina el daño producido por alquilación en el residuo O6 de las guaninas (Villalva, Cortes et al. 2012). De hecho, se piensa que las rutas asociadas a reparación del DNA son el mayor sistema de resistencia terapéutica en cáncer. La eficacia de la TMZ mejora en pacientes con el promotor de MGMT metilado (Agnihotri, Burrell et al. 2014). La TMZ, además, actúa como radiosensibilizador, poniendo de manifiesto que su uso debería ser previo a la radioterapia, al menos las primeras dosis (Carlson, Grogan et al. 2009).

Otro problema muy importante asociado a la TMZ es la recurrencia tras el tratamiento. *Chen* y colaboradores observaron en 2012 como subpoblaciones con características de células madre de glioma (Glioma Stem Cells, GSCs) adquirirían una gran capacidad proliferativa que permitían rápidamente la expansión tumoral (Chen, Li et al. 2012).

Otro mecanismo de evasión de la apoptosis inducido por la TMZ es la autofagia. Este mecanismo aparece muy conservado a nivel evolutivo y puede estar asociado tanto a procesos de supervivencia como de muerte celular (Tanida 2011). Es el proceso por el cual se forman los autofagosomas, que son unas vesículas que incorporan material citoplasmático y lo transportan hasta los lisosomas donde se degrada, induciendo la muerte celular. En cáncer induce respuestas de quimioresistencia frente a quimioterapia (Kimmelman 2011, Wei, Zou et al. 2013). Una de las principales rutas que modulan la autofagia es la de mTOR (Jung, Ro et al. 2010), esta ruta aparece hiperactivada en GBM (Gini, Zanca et al. 2013) induciendo supervivencia celular (Prasad, Sottero et al. 2011). mTOR se estabiliza por condiciones de hipoxia, estrés celular y remodelación energética (Feldman, Apsel et al. 2009). Su importancia es tal sobre la quimioresistencia su ruta es una de las principales dianas para la búsqueda de fármacos actualmente frente al GBM (Liu, Wang et al. 2015, Yu, Xie et al. 2015).

Estrés oxidativo

Al contrario de en células sanas, la supervivencia de las células de GBM viene favorecida por el incremento de radicales libres, ya que estas células se sobrepone al problema induciendo enzimas antioxidantes como la CAT o la SOD, para controlar dicho nivel elevado de radicales libres (Kovacic and Jacintho 2001, Schumacker 2006). Como se ha mencionado previamente, este incremento está relacionado con la respuesta radioadaptativa y con la resistencia a temozolomida (Tennant, Duran et al. 2010). El aumento en los sistemas antioxidantes está ligado a la estabilización de factores inducibles por hipoxia (Hielscher and Gerech 2015) y a la activación del supresor tumoral p53, lo que permite al tumor, además, evadir la muerte celular por apoptosis (Cobbs, Whisenhunt et al. 2003). Además, hay que tener en cuenta el papel de las ROS, en particular del H₂O₂ sobre la activación de quinasas e inhibición de fosfatasa, afectando a rutas clave en el desarrollo tumoral (Rhee 2006).

Una posible estrategia terapéutica sería restablecer la homeostasis redox tumoral bloqueando la respuesta hipóxica. Múltiples evidencias indican que la capacidad invasiva del GBM y su resistencia a quimio y a radio se basan en fenotipos ligados a la hipoxia, iniciada por fenómenos vasooclusivos durante la formación de las pseudoempalizadas (Paw, Carpenter et al. 2015). Dicha hipoxia ocurre cuando la presión parcial de O₂ en un tejido desciende de 10 mm Hg (siendo 20 mm Hg la presión parcial estándar), incrementando factores de transcripción como HIF-1 (Semenza 2012). Bajo estas condiciones hipóxicas, se sobreexpresan factores proangiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), cuya acumulación induce una neovascularización aberrante (Semenza 2009).

El incremento de ROS, por tanto, es un proceso clave en el desarrollo del GBM, jugando un papel fundamental en la estabilización de HIF-1 α , factor que actúa modulando procesos de angiogénesis. Por otra parte, el nivel incrementado de ROS está relacionado con la formación de invadopodias, estructuras de actina relacionadas con la motilidad, donde se acumulan MMPs para facilitar la degradación del sustrato. Además de su función invasiva también participan en la transición epitelio mesénquima (Mallawaaratchy, Buckland et al. 2015). Las ROS inducen la formación de estas regiones a través de la proteína Tks-5 y a su vez, el incremento de los niveles de dicha proteína retroalimenta la producción de ROS, generándose un bucle regulador positivo (Diaz, Shani et al. 2009).

Como se ha visto previamente, los niveles de ROS regulan la respuesta hipóxica y estabilizan el factor HIF1- α , por lo que su control podría ser una aproximación terapéutica de interés. El uso de antioxidantes puede ser la estrategia a seguir.

Terapia con antioxidantes

Las evidencias anteriores indican la interrelación entre el EO y el desarrollo del GBM, afectando a cada uno de los *hallmarks* característicos de la patología. Estas evidencias sugieren que el uso de antioxidantes podría ser una aproximación terapéutica potencialmente efectiva para, al menos, ralentizar el progreso tumoral. De hecho, en modelos *in vitro* e *in vivo* de GBM, se han utilizado diversas estrategias orientadas a la reducción del nivel de radicales libres. Esta terapia antioxidante ha mostrado beneficios en modelos animales e incluso se han comenzado a trasladar a ensayos clínicos (Tabla 3).

Una de estas moléculas antioxidantes a las que se ha prestado especial interés durante los últimos años es el resveratrol, un polifenol antioxidante que se obtiene del hollejo de la uva. Ejerce un efecto citotóxico en diferentes tipos de cáncer como el de colón, leucemia, cáncer de mama, entre otros (Singh, Ndiaye et al. 2015). Sobre el GBM se ha visto que inhibe el crecimiento celular e induce autofagia (Filippi-Chiela, Villodre et al. 2011), apoptosis (Jiang, Zhang et al. 2005) y senescencia (Zamin, Filippi-Chiela et al. 2009). Recientemente, Filippi-Chiela y colaboradores han observado como el resveratrol actúa sobre células de GBM en sinergia con la TMZ incrementando la senescencia e induciendo catástrofe mitótica (Filippi-Chiela, Thome et al. 2013). También se ha visto como reduce la resistencia a TMZ por la disminución de MGMT a través de la ruta dependiente de NF- κ B (Huang, Lin et al. 2012). Por otra parte, el resveratrol inhibe la invasión de las GSCs en modelo *in vitro* e *in vivo*, regulando la ruta de PI3K (Jiao, Li et al. 2015).

La melatonina también se ha probado como posible adyuvante en terapia para el GBM donde a través de su regulación de las ROS inhibe la motilidad e invasión de células de GBM mediante la reducción de HIF-1 α (Zhang, Liu et al. 2013).

La caulerpina es un compuesto fitoquímico procedente de algas verdes del género *Caulerpa*. Se ha visto como, en células de GBM, reduce el nivel de radicales libres e induce la degradación de HIF-1 α por mecanismos que implican el bloqueo de la cadena de transporte electrónico (Liu, Morgan et al. 2009). Sin embargo, surge el problema de la toxicidad, ya que la caulerpina al ser administrada de forma sistémica puede producir efectos secundarios graves (Liu, Morgan et al. 2009).

Al igual que en la EA, también se está estudiando el posible efecto beneficioso de la cúrcuma en GBM. En diferentes estudios se ha observado como su administración disminuye el tamaño de tumores en modelos de rata y como su uso combinado con la TMZ podría tener una mejora en el tratamiento (Zanotto-Filho, Braganhol et al. 2012).

Javier Frontiñán Rubio

La quercetina es un flavonoide natural que en combinación con TMZ aumenta la apoptosis en células de GBM T98 (Jakubowicz-Gil, Langner et al. 2013).

En pacientes, se han desarrollado muy pocos ensayos clínicos con antioxidantes (Tabla 5). En uno de los primeros, se observó como la combinación de radioterapia con dosis de melatonina incrementaba discretamente la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes (Lissoni, Meregalli et al. 1996). Otro estudio observó como el licopeno podría ser una molécula de interés terapéutico en pacientes tratados con radio y quimioterapia aunque el grupo de estudio era reducido (Puri, Goyal et al. 2010).

Tabla 5. Ensayos con terapias antioxidantes

Antioxidante	Preclínico/ clínico	Referencia
Cúrcumina	Preclínico. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	(Zanotto-Filho, Braganhol et al. 2012)
Resveratrol	Preclínico. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	(Jiao, Li et al. 2015)
Melatonina	Clínico: 30 pacientes con GBM	(Lissoni, Meregalli et al. 1996)
Licopeno	Clínico: 50 pacientes con astrocitoma grado IV. 32 de ellos con GBM	(Puri, Goyal et al. 2010)

La incorporación de antioxidantes al tratamiento del GBM podría suponer una mejora de las terapias convencionales. El CoQ10 podría ser una molécula de elevado interés. El pre-tratamiento con CoQ10 podría reducir los niveles de ROS y por lo tanto de la maquinaria antioxidante celular, favoreciendo el efecto de la radioterapia.

Modelos murinos

Aunque no hay un modelo idóneo para la biología tumoral, los modelos murinos suponen el mejor abordaje actual para estudiar la contribución de cada uno de los componentes a la progresión de estas patologías. El primer modelo murino tumoral data de 1916, cuando Loeb y Lathrop publicaron los efectos de hormonas en el desarrollo de tumores en ratones (Lathrop and Loeb 1916). Desde entonces los ratones se han convertido en el modelo más utilizado para el estudio del cáncer. A lo largo de los años se han ido desarrollando diferentes modelos y abordajes para conocer más acerca de diferentes componentes de esta devastadora enfermedad. Entre estos modelos destacan los xenograft, ortotópicos y los que implican modificaciones genéticas (Dai and Holland 2001).

En el estudio del GBM, los modelos deben recapitular las características clave de la enfermedad humana, además deben ser reproducibles y mostrar un progreso de la enfermedad similar (Kleihues, Zulch et al. 1970, Maher, Furnari et al. 2001). Los modelos murinos para el GBM se han usado durante más de 30 años, a pesar de

algunas críticas recibidas por no recapitular todas las condiciones patológicas (Candolfi, Curtin et al. 2007). Los modelos *in vivo* de tumores en los que se implantan líneas celulares de GBM de forma intracraneal o subcutánea son los más utilizados para la búsqueda de nuevas terapias, ya que muestran angiogénesis, invasión, secreción de moléculas inflamatorias e inmunes, etc. (Chiocca 2002, Rainov and Ren 2003, Curtin, King et al. 2005). Estos modelos presentan una gran reproducibilidad, una gliomagénesis eficaz y nos permiten un conocimiento exacto de la localización del tumor (King, Curtin et al. 2005). Dentro de este grupo de modelos, destaca el uso de líneas de GBM humanas implantadas en ratones inmunosuprimidos (Candolfi, Curtin et al. 2007). Este modelo presenta como inconveniente que no se pueden hacer estudios relacionados con la respuesta inmunológica, además, estos modelos también han sido criticados por no representar con precisión la composición celular de los tumores originales (Candolfi, Curtin et al. 2007). Pero muestra una gran ventaja a la hora de hacer aproximaciones terapéuticas con tumores de origen humano, además de todas las ventajas mencionadas previamente (Candolfi, Curtin et al. 2007).

Uno de los modelos más estudiado es el desarrollado con la línea U251 (Candolfi, Curtin et al. 2007) en ratones inmunosuprimidos. Esta línea celular fue estabilizada por Ponten hace más de 40 años (Ponten and Macintyre 1968). Estas células reproducen la patofisiología tumoral humana y presenta alteraciones en p53, mutaciones en PTEN y deleciones en p14^{ARF} y p16 (Furnari, Fenton et al. 2007). Además la ruta de PI3K y Akt se encuentra sobre-activada, lo cual contribuye a una mayor proliferación, supervivencia celular, motilidad, angiogénesis y resistencia a terapias (Furnari, Fenton et al. 2007). Como ya se ha comentado a pesar de las desventajas a la hora del estudio de la respuesta inmunológica, los modelos con U251 reproducen la angiogénesis tumoral, invasión e infiltración y crecimiento localizado.

En modelos intracraneales se inyectan entre cien mil y 2 millones de células. El modelo intracraneal reproduce características clave del GBM. Se observan células infiltrativas dentro del parénquima cerebral, regiones necróticas con pseudoempalizadas, una proliferación vascular aberrante con hipertrofia del endotelio, etc. (Candolfi, Curtin et al. 2007, Radaelli, Ceruti et al. 2009). A pesar de que el patrón invasivo no es extremadamente infiltrativo, si reproduce fielmente las alteraciones vasculares.

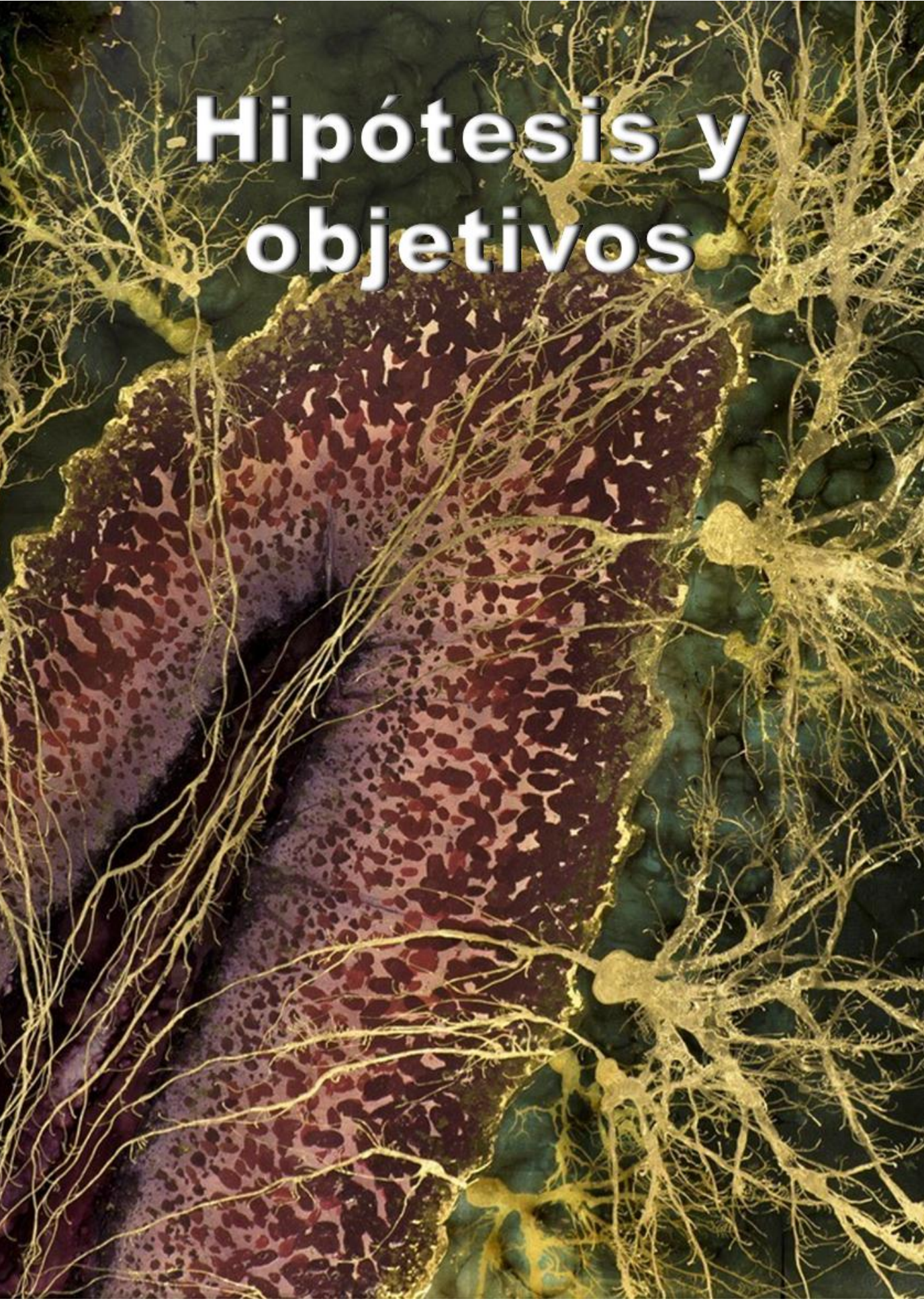
En el caso de los xenografts, los modelos con U251 muestran marcaje positivo frente a GFAP y a vimentina (Brat and Van Meir 2004), además, un 50% de las células tumorales muestran un marcaje positivo para Ki-67, un indicador de proliferación celular. Estos modelos también muestran regiones de pseudoempalizadas y

Javier Frontiñán Rubio

necrosis que se marcan positivamente con caspasa 3 y HIF-1 α (Radaelli, Ceruti et al. 2009). Estudios recientes han mostrado además, como aparecen poblaciones positivas para CD 133, un marcador de células iniciadoras de glioma (GICs) (Qiang, Yang et al. 2009).

En este mismo modelo celular se han observado diferencias en los patrones de expresión genética entre modelos subcutáneos e intracraneales, poniendo de manifiesto la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo del GBM (Camphausen, Purow et al. 2005). Finalmente, el uso de ratones inmunosuprimidos, es necesario para el desarrollo de modelos murinos con líneas tumorales humanas, siendo el modelo idóneo para el estudio de moléculas y compuestos de interés terapéutico.

Hipótesis y objetivos



Nunca podrás ganar o perder si nunca
corres la carrera

David Bowie

Los ROS y el estrés oxidativo intervienen durante el inicio y la progresión de patologías tan dispares como la enfermedad de Alzheimer y el glioblastoma multiforme. La hipótesis principal del presente proyecto de Tesis es que *el nivel de ROS asociado a la enfermedad de Alzheimer y el glioblastoma multiforme, podría disminuirse con el antioxidante lipofílico coenzima Q, restaurando la homeostasis redox y ralentizando la progresión de ambas patologías.*

Para contrastar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos específicos, desglosados por patología:

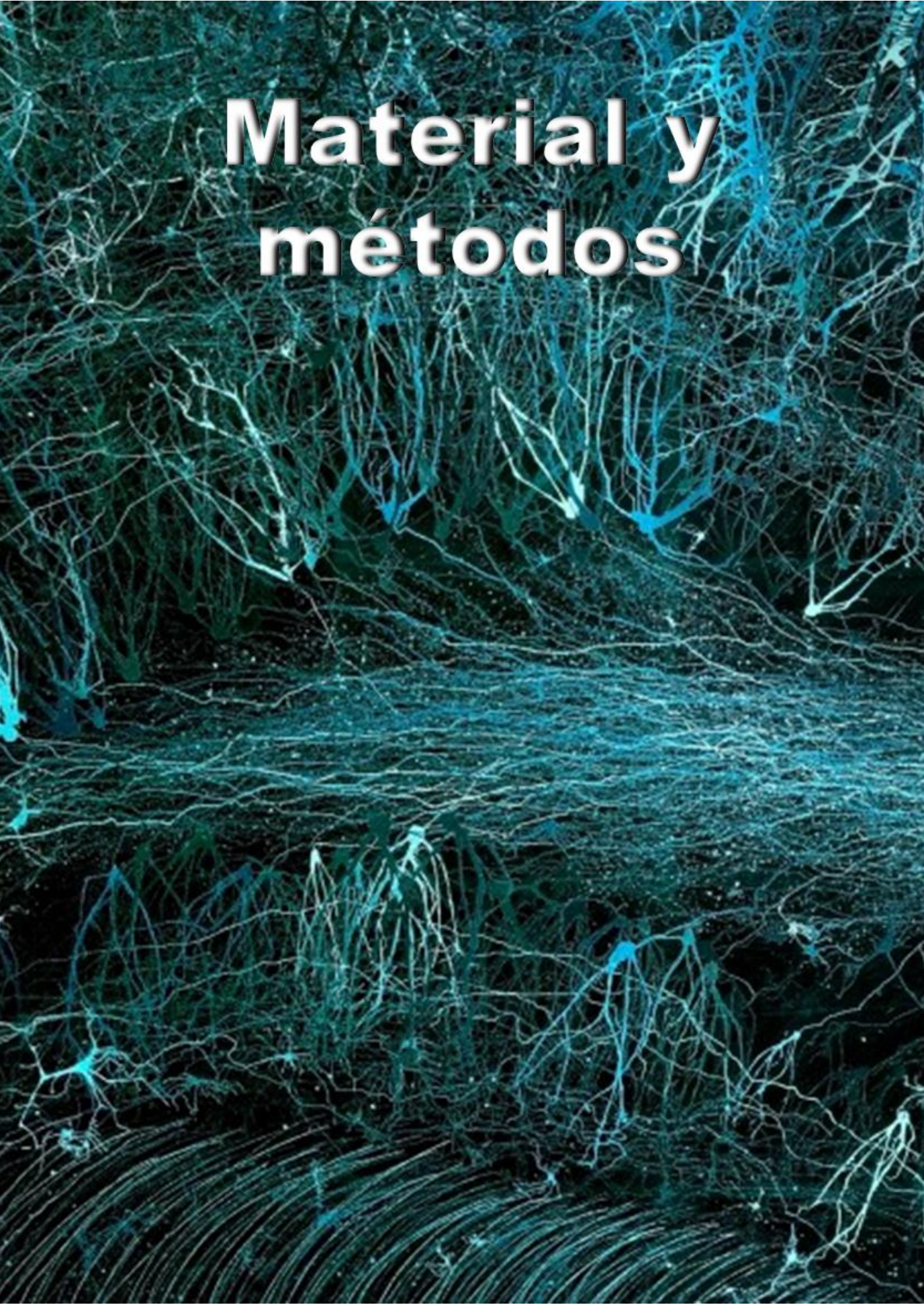
1. Enfermedad de Alzheimer

- 1.1. Estudiar la modulación espaciotemporal de los sistemas enzimáticos antioxidantes en cerebros de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 3xTg-AD, en estadios anteriores a la aparición de sus marcadores neuropatológicos.
- 1.2. Estudiar *in vitro* el efecto del CoQ10 exógeno sobre la muerte celular inducida por el péptido β A en células endoteliales humanas, diseccionando los mecanismos celulares involucrados.
- 1.3. Estudiar el efecto del CoQ10 exógeno sobre la patología amiloidea y la patología vascular *in vivo* en el modelo de ratón 3xTg-AD. Determinar patrones de EO en plasma y estudiar los niveles de β -amiloide en cerebro. Además, estudiar el grosor de la lámina basal en vasculatura cerebral, los niveles de hipoxia y los niveles de BACE-1.

2. Glioblastoma Multiforme

- 2.1. Estudiar el efecto del CoQ10 exógeno sobre el nivel de ROS, balance redox y respuesta radioadaptativa en líneas celulares de GBM, *in vitro*.
- 2.2. Determinar el efecto del CoQ10 a la apoptosis, senescencia y autofagia inducida por TMZ *in vitro* e *in vivo*.
- 2.3. Determinar el efecto del CoQ10 sobre la motilidad celular, invasión y crecimiento, *in vitro* e *in vivo*, diseccionando los mecanismos moleculares y celulares implicados.
- 2.4. Analizar la contribución del CoQ10 en procesos de angiogénesis e inflamación asociados al GBM, *in vitro* e *in vivo*.

Material y métodos



El verdadero propósito del método científico es asegurarse de que la naturaleza no te ha engañado haciéndote creer que sabes algo que en realidad no sabes

Robert Pinsig

Índice de figuras de “Material y métodos”

Figura 1. Imágenes en contraste de fases de las diferentes líneas celulares

Figura 2. Irradiación de células U251

Figura 3. Ejemplos de núcleos apoptóticos

Figura 4. Experimento clonogénico con tinción de cristal violeta

Figura 5. Cámara de microquimiotaxis

Figura 6. Diseño de los grupos en función de la dieta y el tipo de animal

Figura 7. Diseño experimental

Figura 8. Modelo ortotópico

Figura 9. Serie blanca

Figura 10. Tinción de hematoxilina y eosina

Figura 11. Inmunohistoquímica de vimentina

Figura 12. Cálculo de la intensidad de señal

Figura 13. Análisis de células senescentes

Figura 14. Determinación del área abierta

Figura 15. Determinación del porcentaje de células

Figura 16. Determinación de morfología celular

Figura 17. Análisis densitométrico de *Western blot*

Figura 18. Análisis de la intensidad de señal nuclear y citoplasmática

Figura 19. Determinación del volumen e infiltración media

Figura 20. Análisis de colocalización

Índice de tablas de la “Material y métodos”

Tabla 1. Relación de anticuerpos utilizados tanto en técnicas *in vitro* como *in vivo*

Experimentación *in vitro*

Líneas celulares

Todas las líneas celulares se han mantenido a 37°, condiciones de esterilidad y una atmósfera con 5% de CO₂. Todos los procedimientos relacionados con el mantenimiento de los cultivos celulares están explicados en el Anexo I. Se han utilizado las siguientes líneas celulares (Figura 1):

-**HUVEC**: células endoteliales de cordón umbilical humano ([enlace](#)). Se cultivan en medio EGM-2 suplementado con *Bulletkit* (hEGF, VEGF, hFGF-B, IGF-1) ([Lonza](#)), 20% de suero fetal bovino (FBS) ([Sigma-Aldrich](#)) y 1% de antibiótico/antimicótico ([Sigma-Aldrich](#)) (*Resultados, capítulo 2 y 6*).

-**U251**: células humanas de glioblastoma multiforme ([enlace U251](#)). Se cultivan en medio DMEM ([Sigma-Aldrich](#)) suplementado con 10% FBS ([Sigma-Aldrich](#)) y 1% de antibiótico/antimicótico ([Sigma-Aldrich](#)) (*Resultados, capítulos del 4 al 7*).

-**THP-1**: monocitos humanos de sangre periférica ([enlace](#)). Se cultivan en medio RPMI-1640 ([Sigma-Aldrich](#)) suplementado con 10% FBS ([Sigma-Aldrich](#)) y 1% de antibiótico/antimicótico ([Sigma-Aldrich](#)) (*Resultados capítulo 6*).

Nombre	Tipo celular	Más información
HUVEC	Endotelial (cordón umbilical)	(Rhim, Tsai et al. 1998)
U251	Astrocítica (GBM)	(Ponten and Macintyre 1968)
Thp-1	Monocitos (periféricos)	(Tsuchiya, Yamabe et al. 1980)

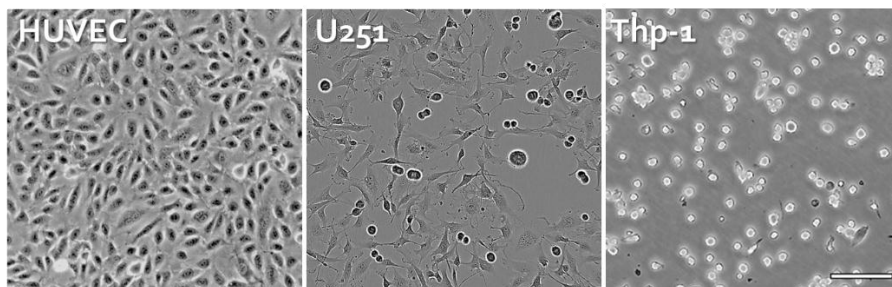


Figura 1. Imágenes en contraste de fases de las diferentes líneas celulares. Las células HUVEC fueron adquiridas en [Lonza](#). La línea U251 fue obtenida del laboratorio de Ricardo Sánchez (Laboratorio de Oncología Molecular, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Albacete, Universidad de Castilla la Mancha). Las células Thp-1 fueron adquiridas en [ATCC](#).

Tratamientos

A continuación se detallan los diferentes tratamientos utilizados en diferentes experimentos desarrollados en la Tesis Doctoral.

Tratamiento de células con CoQ10 y vehículo. Las diferentes líneas celulares, tanto endoteliales como de glioblastoma, se incubaron con CoQ10, como se indica a continuación (*Resultados, capítulos del 2 al 7*).

1. La solución madre de CoQ10 se prepara en etanol (EtOH) (vehículo) a una concentración de 1,14 mM y se almacena a -20° C.
2. Antes de añadir al cultivo, se atempera durante 10 minutos en oscuridad.
3. Incubar las distintas líneas celulares durante 12-48h con concentraciones crecientes de 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M y 10 μ M.

Tratamiento con tempol y α -tocoferol. Se han utilizado para comprobar el efecto protector de estos dos antioxidantes frente al daño inducido por el $A\beta_{25-35}$ en HUVECs (*Resultados, capítulo 2*).

1. La solución madre de tempol y α -tocoferol se prepara en etanol (ambas) a una concentración de 1M y 10mM respectivamente.
2. El tempol y el α -tocoferol se alicuotan a -20° a diferentes concentraciones.
3. Incubar las HUVECs a una concentración 1mM tempol y 100 μ M α -tocoferol durante 12h

Tratamiento con β -amiloide. Se ha utilizado para estudiar el daño en HUVECs (*Resultados, capítulo 2*).

1. La solución madre de $A\beta_{25-35}$ ([TOCRIS](#)) prepara a una concentración 500 μ M en agua y se almacena a -20°.
2. Incubar las HUVECs a una concentración de 5 μ M durante 3-24 horas.

Tratamiento con temozolomida. La temozolomida (TMZ) es el quimioterápico que ha mostrado mayor eficacia en el tratamiento del GBM. Se ha utilizado en la línea celular U251. (*Resultados, capítulos del 4 al 7*).

1. La solución madre de temozolomida ([Sigma-Aldrich](#)) se prepara en DMSO (vehículo) a una concentración de 100 mM y se almacena a 4°.
2. Incubar las células de GBM durante 24h con TMZ a 25-100 μ M, sin cambiar el medio de cultivo.

Irradiación de células. Se ha utilizado para estudiar la diferente sensibilidad de células U251 tratadas con vehículo y CoQ10 frente al daño inducido por la radiación (*Resultados, capítulo 4*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar células en placas de 24 pocillos*.

2. Pretratar las células con CoQ₁₀/vehículo
3. Irradiar las placas con un equipo de radioterapia superficial, en este caso un equipo de terapia Gulmay D 3150 (NCA), a dosis de 1, 2, 4, 8 y 16 Gy (Figura 2).
4. Devolver las células al incubador.
5. Tras 72 h, retirar el medio de cultivo y lavar con solución de Hanks.
6. Fijar y permeabilizar durante 2 min con metanol a -20°C.
7. Incubar con Hoescht (Sigma Aldrich) 1 µg/ml en PBS pH 7,4** durante 5 min en oscuridad.
8. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU (Nikon, Tokyo, Japón) con un objetivo de 2x y 20x (los objetivos incorporan corrección de foco) en el canal azul.
9. El análisis de imagen se realiza con ImageJ o FIJI. Cuantificar el número de células y la proporción de células apoptóticas (ver apartado “Cuantificación y obtención de resultados”).



Figura 2. Irradiación de células U251. Placa de 24 pocillos con células U251 sobre el aplicador del aparato de radioterapia superficial Gulmay D 3150.

*Información sobre volúmenes en el Anexo I.

Técnicas de biología celular

A continuación se detallan las diferentes técnicas de biología celular utilizadas en diferentes experimentos desarrollados en la Tesis Doctoral.

Determinación de viabilidad, apoptosis y necrosis inducida por A β ₂₅₋₃₅, *in vitro*.

El efecto sobre la viabilidad, apoptosis y necrosis inducida por el A β ₂₅₋₃₅ y el papel del CoQ₁₀ se ha ensayado en HUVECs (*Resultados, capítulo 2*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 96 pocillos*.
2. Pretratar las células con CoQ₁₀/vehículo y tratar con A β ₂₅₋₃₅/vehículo.
3. Retirar el medio de cultivo y lavar con solución de HANKS (Sigma-Aldrich) o PBS 1x*.

4. Incubar con 10 mg/mL de bromuro de etidio (EtBr) ([Sigma-Aldrich](#)) y 1mM de Calceina-AM ([Life-Technologies](#)) en medio de cultivo durante 15 minutos a 37°.
5. Lavar con solución de HANKS ([Sigma-Aldrich](#)) o PBS 1x.
6. Añadir medio de cultivo fresco y adquirir las imágenes en el microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 20x en los canales rojo y verde para EtBr y Calcein-AM, respectivamente. Determinar la viabilidad (en verde) y la necrosis (en rojo) por criterios cuantitativos. Expresar los resultados como porcentaje de células viables y necróticas por tipo de tratamiento.
7. Retirar el medio de cultivo y lavar con solución de HANKS ([Sigma-Aldrich](#)).
8. Fijar y permeabilizar las células con Metanol a -20° durante 5 minutos
9. Lavar con PBS 1x e incubar 5 min con Hoescht ([Sigma Aldrich](#)) 1mg/mL, en PBS 1x.
10. Lavar con PBS 1x.
11. Adquirir las imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 20x en el canal azul.
12. Determinar los núcleos apoptóticos mediante criterios cualitativos; vesiculación, morfología irregular e intensidad de marcaje elevada (Figura 3). Expresar los resultados como porcentaje de células apoptóticas frente al total de células.
13. Cuantificar resultados de intensidad de señal (ver apartado “Cuantificación y obtención de resultados”).

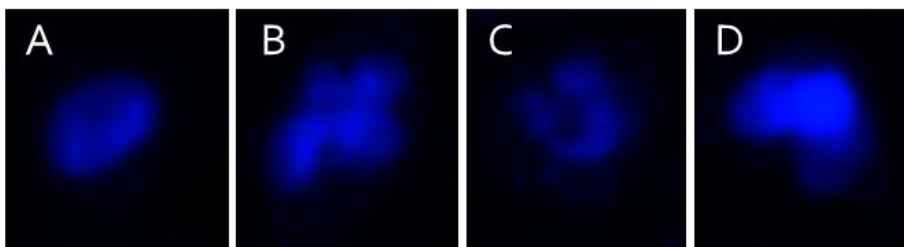


Figura 3. Ejemplos de núcleos apoptóticos. Según la morfología del núcleo se puede determinar si es viable (A) o si es apoptótico debido a su morfología irregular (B), vesiculación (C) o intensidad de marcaje elevado (D).

*Ver preparación de PBS e información sobre volúmenes en el Anexo I

Ensayo clonogénico. Se ha utilizado para determinar la viabilidad celular a largo plazo tras tratamientos con citotóxicos y citostáticos como la radiación (*Resultados, capítulo 4*) y temozolomida (*Resultados, capítulo 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar células a una densidad de 32 células por pocillo en placas de 24 pocillos*.
2. Pretratar las células con CoQ10/Vehículo.
3. Tras el tratamiento citotóxico o citostático, incubar las células durante 15 días, cambiando el medio de cultivo cada 3 días y observando su evolución en el microscopio invertido.
4. Fijar las células durante 2 min con metanol a -20° .
5. Lavar con PBS pH 7,4.
6. Teñir con cristal violeta al 0,01% ([Merck](#)) en H₂O durante 45 minutos.
7. Dar 3 lavados de 5 min en H₂O para eliminar el exceso de cristal violeta.
8. Contar el número de colonias (aquellas con más de 50 células) (Figura 4) por pocillo, según se describe previamente (Franken, Rodermond et al. 2006).

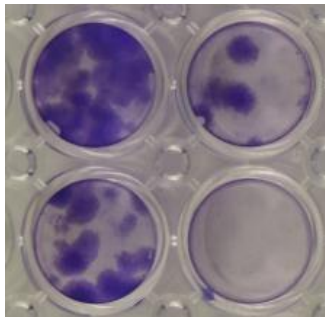


Figura 4. Experimento colonogénico con tinción de cristal violeta. Se observan diferentes pocillos (placas 24p) con la tinción de las diferentes colonias con cristal violeta. Con el microscopio a 20X se pueden diferenciar las colonias mayores de 50 células. Los resultados se muestran como número de colonias por tratamiento (por duplicado).

*Información sobre volúmenes y preparación de PBS en el Anexo I

Incorporación de péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ en células. Se ha estudiado en HUVECs tratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 2*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 96 pocillos*.
2. Pretratar las células con CoQ10/vehículo.
3. Montar la placa en el microscopio invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) sobre el objetivo 20x.
4. Añadir una concentración de 0,5 μ M de péptido β A₂₅₋₃₅ conjugado con el fluorocromo [HiLyte Fluor 488](#).
5. Adquirir imágenes con el filtro verde, cada 30 segundos durante 45 minutos.
6. Analizar las series de imágenes con ImageJ o Fiji. Realizar un análisis cuantitativo de intensidad de señal eliminando la señal de ruido de fondo (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

* Ver información sobre volúmenes en el Anexo I

Incorporación de péptido β -amiloide₂₅₋₃₅ en mitocondrias. Se ha estudiado en HUVECs tratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 2*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en portaobjetos gelatinizados*.
2. Pretratar las células con CoQ10/vehículo.
3. Añadir a las células Mitotracker ([Life-technologies](#)) $1\mu\text{M}$ e incubar con $0,5\mu\text{M}$ de péptido βA_{25-35} fluorescente conjugado con HiLyte Fluor 488 durante 5, 10, 20 y 40 minutos.
4. Adquirir las imágenes mediante microscopía confocal con el equipo [Zeiss LSM5](#) con un objetivo de $40\times$, utilizando los canales rojo (Mitotracker) y verde (βA_{25-35}).
5. Analizar imágenes con ImageJ o Fiji y determinar la intensidad de señal media de fluorescencia en toda la célula, el citosol y la mitocondria, eliminando la señal del ruido de fondo (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

* Ver información sobre gelatinización de portas en el Anexo I

Cuantificación del nivel total de Calcio libre citosólico y mitocondrial. Se ha estudiado la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} inducida por βA_{25-35} en HUVECs tratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 2*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 96 pocillos*.
2. Pretratar las células con CoQ10/vehículo y tratar con $\text{A}\beta_{25-35}$ /vehículo.
3. Incubar durante 30 min a 37° con $1\mu\text{M}$ de la sonda de calcio Fluo-4 ([Life Technologies](#)). Incubar con CoCl_2 1mM para eliminar la fluorescencia de la sonda citosólica.
4. Retirar el medio de cultivo, lavar con solución de HANKS o PBS y añadir medio de cultivo fresco.
5. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de $10\times$ en el canal verde.
6. Analizar las imágenes utilizando ImageJ o Fiji. Realizar un análisis cuantitativo de intensidad de señal, eliminando la señal del ruido de fondo. Mostrar los resultados como porcentaje de señal frente al control (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").
7. Alternativamente, la medida se puede realizar co-incubando con Mitotracker y Fluo-4 $1\mu\text{M}$, analizando específicamente la señal de Fluo-4 (verde) que colocaliza con la señal del Mitotracker (rojo).

*Información sobre volúmenes en el Anexo I.

Determinación de la senescencia celular. Se ha utilizado el kit *Detecta Gene Green CMFDG lacZ Gene Expression* ([Life technologies](#)) para determinar la senescencia en células U251 (*Resultados, capítulo 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 96 pocillos*. Una densidad inicial entre el 40% y el 70% de confluencia es importante para evitar la inhibición por contacto. Es recomendable añadir cloroquina a una concentración de 1mM, proporcionada en el kit a una concentración de 30 mM.
2. Pretratar y tratar según corresponda.
3. Preparar *Staining Medium*: 10mL de PBS* con FBS al 4% y 10mM de HEPES ([Sigma-Aldrich](#)) a pH 7,2
4. Preparar la solución 5-clorometilfluorescein-di-β-D-galactopirano-sido (CMFDG) (stock 10mM en el kit) a 400μM en una mezcla de H₂O_d y "Staining Medium" 1:1 (stock 10 mM en el kit). La solución debe calentarse 10 minutos a 37°. Utilizar 50 μL por pocillo.
5. Lavar las células con PBS 1x o solución de HANKS ([Sigma-Aldrich](#)).
6. Añadir la solución con CMFDG e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Detener la reacción del CMFDG con "Staining Medium". Se puede añadir yoduro de propidio a una concentración de 1,5 μM para discriminar las células senescentes de las necróticas (stock 150 μM en el kit).
8. Incubar a 37° 2 horas.
9. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 20x en el canal verde. Adquirir imágenes del mismo campo en contraste de fases.
10. Analizar las imágenes con ImageJ o Fiji para determinar el porcentaje de células senescentes respecto a células totales (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Ver preparación de PBS e información sobre volúmenes en el Anexo I.

Determinación de la longitud de los telómeros. Se utilizó el kit "[Telomere PNA Kit/FITC](#)" de la casa comercial Dako para estudiar la longitud de los telómeros en U251 tras el tratamiento con vehículo o CoQ10 (*Resultados, capítulo 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos*.
2. Pretratar las células con CoQ10/ vehículo y tratar con TMZ/ vehículo.
3. Colocar los viales 3 y 4 del kit a temperatura ambiente hasta el día siguiente.

4. Precalentar un termobloque a 82°.
5. Lavar las células con PBS 1x*.
6. Tomar de cada muestra 2×10^6 células para el test y otras 2×10^6 de control.
7. Añadir PBS pH 7,4 y hacer cuatro alícuotas de 1,5 ml.
8. Centrifugar 5 minutos a 500g.
9. Eliminar el sobrenadante y añadir 300µL de solución de hibridación a dos tubos control y 300µL de Telomere PNA Probe/FITC en solución de hibridación a otros dos.
10. Mezclar con vórtex hasta que pelleta pella desaparezca por completo
11. Calentar los 4 tubos a 82° C durante 10min.
12. Mezclar con vórtex e incubar toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad.
13. Lavar con 1 ml de *washing solution*.
14. Agitar en el vortex y calentar en un termobloque a 40° durante 10 min.
15. Agitar de nuevo en el vortex y centrifugar durante 5 min a 500g.
16. Eliminar sobrenadante y repetir los puntos 11, 12, 13.
17. Añadir Hoescht ([Sigma Aldrich](#)) a una concentración de 1 µg/ml en PBS:Glicerol (50:50) y colocar sobre un porta objetos, colocando encima un cubreobjetos.
18. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 20x en el canal verde.
19. Analizar la intensidad de señal de cada célula restándole el ruido de fondo con ImageJ o Fiji (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Ver preparación de PBS e información sobre volúmenes en el Anexo I

Técnicas para el estudio del estrés oxidativo

A lo largo de este apartado se explicarán con detalle las diferentes técnicas relacionadas con el estudio del estrés oxidativo utilizadas a lo largo de la Tesis Doctoral.

Cuantificación de los niveles de anión superóxido mitocondrial y peróxido de hidrógeno. Los niveles de estas ROS se han cuantificado tanto en HUVECs (*Resultados, capítulo 2*), como en células de GBM (*Resultados, capítulos 4 y 5*) utilizando sondas fluorescentes. La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 96 pocillos*.

2. Con las HUVECs Pretratar las células con CoQ10/vehículo y tratar con $A\beta_{25-35}$ /vehículo. Con células de GBM tratar con CoQ10/vehículo 24 o 48h, o pretratar con CoQ10/vehículo 24h y tratar con TMZ/vehículo.
3. Retirar el medio de cultivo y lavar con solución de HANKS o PBS 1x*.
4. Incubar durante 30 min a 37° con 1 μ M de cada sonda, MitoSOX ([Life Technologies](#)) y H₂DCFDA ([Life Technologies](#)), para anión superóxido y peróxido de hidrógeno, respectivamente.
5. Retirar el medio, lavar con HANKS o PBS 1x y añadir medio de cultivo fresco.
6. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 10x en los canales rojo y verde para MitoSOX y H₂DCFDA, respectivamente.
7. Realizar análisis cuantitativo de la intensidad de señal para cada sonda utilizando el ImageJ o Fiji (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

* Ver preparación de PBS e información sobre volúmenes en el Anexo I

Cuantificación de la actividad catalasa. Se ha determinado la actividad de esta enzima antioxidante en células U251 tratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 4*), siguiendo el método puesto a punto previamente (Cordoba-Pedregosa Mdel, Villalba et al. 2006). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos*.
2. Tratar las células con CoQ10/vehículo.
3. Extraer las proteínas con la solución de lisis celular*.
4. Preparar la solución de reacción (PB 50mM, pH 7,0 y H₂O₂ 10mM).
5. Incubar las proteínas (90 μ g) con 1mL de solución de reacción durante 2,5 min a 30°.
6. Cuantificar la absorbancia a 240nm.
7. Utilizar un coeficiente de extinción de 43,6 mM⁻¹cm⁻¹.
8. Los resultados se muestran como el cambio total en la actividad catalasa frente a los controles (células tratadas con vehículo).

*Información sobre volúmenes y buffer de lisis celular en el Anexo I.

Ensayo de sensibilidad a H₂O₂ exógeno. Se ha utilizado para determinar la respuesta de células U251 tratadas con vehículo y CoQ10 a dosis crecientes del agente prooxidante H₂O₂ (*Resultados, capítulo 4*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 96 pocillos*.

2. Tratar las células con Vehículo/CoQ10.
3. Incubar las células con concentraciones crecientes de H₂O₂ (12.5, 25, 50, 75, 100 μM).
4. Tras 8 horas, fijar y permeabilizar las células durante 2 min con metanol a -20°.
5. Incubar con Hoescht ([Sigma Aldrich](#)) a una concentración de 1 μg/ml en PBS pH 7,4* durante 5 minutos (en oscuridad).
6. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 2x en el canal azul.
7. El análisis de imagen se realiza con ImageJ o Fiji. Cuantificar el número de células por campo (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Información sobre volúmenes y preparación de PBS en el Anexo I

Cuantificación de nitrito por el método de Griess. La determinación de NO se ha realizado en HUVECs (*Resultados, capítulo 2*) y en U251. La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos*.
2. Con las HUVECs Pretratar las células con CoQ10/vehículo y tratar con Aβ₂₅₋₃₅/vehículo. Con células de GBM tratar con CoQ10/vehículo Utilizar el medio de cultivo de las células tratadas y control.
3. Retirar el medio de cultivo de las células tratadas con Aβ, vehículo y/o CoQ10, según corresponda.
4. Elaborar una curva de nitrito sódico entre 1,56 y 100 μM. Se parte de un stock 1M en medio de cultivo (0,69 g en 1mL) y se realizan diluciones seriadas 1:2.
5. En una placa de 96 pocillos añadir 50 μL de cada punto de la curva y de las muestras problema (hacer por duplicado).
6. Añadir el mismo volumen de reactivo de Griess ([Sigma-Aldrich](#)).
7. Incubar 15 minutos con el reactivo Griess en oscuridad a temperatura ambiente.
8. Medir absorbancia a 490 nm en un lector de placas (iMark Absorbance Reader, [Bio Rad](#)).
9. Referir los resultados de cada muestra a la curva patrón. Representar los resultados como porcentaje NO por muestra con respecto al control.

*Ver preparación de PBS e información sobre volúmenes en el Anexo I.

Técnicas para el estudio de la motilidad e invasión celular.

A continuación se detallan las diferentes técnicas para el estudio de la motilidad e invasión celular utilizadas a lo largo de la Tesis Doctoral.

Migración; método de reparación de la herida. Mediante este ensayo se ha cuantificado la capacidad de migración de células HUVECs (*Resultados, Capítulo 2*) y células de GBM (*Resultados, capítulo 5*) en respuesta a diversos tratamientos. La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 24 pocillos*.
2. Con las HUVECs Pretratar las células con CoQ10/vehículo y tratar con AB_{25-35} /vehículo. Con células de GBM tratar con CoQ10/vehículo 24 o 48h.
3. Hacer una cruz con una punta de pipeta de 1 ml en la superficie de cada pocillo.
4. Retirar el medio y añadir medio nuevo.
5. Adquirir imágenes en contraste de fases a tiempo cero (To) con el microscopio invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) usando un objetivo de 2x.
6. Mantener entre 12 y 24 h (en función de la motilidad de cada línea celular) en medio sin FBS.
7. Adquirir imágenes a tiempo final (Tf). Analizar con ImageJ o Fiji (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").
8. Fijar y permeabilizar las células con metanol a -20º durante 2 minutos para realizar una ICC frente a actina.

*Información sobre volúmenes en el Anexo I

Invasión; método de Boyden utilizando una cámara de microquimiotaxis modificada. Se ha utilizado este método para estudiar la capacidad invasiva de células de GBM tratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 5*) y la capacidad invasiva de THP-1 (*Resultados, capítulo 6*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos*.
2. Tratar las células con CoQ10/vehículo.
3. Tratar la membrana de policarbonato (poro 5 μ M) durante 30 minutos a 37º con Matrigel reducido en factores de crecimiento (GFR) ([Life Technologies](#)) diluido a 1:50 en DMEM sin FBS. Es importante no añadir FBS porque actúa como quimioatrayente y puede dificultar la invasión celular.

- Despegar las células con solución de tripsina-EDTA e inactivar posteriormente 1% BSA en DMEM libre de FBS. Cuantificar el número de células con la cámara de Neubauer ([Marienfeld](#)).
- Cargar 25 μl volumen en los pocillos de la parte inferior de la cámara de Boyden ([Neuro Probe](#)) con el quimioatrayente (FBS) y los controles negativos con BSA (Figura 5). El volumen puede incrementarse hasta 27-28 μl para que el menisco quede cóncavo.

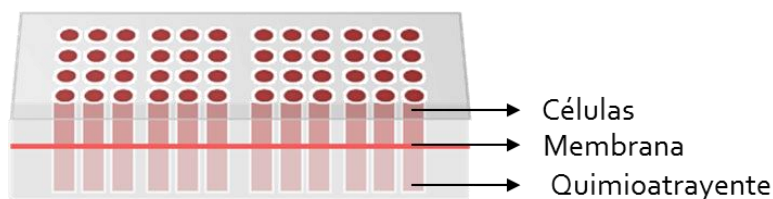


Figura 5. Cámara de microquimiotaxis. Esquema que representa una cámara de microquimiotaxis de 48 pocillos basada en la original de *Boyden*. Entre los compartimentos superior e inferior se coloca la membrana de policarbonato con poros de 5 μm para experimentos de quimioatracción. Para invasión, la membrana de policarbonato se recubre con Matrigel GFR.

- Colocar la membrana con cuidado para que no queden burbujas. Si el volumen de la cámara fuera demasiado bajo quedará burbuja y no habrá gradiente de quimioatracción.
- Colocar la parte de arriba de la cámara y añadir 50 μl por pocillo conteniendo 2×10^6 cel/ml. Esta densidad inicial puede variar dependiendo del tipo celular.
- Incubar durante 6h a 37° C y 5% CO_2 (el tiempo varía en función del tipo celular).
- Desmontar la cámara y colocar la membrana sobre un vidrio (cristal de electroforesis) siguiendo la misma orientación que en la cámara de quimiotaxis.
- Fijar y permeabilizar con metanol a -20° durante 2 minutos
- Lavar la membrana con PBS pH 7,4*.
- Eliminar con un *scraper* las células que no han migrado, situadas en la cara superior de la membrana.
- Montar la membrana sobre un portaobjetos y añadir Hoescht ([Sigma Aldrich](#)) a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ en PBS:Glicerol (50:50). Colocar un cubreobjetos y sellar con laca de uñas.
- Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 2x en el canal azul. Analizar el número total de células en la cara inferior de la membrana con ImageJ o Fiji (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Información sobre volúmenes y preparación de PBS en el Anexo I

Ensayo de degradación de sustrato. Mediante este ensayo, se analizó la capacidad de las células U251 tratadas con vehículo y CoQ10 de degradar el sustrato (*Resultados, capítulo 5*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Esterilizar cubreobjetos en etanol al 70% durante 30 min a temperatura ambiente y dejarlos 10 min secando.
2. Colocar los cubreobjetos en pocillos de placas 6p.
3. Preparar una solución de gelatina conjugada con Oregon Green ([Life Technologies](#)) a una concentración de 1 mg/ml en medio sin suero o PBS* pH 7,4.
4. Añadir 20 µl de gelatina a los cubreobjetos.
5. Añadir una gota de glutaraldehído al 0,5% en PBS 1x helado e incubar durante 15 min a 4°.
6. Colocar los cubreobjetos en una nueva placa.
7. Lavar 3x5 min en PBS 1x.
8. Añadir medio completo durante 1h.
9. Incubar 4x10⁵ células/pocillo durante 24h.
10. Retirar el medio de cultivo y lavar 1x5 min con PBS 1x.
11. Fijar las células con PFA* 10 minutos a temperatura ambiente. Es importante no fijar con metanol, porque altera el sitio de unión de la faloidina (ActinRed) y no habrá marcaje.
12. Permeabilizar con Tritón X-100 0,1% en PBS 1x durante 10 min a temperatura ambiente.
13. Teñir con la ActinRed ([Life Technologies](#)), añadiendo dos gotas a cada cubre.
14. Incubar 20 min en oscuridad a temperatura ambiente.
15. Lavar con PBS 1x.
16. Añadir Hoescht ([Sigma Aldrich](#)) 1 µg/ml en PBS:Glicerol (50:50) y montar sobre un porta objetos.
17. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 20x en los canales azul (Hoescht), verde (gelatina) y rojo (actina). Analizar con ImageJ o FIJI cuantificando el área degradada. Los resultados se presentan como área degradada normalizada respecto al número total de células por campo (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Información sobre la preparación de PBS y PFA en Anexo I.

Actividad MMP: colagenasa/gelatinasa. Se utilizó el kit "[EnzCheck Gelatinase/colagenase Assay Kit](#)" de la casa comercial "Molecular Probes", para el estudio de la actividad colagenasa/gelatinasa en células U251 tratadas con vehículo o CoQ10 (*Resultados, capítulo 5*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos*.
2. Tratar las células con CoQ10/vehículo.
3. Preparar la gelatina DQ añadiendo 1mL de H₂O_d al vial. Mantener el *stock* en oscuridad a 4°. Preparar la solución de reacción (1:10 en H₂O_d). Preparar la colagenasa de *Clostridium* a 1000 U/mL.
4. Lavar con HANKS, raspar las células en 200µL de PBS 1x* y pasarlas a un pocillo.
5. Añadir 80 µL de solución de reacción por pocillo.
6. Añadir 20 µL de DQ gelatina por pocillo.
7. Añadir 100 µL de enzima.
8. Incubar 16 horas a 37° en oscuridad.
9. Cuantificar mediante fluorimetría en un lector de microplacas o espectrofluorímetro, excitando a 495 nm y midiendo la emisión a 515 nm.
10. Los resultados se muestran como el cociente de la actividad colagenasa/gelatinasa frente a las células control (tratadas con vehículo).

*Información sobre volúmenes y preparación de PBS en el Anexo I

Determinación del tamaño y morfología celular. La morfología de las células tumorales puede variar en función de su estado metabólico y se relaciona con su motilidad. Hemos estudiado el tamaño y la morfología celular de células de GBM tratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 5*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar células en placas de 24 pocillos*.
2. Tratar las células con CoQ10/vehículo.
3. Adquirir imágenes en contraste de fases. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) usando un objetivo de 20x.
4. Analizar el área y el ratio del diámetro máximo (ancho y largo) de más de 100 células con ImageJ o FiJI (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Información sobre volúmenes en el Anexo I

Técnicas para determinar niveles de proteínas, lípidos y metabolitos

A continuación se detallan las diferentes técnicas para la detección de proteínas, lípidos y metabolitos utilizados a lo largo de la Tesis Doctoral.

Western blot. Esta técnica se ha utilizado con extractos de cerebros de ratón (*Resultados, capítulo 1*), con extractos de proteínas de HUVECs (*Resultados, capítulo 2*) y con extractos de proteínas de U251 (*Resultados, capítulos de 4 al 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

- Preparación de geles y electroforesis
 1. Preparar el montaje en el kit Miniprotean III ([Bio-Rad](#)).
 2. Utilizar cristales para anchura de 1,5 mm. Limpiar previamente con etanol de 70°.
 3. Elegir concentración del gel separador:
 - a. 7% (50-500 kDa).
 - b. 10 % (20-300 kDa).
 - c. 12 % (10-200 kDa).
 - d. 15 % (3-100 kDa).
 4. Preparar el gel separador*.
 5. Cargar el gel separador en el kit de montaje hasta 4/5 del volumen total.
 6. Cubrir con isopropanol (1mL/gel).
 7. Dejar polimerizar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 8. Retirar el isopropanol, añadir el gel empaquetador * y colocar el peine correspondiente.
 9. Dejar polimerizar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
 10. Quitar el peine y enjuagar los pocillos con tampón de electroforesis.
 11. Colocar los geles en su soporte e introducir en la cubeta.
 12. Añadir la solución de electroforesis 1X* hasta cubrir el electrodo exterior y la marca según el número de geles utilizados.
 13. Cargar las muestras.
 14. Conectar la cubeta a la fuente de alimentación respetando la polaridad. Ajustar un voltaje constante de 90 V hasta que el frente pase el gel empaquetador (15 min aprox.), después aumentar el voltaje hasta 140 a 180 V, dejarlo así hasta que el frente se aproxime al final del gel (90 min aprox.). Para proteínas más pequeñas es recomendable un voltaje constante de 100 V durante 2 horas.
- Transferencia
 15. Incubar el gel, la membrana y el papel de transferencia (Whatmann o [Bio-Rad](#)) en solución de transferencia* 20 minutos. Si la membrana es de PVDF activar previamente durante 1 min en metanol.
 16. Preparar el sándwich (de abajo a arriba): papel de transferencia–membrana de nitrocelulosa ([Sigma-Aldrich](#)) o PVDF ([Bio-Rad](#)) – gel – papel de transferencia. Colocarlo en la unidad de transferencia semi-seca ([Bio-Rad](#)). Pasar el rodillo por cada capa para eliminar burbujas. Añadir solución de transferencia.

17. Ajustar a intensidad constante de 0,25 mA/gel durante 50 minutos.
- Tinción, bloqueo e hibridación
 18. Teñir la membrana con rojo Ponceau ([Santa Cruz Biotech.](#)) (0,1% en H₂O_d con 5% ácido acético) en agitación durante 2 min a temperatura ambiente. Con membranas PVDF, pasar directamente al punto 22.
 19. Eliminar el exceso de Ponceau incubando con ácido acético al 1% en H₂O_d. Se deja desteñir hasta que se diferencian las bandas rojas.
 20. Escanear la membrana.
 21. Recortar la membrana delimitando las bandas (con un cúter o bisturí).
 22. Bloquear la membrana en TTBSL al 5% en agitación a temperatura ambiente con 2 lavados de 30 min o prolongar hasta que desaparezcan los restos de Ponceau.
 23. Incubar con el anticuerpo primario en TTBSL al 0.5%. Durante 1 hora a temperatura ambiente o 12h a 4° en agitación suave.
 24. Dar 3 lavados de 5 min en TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario unido de forma inespecífica.
 25. Incubar con el anticuerpo secundario en TTBSL al 0,5% 2 horas a temperatura ambiente en agitación.
 26. Dar 3 lavados de 5 min en TTBS para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.
- Revelado
 27. Preparar ECL Plus ([Bio-Rad](#)) 1:1.
 28. Sobre un plástico transparente añadir ECL Plus a las membranas de forma que las cubra e incubar 5 minutos.
 29. Eliminar el exceso de ECL Plus con papel secante y colocar sobre un plástico transparente.
 30. Colocar el plástico con las membranas y un marcador autofluorescente en el *Kodak BioMax Cassette* ([Kodak](#)).
 31. Con luz de seguridad roja, colocar la película autorradiográfica ([Thermo Fisher](#)) encima del plástico de las membranas y cerrar el casete. Quitar la película y revelar durante 30 segundos o hasta que se vean bandas sobre el ruido de fondo.
 32. Lavar la película e inmediatamente fijar ([Sigma-Aldrich](#)) durante un mínimo de 30 segundos.
 33. Lavar con H₂O_d, secar y escanear.
 34. Analizar las muestras cuantitativamente por densitometría con ImageJ o FIJI (ver apartado “Cuantificación y obtención de resultados”).

*Información sobre preparación del gel acumulador y separador y de las soluciones de transferencia y de electroforesis, Transfer Buffer, TBS, TTBS, TTBSL y protocolo de extracción de proteínas en Anexo I.

Inmunocitoquímica. Se ha utilizado para analizar de forma cualitativa y cuantitativa los niveles de varias proteínas y su distribución subcelular en HUVECs (*Resultados, capítulo 2*) y en células de GBM (*Resultados, capítulos del 5 al 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar células en placas de 96 pocillos*.
2. Con las HUVECs Pretratar las células con CoQ10/vehículo y tratar con A β ₂₅₋₃₅/vehículo. Con células de GBM tratar con CoQ10/vehículo.
3. Fijar y permeabilizar con metanol a -20° durante 2 minutos. También se pueden fijar en PFA 4%* durante 5 min a temperatura ambiente.
4. Dar 3 lavados de 5 min con PBS pH 7,4*.
5. Bloquear con albúmina sérica bovina (BSA) 3%, Tritón X-100 0,1% en PBS pH 7,4*.
6. Incubar con el/los anticuerpos primarios (ver tabla anticuerpos) en BSA 0,5% y TX-100 0,1%. Incubación a 4° en agitación durante 12 o 2 horas a temperatura ambiente.
7. Dar 3 lavados de 5 min con PBS pH 7,4*.
8. Incubar con anticuerpo secundario (ver tabla anticuerpos) en BSA 0,5% y TX-100 0,1%. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación y oscuridad.
9. Dar 3 lavados de 5 minutos con PBS pH 7,4*.
10. Incubar con Hoescht ([Sigma Aldrich](#)) 1 μ g/ml en PBS pH 7,4* Durante 5 minutos en oscuridad.
11. Lavar durante 5 min en PBS pH 7,4*.
12. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 2; 10; 20; 60x (los objetivos incorporan corrección de foco) en los canales azul, verde o rojo.
13. Analizar con ImageJ o Fiji la intensidad de señal o niveles de colocación (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Información sobre volúmenes y preparación de PBS y PFA en el Anexo I

Cuantificación de factores inflamatorios y citoquinas. Array Quantibody. Se utilizó el array "Quantibody" de la casa comercial [Ray Biotech](#), para determinar los niveles de factores inflamatorios y citoquinas solubles (relacionados con inflamación y angiogénesis) en células U251 tratadas con vehículo o CoQ10 (*Resultados, capítulo 6*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos*.
2. Tratar las células con CoQ10/vehículo.

3. Retirar el medio de cultivo y utilizar para el ensayo o congelar a -20° .
- Secar el chip:
 1. Sacar el chip de la caja y dejar equilibrar a temperatura ambiente dentro de la bolsa sellada durante 20-30 min.
 2. Quitar porta de la bolsa de plástico; retirar la película de la cubierta y dejar secar al aire a temperatura ambiente durante otras 2 horas.
- Preparar diluciones estándares:
 1. Reconstituir el estándar (liofilizado) con $500\mu\text{L}$ de diluyente de muestra (dar un spin antes de añadir). Mezclar bien para que se diluya (Rotular Std 1).
 2. Rotular 6 tubos más "Std del 2 al 7". Añadir $200\mu\text{L}$ de diluyente de muestra a cada uno.
 3. Pipetear $100\mu\text{L}$ del Std1 al Std2 y así sucesivamente.
 4. Hacer un control que actúe como control negativo (medio de cultivo +FBS).
- Bloquear e incubar:
 1. Añadir $100\mu\text{L}$ de diluyente de muestras a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
 2. Decantar y añadir $100\mu\text{L}$ de estándar o de muestra a cada pocillo e incubar toda la noche a 4° .
 3. Decantar y dar 5 lavados de 5 minutos con $150\mu\text{L}$ de solución de lavado I en agitación y a temperatura ambiente.
 4. Decantar y lavar 2×5 min en solución de lavado II en agitación y a temperatura ambiente.
 5. Reconstituir el anticuerpo de detección con $1,4\text{ mL}$ de diluyente de muestras y dar un spin.
 6. Añadir $80\mu\text{L}$ del coctel de anticuerpos e incubar a temperatura ambiente 2 horas.
 7. Decantar y dar 5 lavados de 5 min en la solución de lavado I y 2 lavados de 5 min en la solución de lavado II en agitación y a temperatura ambiente.
 8. Diluir el Cy3 en $1,4\text{ mL}$ de diluyente de muestras y dar un spin.
 9. Añadir $80\mu\text{L}$ por pocillo e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
 10. Decantar las muestras de cada pocillo y dar 5 lavados de 5 min en la solución de lavado I. Eliminar todos los restos de solución de lavado.
- Detección de fluorescencia:
 1. Desmontar el dispositivo con cuidado de no tocar el porta.
 11. Colocarlo en el lavador de portas, lavar con 30mL de solución de lavado) y dejar agitando 15 min a temperatura ambiente. Decantar la solución de lavado I, añadir 30mL de solución de lavado II y agitar 5 min a temperatura ambiente.

12. Eliminar todas las gotas con pipetas (y cuidado) o centrifugando a 1000 rpm durante tres min en el lavador de portas.
13. Visualizar con el lector de array ([Genepix](#)). Analizar y representar los niveles de cada molécula como pg/mL.

*Información sobre volúmenes en el Anexo I.

Determinación de metabolitos por resonancia magnética nuclear. La determinación de metabolitos se llevó a cabo en el laboratorio de M^a Victoria Gómez Almagro, del departamento de Química Orgánica de la Facultad de Químicas de Ciudad Real. Esta técnica se ha utilizado para determinar el efecto del A β sobre el perfil metabólico de las células HUVEC pretratadas con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 2*) y en células U251 (*Resultados, capítulos 4 y 6*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Cultivar las células en una placa de 150 cm²*.
2. Con las HUVECs Pretratar las células con CoQ10/vehículo y tratar con A β ₂₅₋₃₅/vehículo. Con células de GBM tratar con CoQ10/vehículo 24 o 48h.
3. Levantar las células y lavar 2 veces con PBS 1x.
4. Homogenizar por sonicación en agua deuterada (99,98% átomos deuterio).
5. Liofilizar los extractos celulares y resuspenderlos en agua deuterada.
6. Adquirir los espectros de resonancia magnética nuclear ([Varian VNMRs-400](#)).
7. Procesar los espectros con [Mestrenova](#) (Mestrelab Research) e identificar los picos con [Chenomix Profiler](#) (Chenomix Inc). Analizar los grupos de metabolitos corregulados y el perfil de metabolitos con el [MEV 4.9](#). Analizar las rutas con [MetaboAnalyst 2.0](#).

*Información sobre volúmenes y preparación de PBS en el Anexo I.

Experimentos *in vivo*

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Comunidad Económica Europea sobre el bienestar de los animales de experimentación (directiva 86/96 o 86/69/ECC) y del Comité Ético de Experimentación animal de la Universidad de Castilla la Mancha (PI-2006/15).

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado varios modelos previamente establecidos y validados, que mimetizan etapas clave de las patologías de Alzheimer y glioblastoma multiforme en humanos. En concreto, como modelo de Alzheimer se han utilizado ratones triples transgénicos 3xTg-AD, descrito en el apartado "Modelos animales de la enfermedad de Alzheimer" en la introducción. Respecto al GBM, se ha desarrollado un modelo ortotópico en el que se inyectaron células U251 en el cuerpo estriado de ratones macho nu/nu, para estudiar el crecimiento tumoral y su capacidad infiltrativa. Por otra parte, se ha utilizado un modelo de xenoinplante subcutáneo, en el que las células se inyectaron en el flanco de ratones nu/nu. Este modelo se utilizó para evaluar, de forma continua, el efecto de las terapias sobre el crecimiento tumoral y posteriormente correlacionar la respuesta con el grado de neovascularización e inflamación.

Modelos animales para el estudio de la enfermedad de Alzheimer

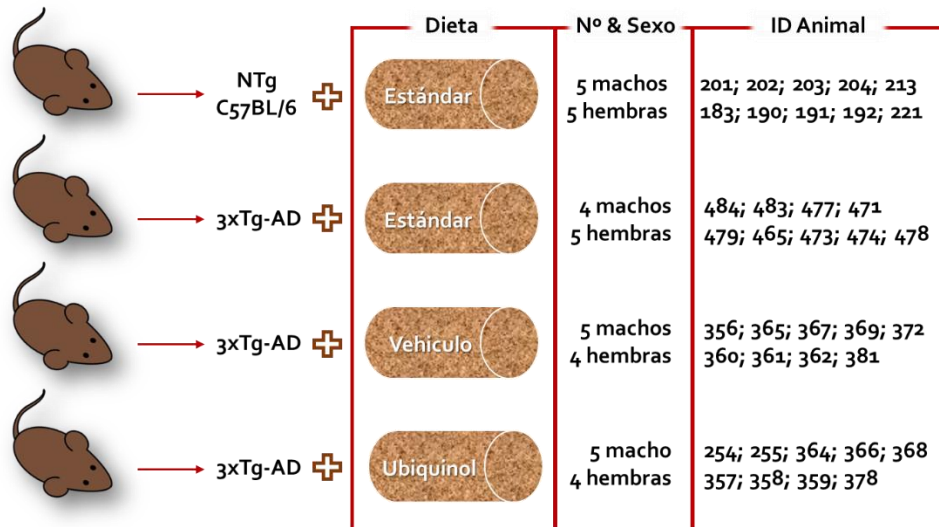
A lo largo de este apartado se explicará con detalle el modelo 3xTg-AD utilizado para estudiar la enfermedad de Alzheimer en la Tesis Doctoral.

Modelo 3xTg-AD. El modelo 3xTg-AD (Oddo, Caccamo et al. 2003) reproduce fielmente las alteraciones fisiopatológicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Presenta un patrón temporal similar a la enfermedad en humanos y además, muestra déficits cognitivos. Estos ratones sobreexpresan los genes humanos APP_{SWE}, presenilina 1 y Tau_{P301L} (Oddo, Caccamo et al. 2003).

Los ratones utilizados en esta Tesis Doctoral proceden de la colonia española de ratones homocigotos 3xTg-AD y NTg del laboratorio de la Dra. Giménez-Llort del Departamento de Psiquiatría y Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Dicho grupo de investigación ha sido responsable del genotipado y de los estudios de comportamiento realizados en paralelo. El modelo se ha utilizado para la caracterización de las alteraciones de la maquinaria antioxidante en etapas iniciales de la enfermedad (2, 4 y 6 meses de edad) y para el estudio del efecto del CoQ10 sobre el desarrollo de la patología en ratones de 12 meses (*Resultados, capítulos 1 y 3*).

Diseño experimental. Se han elaborado cuatro grupos diferentes de ratones. Un grupo de ratones no transgénicos, alimentados con dieta estándar, y 3 grupos de

ratones 3xTg-AD, alimentados con dieta estándar, vehículo y ubiquinol, respectivamente (Figura 6).



Mat. & met.

Figura 6. Diseño de los grupos en función de la dieta y el tipo de animal. Un grupo control de animales no transgénicos con dieta estándar y tres grupos de animales 3xTg-AD con dieta estándar, vehículo y ubiquinol respectivamente.

Los ratones fueron alimentados desde la edad de 2,5 meses en base a resultados previos obtenidos por el grupo (Torres-Lista, Parrado-Fernandez et al. 2014) (*Resultados, capítulo 3*), hasta los 12 meses, edad a la que se sacrificaron (Figura 7).

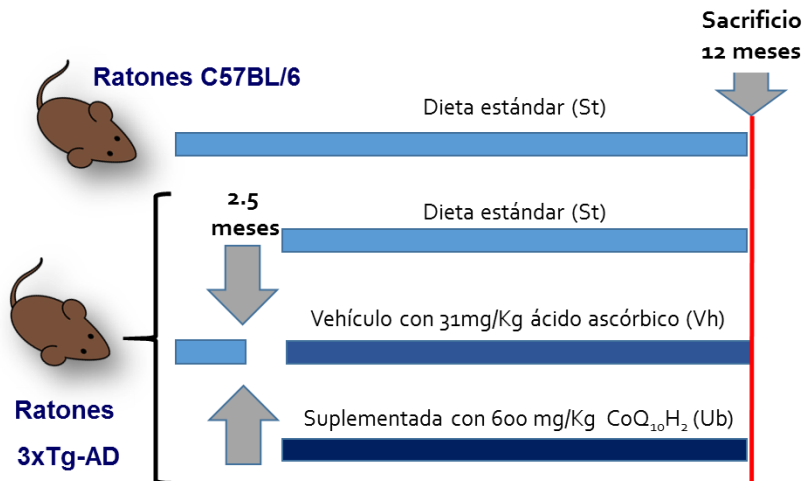


Figura 7. Diseño experimental. Las diferentes dietas se empezaron a dar a partir de los 2,5 meses hasta la edad de sacrificio a los 12 meses. Información adicional sobre el sacrificio de los animales y procesamiento de las muestras en el Anexo 1.4

Preparación de la dieta. Las diferentes dietas utilizadas se han preparado en el laboratorio mezclando el vehículo y ubiquinol con pienso molido (*Resultados, capítulo 3*), como se indica a continuación.

1. Dieta vehículo.
 - a. Pesar 240 mg de *Kaneka QH P30 powder*. Tarar y añadir 200 gr de pienso molido ([Harlan](#)).
 - b. Añadir 200 ml de agua destilada.
 - c. Amasar a mano, hacer cilindros y cortar al tamaño de los pellets comerciales.
 - d. Secar en estufa a 37°C durante 24h.

2. Dieta Ubiquinol.
 - a. Pesar 360 mg de Ubiquinol disuelto en *Kaneka QH P30 powder*. Tarar y sobre esto añadir 200 gr de pienso molido.
 - b. Añadir 200 ml de agua destilada.
 - c. Amasar a mano, hacer cilindros y cortar al tamaño de los pellets comerciales.
 - d. Secar en estufa a 37°C durante 24h.

La concentración de ubiquinol en los pellets se chequeó con frecuencia. La concentración teórica del ubiquinol en dieta fue de 0,69mM y la concentración real que encontramos fue de 0,72± 0.25 mM. La cantidad de ubiquinol representó alrededor del 50% del CoQ presente en los pellets.

Composición de vehículo (*Kaneka QH P30 powder*). El ubiquinol utilizado para el estudio aparece mezclado con un excipiente que garantiza su estado reducido y su estabilidad. La composición de dicho excipiente es:

- Goma arábica
- Dextrina
- Ácido ascórbico (31mg/Kg)

Modelos para el estudio del glioblastoma multiforme

A lo largo de este apartado se explicarán con detalle los modelos murinos utilizados para estudiar el GBM en la presente Tesis Doctoral.

Modelo ortotópico de GBM con células U251. Modelo intracraneal utilizado para el estudio del crecimiento tumoral y la capacidad infiltrativa (Candolfi, Curtin et al. 2007) de las células de GBM en respuesta a tratamiento con vehículo y CoQ10 (*Resultados, capítulo 5*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Anestesiarse a los ratones con ketamina ([Ketolar, Parke-Davis](#)) y xilacina ([Xilagesic, Calier](#)) a 75 y 10 mg/kg, respectivamente.
2. Colocar el animal en el estereotáxico.
3. Hacer un corte longitudinal en la piel que recubre el cráneo.
4. Localizar lambda y trasladar las coordenadas de inyección con el estereotáxico (Figura 8).
5. Trepanar con un minitaladro.
6. Inyectar 300.000 células U251 en 2µl de DMEM (sin suero (FBS) ni antibiótico).
7. Suturar la herida con 3-4 puntos.
8. Dejar recuperarse a los animales sobre una manta calefactada y posteriormente estabular.
9. Inyectar el CoQ10 (100mg/ Kg de ratón) o vehículo cada 4 días por vía intraperitoneal (*i.p.*).
10. A tiempo final, sacrificio por sobredosis de anestésico*.
11. Perfusión con PFA*.
12. Extracción de muestras*.
13. Procesamiento de muestras y corte de tejidos con microtomo de congelación*.

*Información adicional sobre el sacrificio de los animales y procesamiento de las muestras en el Anexo 1.4

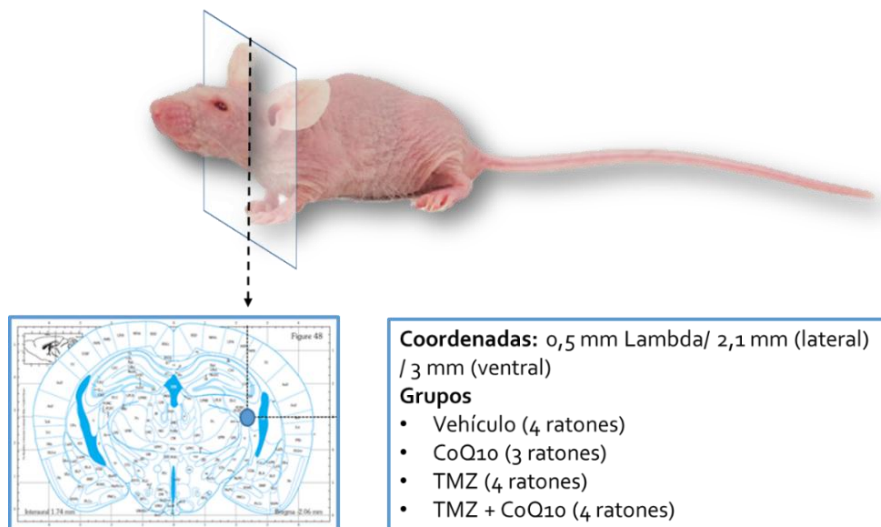


Figura 8. Modelo ortotópico. Se inyectaron 300.000 células U251 de forma intracraneal en el cuerpo estriado de ratones nu/nu mediante técnicas estereotáxicas. Tabla de pesos en el Anexo 1.4

Xenoinmante subcutáneo de células de GBM U251. Este modelo subcutáneo se ha utilizado para la monitorización del crecimiento tumoral (Candolfi, Curtin et al. 2007) en respuesta a los tratamientos con vehículo, CoQ10, temozolomida y combinados. Además se ha analizado el efecto de las terapias sobre los procesos de neovascularización e inflamación asociados al desarrollo del tumor (*Resultados, capítulos 5, 6 y 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Se requieren 2 millones de células U251 por animal.
2. Preparar las células en alícuotas en función del número de ratones que se vayan a inyectar. Mezclar las células en medio de cultivo con Matrigel GFR al 50% ([Life Technologies](#)) para obtener un volumen final de 200 µl para cada ratón. El Matrigel debe descongelarse, de forma suave para evitar que gelifique, en hielo a 4º durante 12 h.
3. Anestesiarse a los ratones con ketamina ([Ketolar, Parke-Davis](#)) y xilacina ([Xilagesic, Calier](#)) a 75 y 10 mg/kg, respectivamente.
4. Inyectar de forma subcutánea 2 millones de células U251 por ratón utilizando jeringas 27-29g.
5. Evaluar tamaño tumoral semanalmente utilizando un calibre digital y pesar el animal.
6. Inyectar el vehículo, CoQ10 (100mg/ Kg de ratón), temozolomida (50mM) o tratamiento combinado cada 4 días por vía intraperitoneal (*i.p.*).
7. Inyección de la sonda de hipoxia pinomidazol (*Hypoxyprobe™*).
8. Sacrificio por sobredosis de anestésico*.
9. Perfusión con PFA* y
10. Extracción de muestras*.
11. Porcesamiento de muestras y corte de tejidos con microtomo de congelación*

*Información adicional sobre el sacrificio de los animales y procesamiento de las muestras en el Anexo 1.4

Sonda de hipoxia, *in vivo*. Con esta sonda hemos estudiado los niveles de hipoxia en cerebros de ratones 3xTg-AD y NTg (*Resultados, capítulo 3*) y en tumores subcutáneos de U251 (*Resultados, capítulo 6*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Inyección intraperitoneal de pimonidazol ([Hypoxyprobe](#)) a una dosis de 60 mg/kg, entre 30 minutos y 3 horas antes del sacrificio del animal. En concreto, en estos estudios se ha inyectado 3 horas antes del sacrificio.
2. Tras el procesamiento y corte de los tejidos, inmunodetectar los aductos del pimonidazol en las regiones hipóxicas con un anti-MAb1 (1:50) y

posterior marcaje con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo (Ver protocolo Inmunohistoquímica más adelante).

Técnicas para el estudio de muestras de sangre

A lo largo de este apartado se explicarán con detalle técnicas para el estudio de H_2O_2 y CoQ10 en muestras de sangre.

Determinación de la concentración de H_2O_2 en leucocitos. Mediante esta técnica se ha estudiado el nivel de H_2O_2 en leucocitos extraídos de plasma de ratones 3xTg-AD y NTg (*Resultados, capítulo 3*) alimentados con las diferentes dietas. La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Recoger la sangre mediante punción cardíaca y disponerla en tubos con anticoagulante (citrato sódico 105 μ M, [Sigma-Aldrich](#)).
2. Añadir volumen igual de PBS + 2% FBS.
3. Centrifugar 10 min a 200g (sin freno) a 4°.
4. Almacenar el plasma en dos tubos.
5. Recoger la serie blanca (Figura 9).

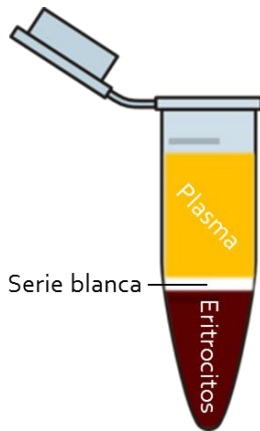


Figura 9. Serie blanca. Los diferentes componentes de una muestra de sangre, con anticoagulante, se pueden separar por gradiente. La serie blanca se forma entre el plasma y los eritrocitos y está compuesta principalmente por leucocitos y plaquetas.

6. Incubar la serie blanca con 500 μ L de PBS/FBS conteniendo sonda de H_2DCF -DA ([Life Technologies](#)) a 1:500.
7. Incubar 15 min a 37°.
8. Centrifugar a 500g durante 5 min.
9. Resuspender en 700 μ L de tampón PBS/FBS.
10. Medir en el fluorímetro [Shimadzu RF-5301](#) en cubeta de cuarzo de 700 μ L:
 - a. H_2O_2 : 495/520.
11. Añadir 1mL de DAPI en buffer (1:500), incubar 5 min y medir:
 - a. DAPI 350/480.
12. Congelar.

13. Los resultados se presentan como la señal de sonda H₂DCF-DA frente a la señal de DAPI.

Cuantificación de CoQ₁₀ en plasma mediante HPLC. Tras el tratamiento con Ubiquinol, es necesario medir los niveles de CoQ₁₀ en plasma y compararlos con los de animales tratados con vehículo, con dieta estándar y con animales NTg (*Resultados, capítulo 3*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Seleccionar el método electroquímico específico y flujo determinado (en nuestro caso método ELECTRO₃, con un flujo de 1mL/min).
2. Preparar fase móvil:
 - a. Composición de la fase móvil (500mL): 265 mL de metanol, 225 mL de n-propanol y 10 mL de acetato de amonio 1M (este se filtra antes de usarlo).
3. Seleccionar la bomba y línea determinada (en nuestro caso línea 4 y dos bombas al 50% cada una).
4. Estabilizar la línea base durante 30 minutos.
5. Resuspender la muestra en 30 µl de metanol.
6. Añadir 1 µl de bororohidruro de sodio 50mM (4mg en 1 ml) a la muestra antes de pinchar (añadiendo borohidruro conseguimos reducir toda la muestra, se disminuye el error y se mejora el rendimiento de la técnica).
7. Limpiar el inyector con metanol antes y después de pinchar. Si se trabaja con un inyector automático poner la muestra en los tubos específicos.
8. Pinchar el patrón de CoQ₁₀ 10 de 15 ppm (pretratado como las muestras). Anotar el tiempo de retención para usar como referencia para el resto de muestras.
9. Empezar a pinchar las diferentes muestras.
10. Cada 10 o 15 muestras, estabilizar la línea base y pinchar un patrón.
11. Una vez obtenidos los cromatogramas se cuantifica el área de los picos obtenidos en cada muestra y se refieren a las áreas de los patrones de concentración conocida.

* Protocolo de extracción de lípidos en el Anexo I

Técnicas histológicas

Tras el procesamiento de los tejidos (protocolos en Anexo I), se han llevado a cabo diferentes tinciones histológicas que se detallan a continuación.

Hematoxilina y eosina. Esta tinción se ha utilizado para identificar la ubicación de los tumores en los modelos ortotópicos y xenoimplantes (*Resultados, capítulo 5*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Montar las series de cortes sobre portaobjetos.
2. Incubar en etanol 100° ([Merck Milipore](#)) 1 min.
3. Incubar en etanol 90° ([PanReac](#)) 1 min.
4. Incubar en etanol 70° ([PanReac](#)) 1 min.
5. Incubar en etanol 50° ([PanReac](#)) 1 min.
6. Incubar en etanol 30° ([PanReac](#)) 1 min.
7. Incubar en PBS 100mM pH 7,4. 5 min.
8. Eliminar el exceso de líquido.
9. Añadir 200uL de hematoxilina ([Merck Milipore](#)) e incubar a temperatura ambiente 5 min.
10. Lavar con agua destilada.
11. Lavar 5 minutos con PBS 100mM, pH 7,4.
12. Eliminar el exceso de líquido.
13. Incubar con 400uL de eosina ([Fisher scientific](#)) durante 30 segundos. (Eosina, 1g en 100mL de agua, filtrar y sonicar. Se puede reutilizar).
14. Lavar con agua destilada.
15. Lavar 5 min con PBS 100mM pH 7,4.
16. Deshidratar con concentraciones crecientes de alcoholes hasta llegar a 100° (2x10m).
17. Incubar con Xilol ([Fischer Scientific](#)) (2x10m).
18. Montar en definitivo con bálsamo de Canadá o similar.
19. Adquirir imágenes con el microscopio Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) usando distintos objetivos (Figura 10).



Figura 10. Tinción de hematoxilina y eosina. Se realizaron series de los cerebros fijados del modelo ortotópico. Se hicieron series de 8 cortes, con una separación de 400 μ M entre los diferentes cortes, con el objetivo de identificar las regiones infiltradas por el tumor (línea amarilla). Se identificaron los tumores entre -1,22 y -3,52 de Bregma. Se creó un esquema sobre el que se seleccionaron los cortes para los estudios de Inmunohistoquímica.

*Preparación de PBS en Anexo I.

Inmunohistoquímica y revelado ABC-DAB. Esta técnica se ha utilizado para el estudio del volumen y área ocupada por el β A intracelular en machos 3xTg-AD y NTg (*Resultados, capítulo 3*) y la capacidad de infiltración de células de GBM en tumores ortotópicos (*Resultados, capítulo 5*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Seleccionar cortes de las regiones de interés del modelo ortotópico de GBM (zonas con infiltración tumoral). Seleccionar cortes de las regiones de interés en el modelo 3xTg-AD (hipocampo y corteza entorrinal).
2. Lavar (6 veces durante 5 min) las muestras en TBS* 0.05M pH 7.6.
3. Eliminación de la actividad peroxidasa endógena con 1% H₂O₂ en TBS. Dos incubaciones de 30 min.
4. Lavar las muestras 4 veces durante 10 min en TBS* 0.05M pH 7.6.
5. Incubar con el anticuerpo primario en TBS con 0.3% Tritón X-100 ([Fisher Scientific](#)) durante 12 en agitación suave a 4° C.
6. Lavar 3 veces durante 10 min las muestras en TBS* 0.05M pH 7.6.
7. Incubar con el anticuerpo secundario biotinilado (Dako) 1:200 en TBS con 0.3% Tritón X-100 durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave.
8. Lavar las muestras 3 veces durante 10 min en TBS* 0.05M pH 7.6.
9. Añadir el reactivo ABC Standard ([Vector](#)) (2 gotas de A + 2 gotas de B + 5ml PBS suplementado al 0.2% de TX-100) e incubar en agitación 2 h a temperatura ambiente.
10. Lavar el exceso de ABC con TBS 0.05M pH 7.6 (3 veces durante 10 min) en agitación y a temperatura ambiente.
11. Incubar con DAB ([Sigma-Aldrich](#)) durante 2,5 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente.
12. Lavar el exceso de DAB con TBS* 0.05M pH 7.6 (3 veces durante 10 min) en agitación y a temperatura ambiente.
13. Montar los cortes en portas gelatinizados* y dejar secar a temperatura ambiente 12 h (Figura 11 A).

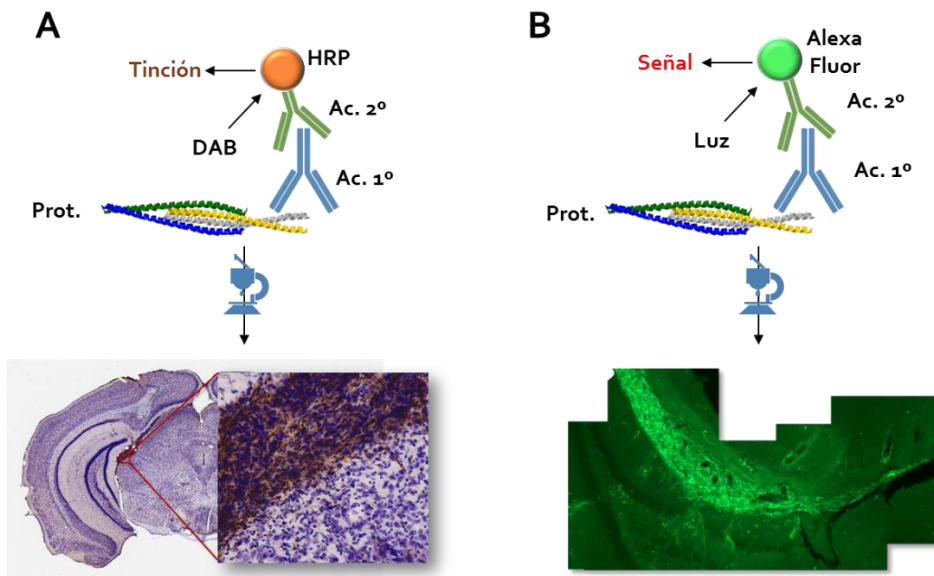


Figura 11. Inmunohistoquímica de vimentina. Se muestra el resultado de una inmunohistoquímica por el método de ABC-DAB contrateñido con Nissl (A) y un marcaje de un corte seriado mediante fluorescencia (B).

14. Si se va a realizar una contrateñido de Nissl, incubar en EtOH 100°/Cloroformo (50/50) 2 veces durante 30 minutos.
15. Incubar en etanol 100° ([Merck Milipore](#)) durante 5 minutos.
16. Incubar en etanol 96° ([PanReac](#)) durante 5 minutos.
17. Incubar en etanol 80° durante 5 minutos.
18. Incubar en etanol 50° durante 5 minutos.
19. Lavar en H₂O dos veces durante 5 minutos.
20. Incubar en tiónina filtrada 2 veces durante 5 minutos.
21. Lavar en H₂O dos veces durante 5 minutos.
22. Incubar en etanol 80° durante 5 minutos.
23. Incubar en etanol 96° durante 5 minutos.
24. Incubar en 5% ácido acético en etanol 96° 5', para eliminar el exceso de tiónina de los tejidos
25. Incubar en etanol 100° 2 veces durante 2 minutos.
26. Incubar en Xilol 2 veces durante 2 minutos.
27. Montar los portas con DPx ([VWR](#)) y dejar secar 12 horas.
28. Adquirir imágenes con un microscopio de luz transmitida. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)). También se utilizó un escáner de alta resolución (hasta 20x) ([ScanScope V1](#)). Analizar utilizando ImageJ o Fiji (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

29. Para el estudio del modelo 3xTg-AD se han cuantificado número de células marcadas con β -amiloide intracelular. En el modelo ortotópico de GBM se han utilizado para determinar el área y volumen tumoral utilizando un *Cavalieri estimator* y para determinar la infiltración celular y el área máxima de infiltración (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados").

*Preparación de TBS y portas gelatinizados en Anexo I.

Inmunohistoquímica de fluorescencia de tejido crioconservado. Mediante Inmunohistoquímica se han estudiado diferentes proteínas en muestras de cerebro de ratones 3xTg-AD y NTg (*Resultados, capítulo 3*) y en muestras de tumores subcutáneos e intracraneales de U251 (*Resultados, capítulos 5, 6 y 7*). La experimentación se realizó según se indica a continuación:

1. Seleccionar cortes de las regiones de interés del modelo ortotópico de GBM (regiones con presencia de tumor), implante subcutáneo de GBM o modelo 3xTg-AD (hipocampo y corteza entorrinal).
2. Lavar 3 veces durante 5 minutos las muestras en PBS pH 7,4*.
3. Incubar en solución de bloqueo la conteniendo albúmina sérica bovina (BSA) ([Fisher Scientific](#)) 0,5%, Tritón X-100 ([Fisher Scientific](#)) 0,1% en PBS pH 7,4*.
4. Incubar con anticuerpo primario (ver tabla anticuerpos) en solución de bloqueo, a 4° en agitación durante 12 horas.
5. Lavar 3 veces durante 5 min las muestras en PBS pH 7,4*.
6. Incubar con anticuerpo secundario (ver tabla anticuerpos) en solución de bloqueo. Incubación 1 hora en agitación y oscuridad a temperatura ambiente.
7. Lavar 3 veces durante 5 min las muestras en PBS pH 7,4*.
8. Montar los cortes sobre porta-objetos. Añadir medio de montaje Vectashield ([Vector](#)) o Anti-Fade con DAPI ([Life Technologies](#)).
9. Adquirir imágenes con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó un equipo invertido Nikon TiU ([Nikon, Tokyo, Japón](#)) con un objetivo de 2, 10, 20x en el canal azul, verde o rojo (Figura 10B). El análisis de imagen se realiza con ImageJ o Fiji. Se puede realizar análisis de intensidad de señal, o de colocalización (ver apartado "Cuantificación y obtención de resultados"). Las muestras se pueden almacenar a -20° tras adquirir las imágenes.

*Preparación de PBS en Anexo I

Cuantificación y obtención de resultados

A continuación se detallan los diferentes análisis realizados para la obtención de resultados. En los experimentos con imágenes de microscopía, siempre se mantienen los mismos parámetros para un mismo experimento.

Los análisis se han llevado a cabo con ImageJ ([Link de descarga](#)) o FIJI ([Link de descarga](#)).

Análisis cuantitativo de intensidad de señal

1. Adquirir imágenes a 20x.
2. Seleccionar la herramienta ROI Manager de ImageJ o FIJI (Analyze – Tools - ROI Manager) (Figura 12).
3. Seleccionar cada célula con la herramienta shape.
4. Añadir al ROI Manager (tecla t).
5. Seleccionar una región cercana a cada célula para medir el ruido de fondo.
6. Añadir al ROI Manager (tecla t).
7. Medir la señal de las células seleccionadas con *Measure*.
8. Pasar los datos a una hoja de cálculo.
9. Restar a cada intensidad su ruido de fondo.
10. Calcular el valor medio de intensidad.
11. Los resultados se muestran como intensidad media vs. señal control.

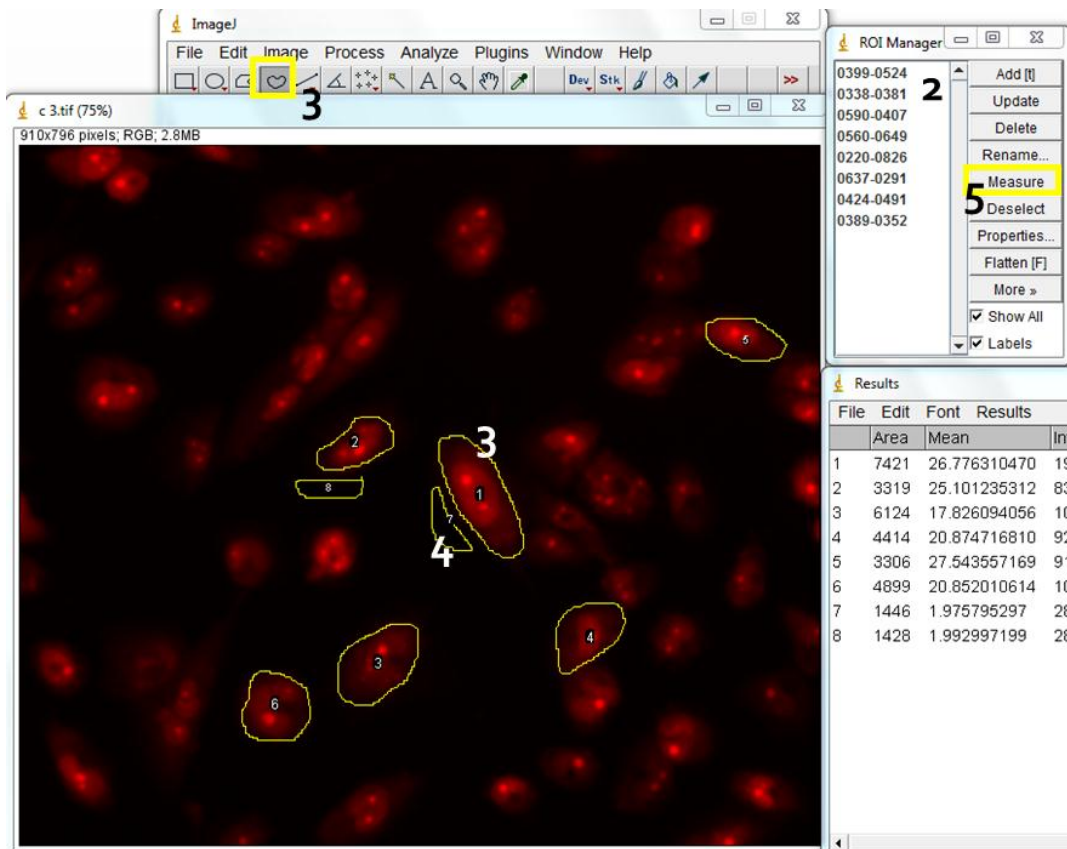


Figura 12. Cálculo de la intensidad de señal. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Determinación del porcentaje de células senescentes

1. Adquirir 10 imágenes (en contraste de fases y en fluorescencia) de cada tratamiento.
2. Con las imágenes de contraste de fases identificar el número total de células (flechas azules, imagen izquierda) (Figura 13).
3. Con la imagen de fluorescencia identificar el número de células fluorescentes que se corresponde con las células senescentes (flecha blanca).
4. Los resultados se representan como porcentaje de células senescentes frente al número total de células.



Figura 13. Análisis de células senescentes. Se calcula el porcentaje de células senescentes (flecha blanca) con respecto al número total de células (flecha azul).

Cuantificación de área abierta (ensayo de reparación de herida)

1. Adquirir imágenes a 2x en contraste de fases (tiempo = 0) (Figura 14 A).
2. Pasadas 24h adquirir de nuevo imágenes a 2x en contraste de fases (tiempo = 24h) (Figura 14 B).
3. Con la herramienta shape de ImageJ o FiJI seleccionar el área abierta.
4. Medir (Analyze- Measure).
5. Pasar los datos a una hoja de cálculo y determinar el porcentaje de área abierta en B con respecto a.

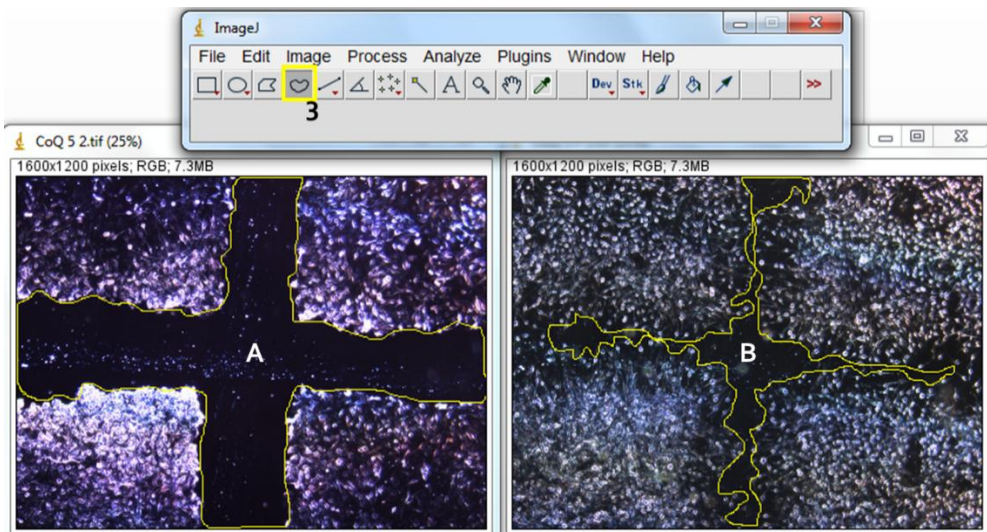


Figura 14. Determinación de área abierta. Se calcula el porcentaje de área abierta a tiempo=24h (B) respecto al tiempo =0 (A). Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Cuantificación número y porcentaje de células

1. Adquirir imágenes de fluorescencia a 2x.
2. Con ImageJ o FIJI transformar imágenes a 8-bits (Image - Type - 8bits) (Figura 15).
3. Para realizar el análisis cuantitativo se le aplica un umbral (Image - Adjust - Thresold) (el mismo para todas las imágenes, recuadro amarillo).
4. Aparece la imagen correspondiente a la máscara correspondiente a ese umbral.
5. Cuantificar el número total de partículas (células) (Analyze - Analyze particles - Summarize).
6. Los resultados se muestran como porcentaje con respecto al control.

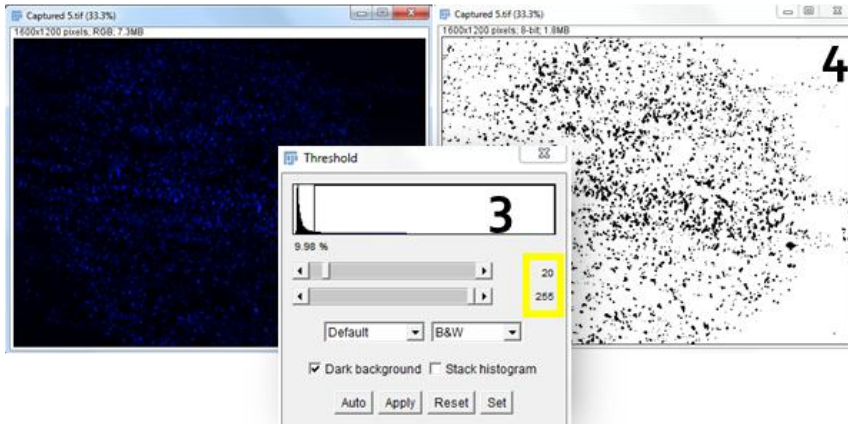


Figura 15. Determinación del porcentaje de células. En este caso, la imagen se corresponde con un experimento de invasión celular. El recuadro amarillo representa el valor de umbral para aplicar a todas las imágenes. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Análisis de la morfología celular

1. Adquirir imágenes en contraste de fases a 20x o 40x.
2. Abrir la aplicación de ImageJ o Fiji ROI Manager (Analyze - Tools - ROI Manager) (Figura 16).
3. Seleccionar en cada célula diámetro máximo y mínimo (ancho y largo) y el área (líneas amarillas).
4. Determinar los valores (Measure, recuadro amarillo).
5. Los resultados se presentan como cociente diámetro máximo/mínimo y como área celular.
6. La determinación se hace sobre un mínimo de 100 células.

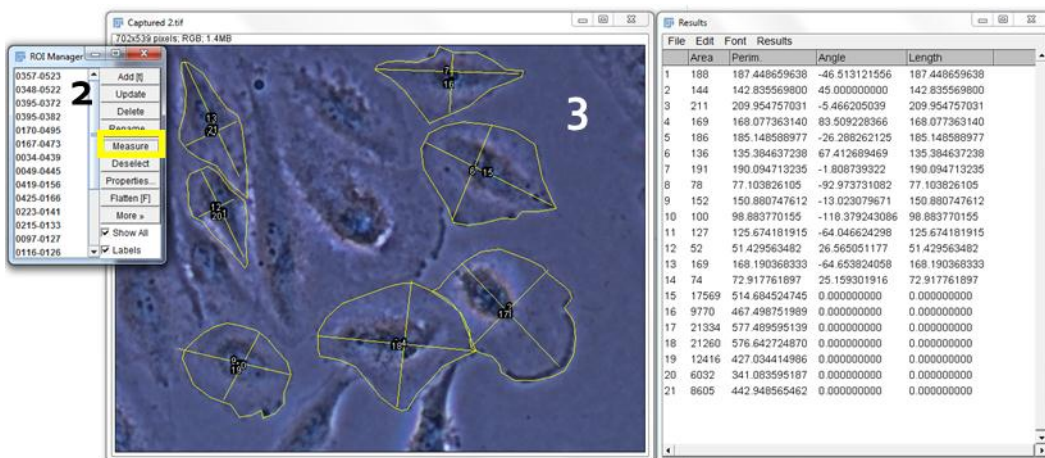


Figura 16. Determinación morfológica celular. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Análisis densitométrico de *Western blot*

1. Escanear las películas
2. Abrir las imágenes con ImageJ o Fiji y recortar (Image - Crop) (Figura 17).
3. Invertir los colores (Edit - Invert).
4. Seleccionar la banda a la que se referirán el resto de valores con un rectángulo (Shape).
5. Medir la intensidad media de esa banda (Analyze - Measure) (línea azul) y su ruido de fondo (línea verde).
6. Cuantificar con ese mismo rectángulo el resto de bandas.
7. Restar a cada valor su ruido de fondo.

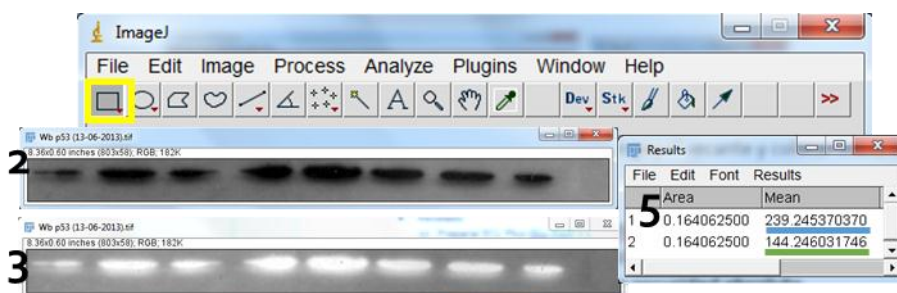


Figura 17. Análisis densitométrico. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Cuantificación de intensidad de señal nuclear y citoplasmática

1. Adquirir imágenes de microscopía de fluorescencia.
2. Abrir cada imagen y su imagen de núcleos correspondiente (DAPI).
3. Seleccionar la herramienta ROI Manager de ImageJ o Fiji (Analyze – Tools - ROI Manager) (Figura 18).
4. Seleccionar la región nuclear en la imagen de núcleos.
5. Aplicar las áreas de los núcleos a la imagen de fluorescencia.
6. Seleccionar el área citoplasmática.
7. Seleccionar una región cercana a cada célula para medir el ruido de fondo.
8. Medir la señal de todas las regiones seleccionadas (Measure).
9. Pasar los datos a una hoja de cálculo.
10. Restar a cada intensidad su ruido de fondo.
11. Calcular el valor medio de intensidad.
12. Representar la señal nuclear, citoplasmática y el ratio (nuclear / citoplasmática).

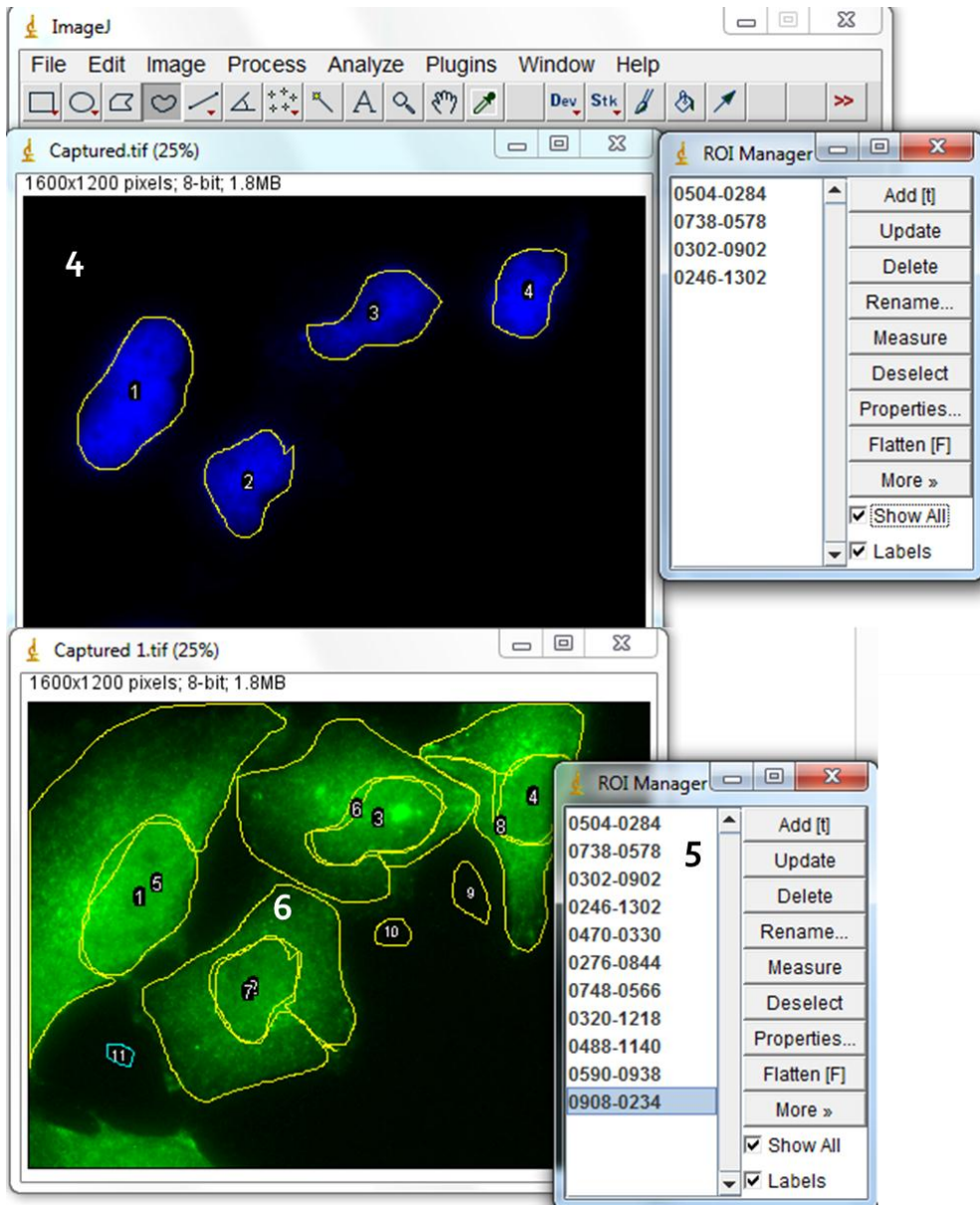


Figura 18. Análisis de intensidad de señal nuclear y citoplasmática. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Determinación del volumen e infiltración en modelos ortotópicos

1. Abrir las imágenes de IHC+Nissl con ImageJ o FIJI.
2. Extraer el canal DAB-ABC (Image- Colour- Colour Deconvolution- ABC) (Figura 19).
3. Se obtiene una imagen del canal DAB-ABC.

4. Abrir ROI Manager (Analyze- Tools- ROI Manger)
5. Seleccionar las diferentes áreas de tumor y de infiltración y la distancia máxima de infiltración.
6. Una vez que se tienen los valores para toda una serie de imágenes realizar la aproximación volumétrica utilizando el Cavalieri Stimator (Volumen= sumatorio del núm. de puntos marcados * la distancia entre los puntos en XY * distancia entre los puntos en Z) (Hendricks 2007).
7. Los resultados se representan como la comparativa entre los volúmenes o la distancia máxima de infiltración entre ratones control y tratados con CoQ10.

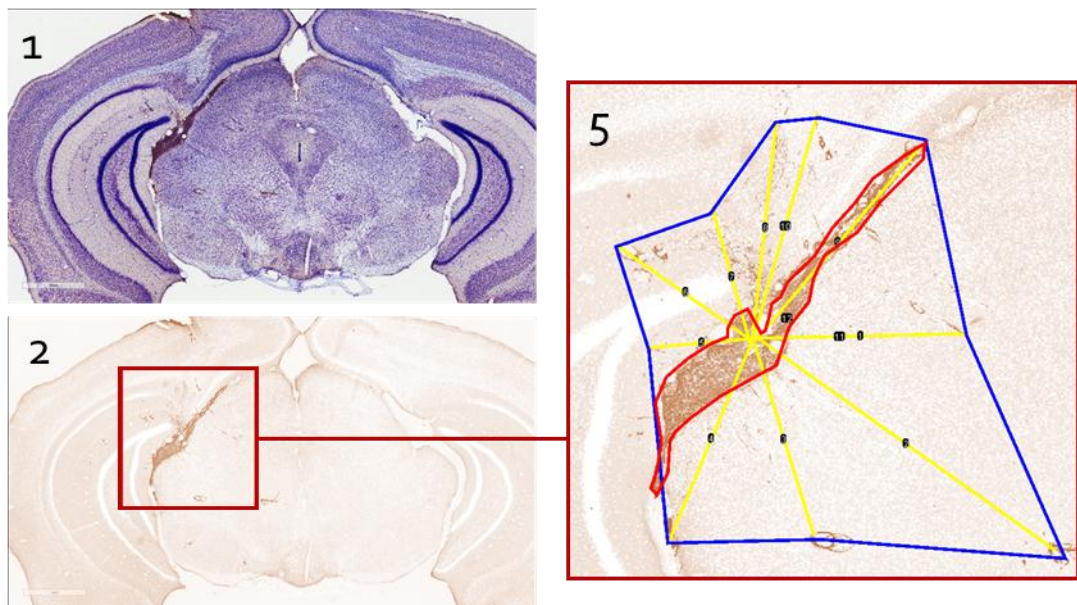


Figura 19. Análisis de volumen e infiltración. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis.

Análisis de colocalización

1. Abrir las imágenes con ImageJ o Fiji las imágenes.
2. Pasar las imágenes de cada canal a 8-bits (Image – Type- 8bits) (Figura 20).
3. Aplicar su color correspondiente (Image – Lookup labels).
4. Utilizar la aplicación “colocalization” (Plugins – Colocalization) (Descarga) y seleccionar las imágenes correspondientes.
5. Mostrar los puntos colocalizados en 8-bits (*Colocalized points 8-bit*).
6. Aparece una máscara que corresponde a todos los puntos que colocalizan entre las dos imágenes.
7. Medir el porcentaje de área (*Measure*).

- Los datos se representan como porcentaje de área colocalizada, también se pueden referir alguno de los marcajes iniciales.

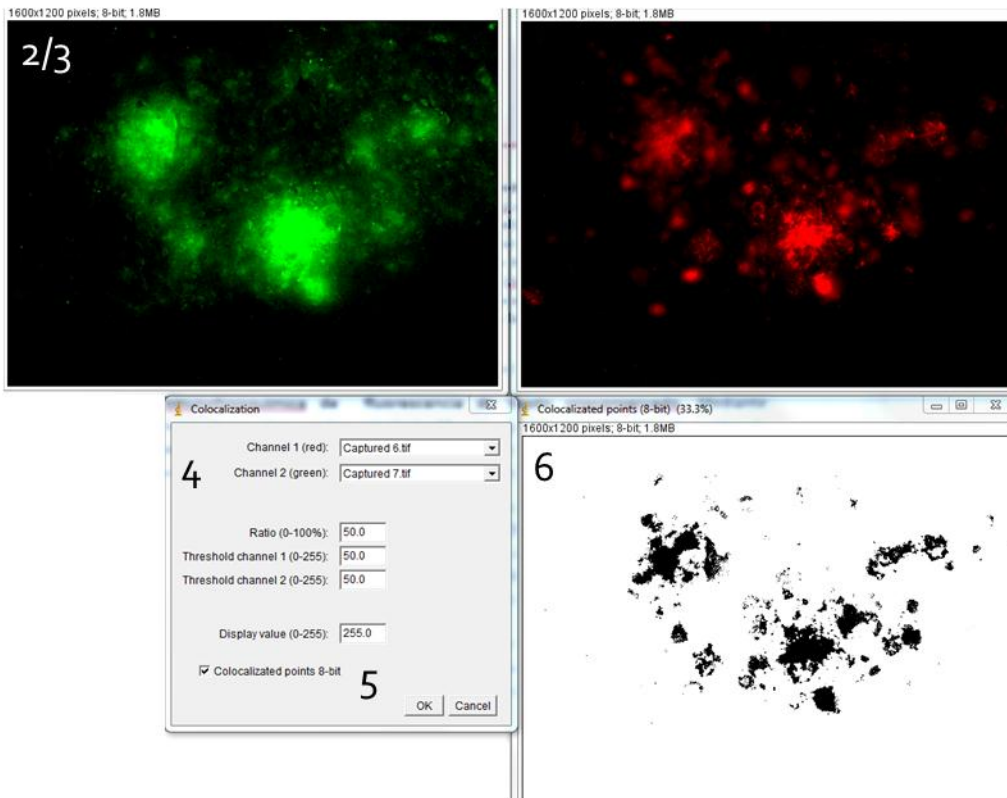


Figura 20. Análisis de colocalización. Los diferentes números se corresponden con los pasos expuestos para llevar a cabo el análisis. Este análisis también se puede aplicar a imágenes de Inmunocitoquímica.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5 (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>). Los datos analizados siempre han sido de al menos 3 experimentos independientes o 3 animales por grupo. Se han aplicado diferentes estadísticos en función de los requisitos experimentales:

- Para comparar dos grupos (dos columnas) se han utilizado *t test* no pareados. También se han utilizado tests no paramétricos como *Mann-Whitney* o *Wilcoxon test*.
- Para medidas ordinarias o repetidas en tres o más grupos se han utilizado ANOVA seguidos por diferentes post-tests: *Tukey*, *Newman-Keuls*, *Dunnett's* o *Bonferroni*.
- Si no se cumple la normalidad, se han utilizado *One-way ANOVA*.

- Se consideró una significación estadística para un valor de p menor o igual que 0.05.

Los datos han sido representados como media \pm SEM (Error estándar de la media). Las diferencias significativas fueron marcadas como *, "a" o "b" $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla de anticuerpos

Tabla 1. Relación de anticuerpos utilizados tanto en técnicas *in vitro* como *in vivo*.

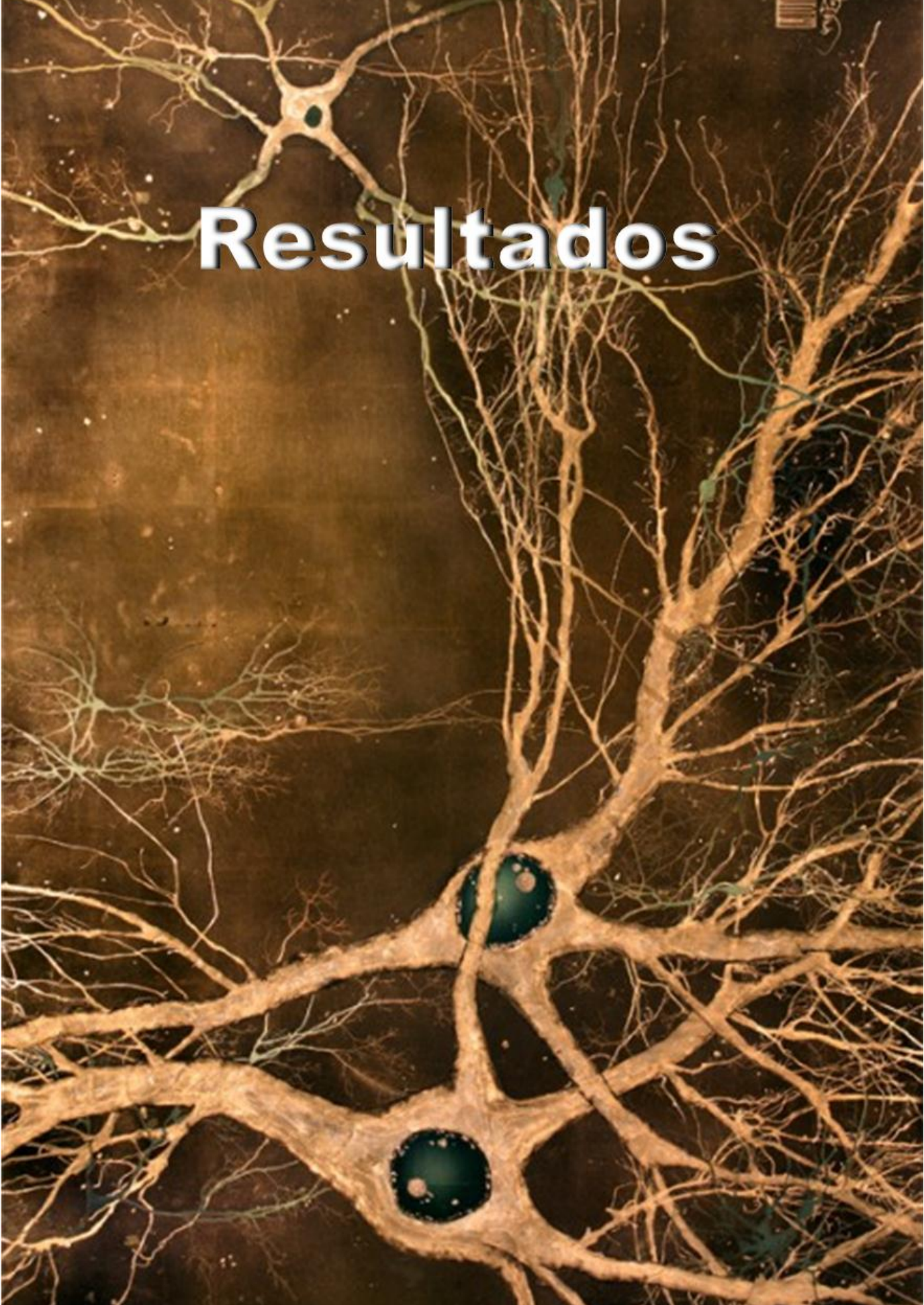
Antígeno	Especie	Peso Mol	Empresa	Técnicas
Actina	Mouse (monoc)	43 Kda	Life Technologies	ICC, Wb
Akt1/2/3	Rabbit (polyclonal)	1: 62; 2: 56; 3: 62 KDa	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
AMPK 1/2	Rabbit (polyclonal)	63 Kda	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
Anexina V	PE (mar.dir.)	35-36 KDa	BD Pharmingen	ICC
BACE-1	Rabbit (policlonal)	77K Da	Abcam	IHC
Colágeno IV	Mouse (monoc.)	200 KDa	Sigma-Aldrich	IHC
ERK 1/2	Mouse (monoc.)	1: 44 KDa; 2: 42 KDa	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
H2a.X	Rabbit (polyclonal)	15 KDa	SantaCruz Biotech	IHC
Hif-1α	Rabbit (polyclonal)	132 KDa	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
Hypoxiprobe	Mouse (monoc.)	-	Hypoxiprobe™	IHC
Iba-1	Rabbit (policlonal)	17 KDa	Wako	IHC
Ki-67	Rabbit (polyclonal)	395/345 KDa	SantaCruz Biotech	IHC, Wb
LC3	Rabbit (polyclonal)	16 KDa LC3I/18 KDa LC3II	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
MGMT	Goat (polyclonal)	26KDa (unmodified) & 50KDa (ubiquitinated)	SantaCruz Biotech	ICC, IHC, Wb
MOMA-2	Rat (monoclonal)	140 KDa	SantaCruz Biotech	IHC
mTOR	Rabbit (polyclonal)	211-245 Kda	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
NFkB p50	Goat (polyclonal)	50 KDa (105 KDa)	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
NFkB p65	Rabbit/Goat (poli)	65 KDa	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
NQO1	Goat (polyclonal)	31 KDa	SantaCruz Biotech	IHC
p53	Mouse (monoc.)	53 KDa	BD Pharmingen	ICC, Wb
p-Akt 1/2/3	Rabbit (polyclonal)	1: 62KDa; 2: 56 KDa; 3: 62 KDa	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
p-AMPK 1/2	Rabbit (polyclonal)	63 K Da	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
PECAM-1	Rabbit (polyclonal)	130 KDa	SantaCruz Biotech	IHC
p-ERK	Mouse (monoc.)	1: 44 KDa; 2: 42K Da	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
PFKP	Rabbit (policlonal)	86 KDa	SantaCruz Biotech	Wb
p-FRAP	Rabbit (policlonal)	211-245 KDa	SantaCruz Biotech	ICC, Wb
PGM2	Goat (policlonal)	68 KDa	SantaCruz Biotech	Wb
Sirtuina 1	Rabbit (monoc)	82 KDa	Abcam	Wb
SOD1	Goat (polyclonal)	32 KDa	Life Technologies	ICC, Wb
SOD2	Rabbit (policlonal)	26,6 KDa	SantaCruz Biotech	Wb
Vimentina	Mouse (monoc.)	54 KDa	SantaCruz Biotech	IHC
β-amiloide	Rabbit (policlonal)	128 KDa	Cell Signaling	IHC
β-amiloide	Mouse (monoc.)	128 KDa	Abcam	IHC

Todas las técnicas utilizadas han sido puestas a punto en el laboratorio de Estrés Oxidativo y Neurodegeneración de la Facultad de Medicina de la UCLM en Ciudad Real.

Para el desarrollo de todos los experimentos presentados en esta tesis doctoral se ha colaborado con los siguientes investigadores:

- José Manuel Villalba, José Alberto López Domínguez, Lucía Fernández del Río y Julia Ariza del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Ciencias (UCO).
- Lydia Giménez-Llort y Virginia Torres-Lista del Departamento de Psiquiatría y Medicina Forense, Facultad de Medicina (UAB).
- Víctor M. Pérez-García y Alicia Martínez González del Departamento de Matemáticas, ETSII (UCLM).
- Sara Díaz Sánchez y Mairena Martín del Área de Bioquímica, Facultad de Químicas (UCLM).
- María Victoria Gómez Almagro y María Moreno del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas (UCLM).
- Gustavo Ferrín Sánchez del Grupo de Estrés oxidativo y nitrosativo en hepatopatías agudas y crónicas (IMIBIC).
- Eva Lozano y Rosa Morera de la Unidad de Radioterapia (HGUCR).
- Jacinto Arjona y Antonio Gil Aguado de la Unidad de Radiofísica (HGUCR).
- Luis Pérez-Romasanta de la Unidad de Radioterapia (HUS).
- Milica Pêsic del Instituto de Investigación Biológica "Sinisa Stankovic" (U. Belgrade).

Resultados



...la ciencia es un esfuerzo de colaboración. Los resultados combinados de varias personas que trabajan juntas es a menudo mucho más eficaz de lo que podría ser el de un científico que trabaja solo.

John Bardeen

Resumen general de los resultados

El estrés oxidativo juega un papel crucial en el desarrollo de diferentes patologías. Basándonos en esta premisa, el uso de antioxidantes podría frenar dicho desarrollo, ya que reducen los niveles de EO, entre otras muchas funciones. En la presente tesis hemos estudiado la relación de dicho estrés oxidativo y el uso del CoQ10 y la patología, centrándonos en la patología vascular, patología asociada al EO y patología inflamatoria, que caracteriza la enfermedad de Alzheimer y el Glioblastoma multiforme, dos enfermedades en principio muy diferentes, pero con patrones comunes.

En primer lugar observamos como ratones transgénicos de la EA presentaban una alteración en el patrón de enzimas antioxidantes en distintas regiones cerebrales en la fase prodrómica. Esta fase es considerada clave en el estudio de la enfermedad, ya que aún no han aparecido las estructuras histopatológicas. Esta alteración sugiere un intento de defensa fisiológica antioxidante frente al daño oxidativo que subyace a la enfermedad. Además, esta alteración antioxidante va acompañada de un incremento del deterioro cognitivo (**Capítulo 1**). Quisimos observar si la alteración vascular, descrita durante el desarrollo de la EA en este modelo de ratón, podría frenarse con el uso de antioxidantes exógenos. Para ello, trabajamos con un modelo *in vitro* celular para observar el efecto del β -amiloide sobre células endoteliales humanas (HUVECs) y como el CoQ10 puede frenar ese efecto dañino. Observamos como la adición de β A supone un incremento en las ROS celulares, y como mediante el uso del CoQ10 estos niveles descendían, además vimos como el CoQ10 ofrece protección frente al daño oxidativo inducido por el β A. El tratamiento con CoQ10, además contrarresta la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} producida por el β A. Todo ello viene acompañado por un efecto del CoQ10 sobre la incorporación del β A a las células y a la mitocondria (**Capítulo 2**). Una vez observado el efecto protector del CoQ10 frente al daño oxidativo inducido por el β A, decidimos comprobar el efecto del CoQ10 en un modelo *in vivo*, para ello trabajamos con el mismo modelo en el que observamos las alteraciones oxidativas en la fase prodrómica (3xTg-AD). Se alimentó a los ratones con dieta suplementada con CoQ10 en su forma reducida (Ubiquinol) hasta los 12 meses (edad a la que el modelo desarrolla estructuras histopatológicas), con el fin de ver si el ubiquinol (Ub) protegía *in vivo* frente al daño inducido por la EA. A nivel plasmático, observamos un descenso en marcadores de EO en animales tratados con Ub. A nivel cerebral comprobamos como el Ub inducía una mejora en el daño vascular, y un descenso en el depósito de placas, hipoxia y niveles de BACE-1, tanto en machos como en hembras. Además estudiamos el comportamiento de estos ratones, observando un menor deterioro cognitivo en ratones tratados con Ub. También vimos como el excipiente que

contiene ascorbato para mantener el Ub en su estado reducido, mejoraba la mayoría de los factores estudiados, aunque en menor medida que el Ub (**Capítulo 3**).

Los efectos neuroprotectores del CoQ10 y su acción sobre la hipoxia y la patología vascular, además de sus funciones como antioxidante, nos hicieron estudiar el efecto del CoQ10 en modelos de glioblastoma multiforme (GBM), un tipo de tumor cerebral altamente infiltrativo con un nivel muy elevado de ROS que compromete la eficacia de las terapias actuales. Mediante el tratamiento con CoQ10 observamos un descenso en los niveles ROS y en la maquinaria antioxidante. Este descenso sensibiliza a las células frente a la radioterapia. Observamos cómo tras un pre-tratamiento con CoQ10 y un tratamiento de radioterapia, esta última es mucho más efectiva. Este incremento se debe al efecto del CoQ10 sobre la catalasa, superóxido dismutasa 2, glutatión, FOXO-3A y metabolitos clave. También quisimos estudiar el posible efecto quimiosensibilizador del CoQ10 sobre la temozolomida (TMZ), ya que la resistencia a quimioterapia es otro factor clave en el fracaso terapéutico frente al GBM. Observamos como el pre-tratamiento con CoQ10 incrementaba la apoptosis en células tratadas con TMZ, incrementando los niveles de p53 y reduciendo los niveles de MGMT, la principal responsable de la resistencia a TMZ en GBM. Además, observamos como el pre-tratamiento con CoQ10 también regulaba procesos de senescencia celular, actividad telomérica y procesos de autofagia. Además observamos un incremento en la apoptosis inducida por la radiación combinada con quimioterapia (**Capítulo 4**). Los resultados obtenidos en los experimentos relacionados con radioterapia pusieron de manifiesto que el CoQ10 regula rutas clave del GBM a través del descenso de las ROS. Estudiamos el efecto del CoQ10 sobre el factor de transcripción HIF-1 α . Este factor, es regulado por ROS y controla procesos esenciales en el desarrollo tumoral. Observamos como el tratamiento con CoQ10 reduce los niveles de HIF-1 α . Además altera la activación de quinasas clave como Akt, AMPK y Erk. Todo ello acompañado de un cambio en el metaboloma. Estas alteraciones se traducen en un efecto del tratamiento con CoQ10 sobre procesos de migración e infiltración celular. Desarrollamos dos modelos *in vivo*, un modelo ortotópico y otro de *xenograft*, ambos con células U251. Vimos como el CoQ10 redujo el crecimiento en ambos modelos, observamos un descenso drástico de la hipoxia en el modelo *xenograft*, además de un descenso en la infiltración de células intracerebral (**Capítulo 5**). Además del control sobre el crecimiento y la migración, HIF-1 α induce angiogénesis e inflamación, dos pilares fundamentales en el desarrollo del GBM. Mediante experimentos *in vitro*, comprobamos como el tratamiento con CoQ10 reduce la secreción de moléculas pro-angiogénicas y pro-inflamatorias, esto se traduce en la formación de menos vasos *in vitro* y en el modelo *xenograft* y en el reclutamiento de menos células inflamatorias *in vitro* y en ambos modelos *in vivo*.

Esta regulación de los procesos inflamatorios viene controlada por el factor de transcripción NF- κ B. Observamos como el tratamiento con CoQ10 reducía los niveles de dicho factor (**Capítulo 6**).

Índice de figuras del apartado “Resultados”.

Figura 1.1. Western blot de NQO1, SISRT1 & SOD1 en neocorteza e hipocampo de ratones 3xTg-AD.

Figura 2.1. El CoQ10 protege células endoteliales de la apoptosis y necrosis inducida por el β A.

Figura 2.2. El CoQ10 bloquea la inhibición por β A de la migración celular y angiogénesis *in vitro* en HUVECs.

Figura 2.3. El CoQ10 previene el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en HUVECs mediado por β A.

Figura 2.4. El CoQ bloquea la entrada de Ca^{2+} inducida por el β A en HUVECs

Figura 2.5. Efecto del tempol y el α -tocoferol sobre la apoptosis, la liberación de Ca^{2+} y el $O_2^{\cdot-}$ inducidos por el β A.

Figura 2.6. El descenso de NO es parcialmente bloqueado por el pretratamiento con CoQ10.

Figura 2.7. El CoQ10 impide la apertura del PTPm inducida por el β A.

Figura 2.8. El CoQ10 retrasa y reduce la incorporación de β A en HUVECs.

Figura 2.9. El CoQ10 disminuye la incorporación de β A en mitocondrias de HUVECs.

Figura 3.1. El suplemento con ubiquinol incrementa los niveles plasmáticos de CoQ10.

Figura 3.2. El nivel de H_2O_2 desciende en leucocitos de ratones 3xTg-AD alimentados con dieta suplementada con ubiquinol.

Figura 3.3. El ubiquinol reduce los niveles de marcadores de EO en plasma de ratones 3xTg-AD.

Figura 3.4. El ubiquinol disminuye el engrosamiento de la lámina basal en ratones 3xTg-AD.

Figura 3.5. Distribución espacial de placas de β A y de hipoxia en cortes seriados de cerebro de ratón 3xTg-AD.

Figura 3.6. El ubiquinol reduce la deposición de placas de β A y la hipoxia en CA1 de ratones 3xTg-AD.

Figura 3.7. El ubiquinol reduce la deposición de placas de β A y la hipoxia en corteza entorrinal de ratones 3xTg-AD.

Figura 3.8. El ubiquinol reduce el acúmulo de β A extracelular e intracelular en CA1 de machos 3xTg-AD.

Figura 3.9. El ubiquinol reduce los niveles de BACE-1 en ratones 3xTg-AD.

Figura 4.1. Efecto del CoQ10 en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en células U251.

Figura 4.2. Efecto del CoQ10 sobre la capacidad antioxidante total en células U251.

Figura 4.3. El pretratamiento con CoQ10 incrementa la apoptosis inducida por la radioterapia en células de GBM U251.

Figura 4.4. El CoQ10 potencia el efecto citotóxico de la radioterapia en células U251, a largo plazo.

Figura 4.5. El CoQ10 reduce el nivel de lactato intracelular.

Figura 4.6. El CoQ10 inactiva FOXO-3A y reduce la actividad catalasa y el nivel de SOD2, sensibilizando las células U251 al efecto citotóxico del H_2O_2 .

Figura 4.7. El CoQ10 reduce el nivel de GSH/GSSG en células U251 regulando metabolitos clave para su síntesis.

Figura 4.8. El CoQ10 incrementa el daño citostático/tóxico inducido por TMZ, *in vitro*.

Figura 4.9. El CoQ incrementa el nivel de apoptosis, Anexina V y p53 en U251 tratadas con TMZ.

Figura 4.10. El CoQ10 potencia el efecto citotóxico de la TMZ en células U251 a largo plazo.

Figura 4.11. El CoQ10 reduce el nivel de MGMT y su translocación a núcleo en células tratadas con TMZ.

Figura 4.12. El CoQ10 reduce la senescencia en células tratadas con TMZ.

Figura 4.13. El CoQ10 reduce la longitud de los telómeros en células U251.

Figura 4.14. El CoQ reduce la autofagia en U251 tratadas con TMZ.

Figura 4.15. El tratamiento con CoQ10 y TMZ potencia el efecto de la radioterapia en células U251.

Figura 5.1. El CoQ10 reduce la proliferación y viabilidad de células U251.

Figura 5.2. El CoQ10 reduce el nivel de HIF-1 α en células U251.

Figura 5.3. Efecto del CoQ sobre el metaboloma de células U251.

Figura 5.4. El CoQ incrementa el consumo de oxígeno asociado al complejo II mitocondrial.

Figura 5.5. El CoQ regula la fosforilación de Akt, Erk y AMPK en células U251.

Figura 5.6. El CoQ10 regula los niveles de PFKP.

Figura 5.7. El CoQ10 reduce la motilidad de células U251, *in vitro*.

Figura 5.8. El CoQ10 reduce la capacidad invasiva de células U251.

Figura 5.9. El CoQ10 induce cambios morfológicos en células U251.

Figura 5.10. El CoQ10 reduce la proliferación y el tamaño de tumores en ratones tratados con TMZ, *in vivo*.

Figura 5.11. El CoQ10 reduce la hipoxia, *in vivo*.

Figura 5.12. El CoQ10 descende el volumen tumoral y la capacidad de infiltración, *in vivo*.

Figura 6.1. Los medios condicionados de U251 tratadas con CoQ10 reducen la angiogénesis *in vitro*.

Figura 6.2. El CoQ reduce los niveles de NF- κ B tras 24h de tratamiento.

Figura 6.3. La secreción de factores angiogénicos se reduce por el tratamiento con CoQ10.

Figura 6.4. La secreción de factores inflamatorios y quimiotácticos se reduce por el tratamiento con CoQ10.

Figura 6.5. Efecto del CoQ10 sobre vasculatura en tumores de GBM xenoinplantados de forma subcutánea.

Figura 6.6. Efecto del CoQ10 sobre la infiltración de células inflamatorias en tumores de GBM implantados de forma subcutánea.

Figura 6.7. El CoQ10 reduce la infiltración de microglía *in vivo*.

Capítulo I. La neofobia, NQO₁ y SIRT₁ como indicadores de la fase prodrómica de la enfermedad de Alzheimer en ratones 3xTg-AD

En este capítulo, se ha estudiado la variación temporal de tres enzimas antioxidantes clave en el sistema de defensa frente al daño oxidativo, en neocorteza e hipocampo, a diferentes edades y en relación con síntomas cognitivos y comportamentales. Se ha trabajado con el modelo de la EA 3xTg-AD y ratones NTg como controles. En este modelo, a la edad de 2 meses, cuando aún no se había detectado β -amiloide intracelular, se observó un aumento en la neofobia, indicativa de la aparición de síntomas comportamentales y psicóticos asociados a la demencia (BPSD) en etapas premórbidas de la enfermedad en humanos. Estos resultados han sido publicados en la revista *Behavioural Brain Research* (Torres-Lista, Parrado-Fernandez et al. 2014).

Alteración en el patrón de enzimas antioxidantes en neocortex de ratones 3xTg-AD

Entre las principales proteínas antioxidantes relacionadas con la EA destacan la NQO₁, SIRT₁ y SOD₁. NQO₁ forma parte del PMRS y juega un papel clave en la neuroprotección (Villalba and Navas 2000, Hyun, Mughal et al. 2010), diferentes estudios han mostrado su relación con la EA (Raina, Templeton et al. 1999, SantaCruz, Yazlovitskaya et al. 2004). La función neuroprotectora de SIRT₁ frente al daño producido en la EA se ha demostrado a distintos niveles. Destaca su papel en la regulación del procesamiento anómalo del β A (Bonda, Lee et al. 2011). La relación de la SOD₁ con la neurodegeneración y en especial con la EA es clave (Murakami, Shimizu et al. 2011), de hecho, la deficiencia en esta enzima está asociada con una oligomerización del β A mucho más eficiente (Murakami, Murata et al. 2011).

Tras el sacrificio de los ratones se extrajeron los tejidos y se almacenaron a -80° hasta su homogeneización y extracción de proteínas. Se analizó mediante *Western blot* el nivel de las proteínas antioxidantes NQO₁, SIRT₁ y SOD₁ en muestras neocortex de ratones NTg y 3xTg-AD de 2, 4 y 6 meses. Se observó un incremento de 4 veces en los niveles de NQO₁ en muestras de ratones 3xTg-AD de 2 meses frente a NTg (Figura 1.1 A, D). A los 4 meses se observó un incremento no significativo en ratones 3xTg-AD (Figura 1.1 B, D) mientras que a los 6 meses los niveles eran similares entre ratones 3xTg-AD y NTg (Figura 1.1 C, D). El nivel de SIRT₁ aumentó de forma progresiva siguiendo una pauta tiempo-dependiente en los ratones 3xTg-AD comparado con NTg. A los 2 y 4 meses el nivel de SIRT₁ en ratones 3xTg-AD fue inferior al observado en NTg, mientras que a los 6 meses se

observó un incremento significativo del 50% en ratones 3xTg-AD ($p < 0.01$) (Figura 1.1 A, B, C, E). En el caso de la SOD1 no se observó ningún cambio (Figura 1.1 F).

Alteración en el patrón de enzimas antioxidantes en hipocampo de ratones 3xTg-AD

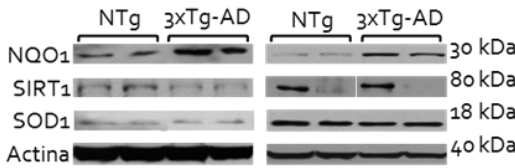
El hipocampo, es una de las primeras regiones que se afectan por las estructuras patológicas de la EA en humanos (Braak and Braak 1991). En el modelo 3xTg-AD ocurre de forma similar (Oddo, Caccamo et al. 2003). Se analizaron mediante *Western blot* los niveles de las proteínas antioxidantes NQO1, SIRT1 y SOD1, en muestras de ratones de 2, 4 y 6 meses 3xTg-AD con respecto a ratones control (NTg). Se observó un incremento de 8 veces en los niveles de NQO1 en muestras de ratones 3xTg-AD de 2 meses frente a ratones NTg (Figura 1.1 A, D), incremento mayor al observado en neocorteza. Los niveles de esta proteína descendieron drásticamente hasta niveles similares a los ratones control a los 4 y 6 meses (Figura 1.1 B, C, D). El patrón observado con NQO1 fue similar al que se observó en neocortex, solo que, a los 4 meses, en neocortex, el incremento de NQO1 se mantiene de forma ligera en las muestras de ratones 3xTg-AD frente a NTg (Figura 1.1 B, D), mientras que en hipocampo se iguala al de muestras NTg. En el caso de SIRT1, el patrón observado en hipocampo, fue totalmente contrario al que se observó en neocortex. Los resultados mostraron un nivel similar a los 2 meses entre ratones 3xTg-AD y NTg (Figura 1.1 A, E) y un posterior descenso significativo tiempo-dependiente a los 4 ($p < 0.01$) y 6 meses ($p < 0.05$) en ratones 3xTg-AD frente a NTg (Figura 1.1 B, C, E). En el caso de la SOD1 no se observaron diferencias significativas ni a los 2 meses (Figura 1.1 A, F) ni a los 6 meses de edad entre ambos grupos (Figura 1.1 C, F). A diferencia de los resultados en neocortex, si se observó un fuerte incremento de 2 veces a los 4 meses en los ratones 3xTg-AD frente a los niveles obtenidos en muestras de ratones NTg (Figura 1.1 B, F). Todos los estudios de *Western blot* se desarrollaron en colaboración con la Dra. Cristina Parrado Fernández (Área de Biología Celular, Facultad de Medicina de Ciudad Real).

Estos resultados se complementaron con un estudio previo comportamental de los mismo ratones, desarrollado por el laboratorio de Lydia Giménez-Llort (Departamento de Psiquiatría y Medicina Forense, Universidad Autónoma de Barcelona). Se observaron una serie de alteraciones en los ratones 3xTg-AD, entre las que destacan una latencia del *rearing*, que es un comportamiento asociado a la exploración, observado en fases tempranas, seguido de un perfil ansioso. Estos resultados completos se pueden ver en el Anexo II de la presente tesis doctoral.

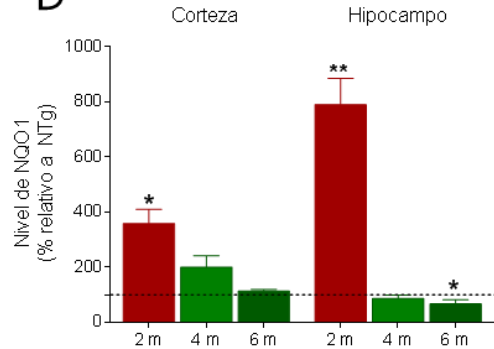
La alteración en el patrón de diferentes enzimas relacionadas con la homeostasis redox sugiere la activación edad-dependiente de un sistema de defensa antioxidante frente al daño oxidativo en ratones 3xTg-AD. Dicha activación ocurre

en etapas muy tempranas, previas a la aparición de estructuras patológicas, aun así, no es suficiente para frenar el desarrollo de la patología. El estrés oxidativo, juega un papel clave en el inicio y desarrollo de la enfermedad, su relación con la patología vascular asociada a la EA, otra de las alteraciones iniciales en la EA, se estudiará en el siguiente capítulo.

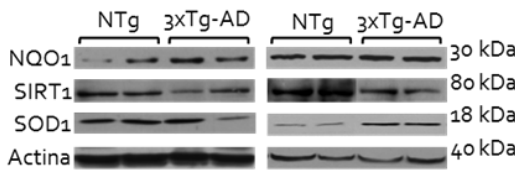
A 2 meses



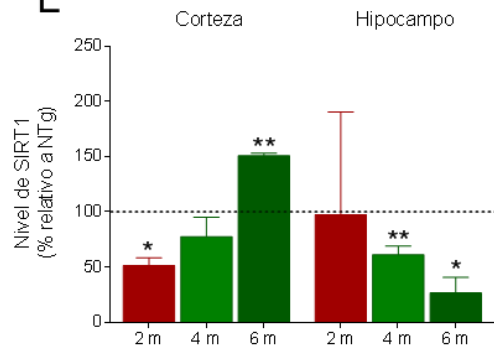
D



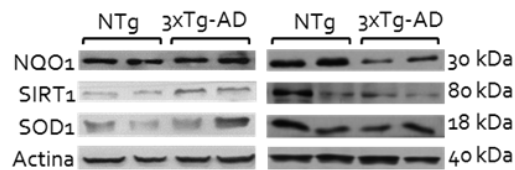
B 4 meses



E



C 6 meses



F

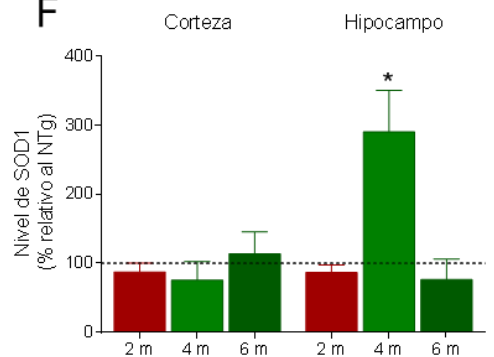


Figura 1.1. Western blot de NQO1, SIRT1 & SOD1 en neocorteza e hipocampo de ratones 3xTg-AD. Wb representativos de NQO1, SIRT1 y SOD1 en neocorteza (dcha.) e hipocampo (izq.) de ratones NTg y 3xTg-AD a 2 (A), 4 (B) y 6 meses (C). La actina se utilizó como control interno. Los análisis densitométricos de NQO1 (D), SIRT1 (E), SOD1 (F) mostraron diferencias significativas en ratones 3xTg-AD comparado con NTg (línea de puntos) en corteza e hipocampo. Los resultados son la media ± SEM (n=4). *p<0.05, **p<0.01.

Capítulo II. El Coenzima Q10 protege a células endoteliales humanas del daño inducido por β -amiloide y el estrés oxidativo

Los síntomas neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer se empiezan a observar en etapas avanzadas, cuando el daño neuronal ya ha aparecido y es irreversible (Cummings 2004). Conocer qué ocurre en etapas previas a la aparición del daño puede ser crucial para proponer nuevos abordajes terapéuticos. Estudios previos han demostrado como en etapas tempranas (fase prodrómica) de la enfermedad, el péptido β -amiloide (β A) daña la microvasculatura cerebral (Park, Anrather et al. 2004). Este daño ocurre a través de mecanismos que incluyen el incremento en los niveles de ROS y calcio. Estos niveles aumentados inducen necrosis y apoptosis en las células endoteliales, iniciando la disfunción cerebrovascular (Park, Anrather et al. 2004).

El objetivo de este capítulo es estudiar, *in vitro*, el potencial efecto citoprotector del antioxidante lipofílico Coenzima Q10 frente al daño inducido por el β A₂₅₋₃₅ en células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVECs). Estos resultados han sido publicados en la revista *Plos One* (Duran-Prado, Frontinan et al. 2014).

El CoQ10 previene la muerte endotelial inducida por el β -amiloide y restaura la migración y la angiogénesis *in vitro*

Estudios previos han demostrado como la exposición al fragmento β A₂₅₋₃₅ produce una toxicidad similar en células endoteliales a la que genera el β A₁₋₄₂, induciendo apoptosis y necrosis (Suo, Fang et al. 1997). En nuestros experimentos se ha analizado el efecto del fragmento β A₂₅₋₃₅ sobre la muerte celular y el posible efecto citoprotector del CoQ10. La adición de β A₂₅₋₃₅ 5 μ M durante 24h a HUVECs incrementó el porcentaje de núcleos apoptóticos de un 0,5% a un 2,6% (Figura 2.1 A) y el porcentaje de células Anexina V positivas de un 2,7% a 4,2% (Figura 2.1 B), indicando un discreto, pero significativo ($p < 0.05$) aumento en la apoptosis. Una pre-incubación de 12 horas con CoQ10 produjo un descenso dosis-dependiente del número de núcleos apoptóticos, alcanzando niveles similares al control con una concentración de CoQ10 5 μ M (Figura 2.1 A), lo cual se confirmó mediante citometría de flujo por determinación de Anexina V (Figura 2.1 B). Se observó un efecto citoprotector del CoQ10 al pretratar las células antes de la adición del β A₂₅₋₃₅. El tratamiento simultáneo de CoQ10 y β A₂₅₋₃₅ no afectó al porcentaje de células apoptóticas (resultados no mostrados, [enlace](#)). Por otra parte, el tratamiento de β A₂₅₋₃₅ 5 μ M indujo un descenso del 18% en la viabilidad celular, acompañado de un incremento similar en la necrosis (Figura 2.1 C). El pre-tratamiento con CoQ restauró la viabilidad a niveles similares al control, previniendo la necrosis celular (Figura 2.1 C).

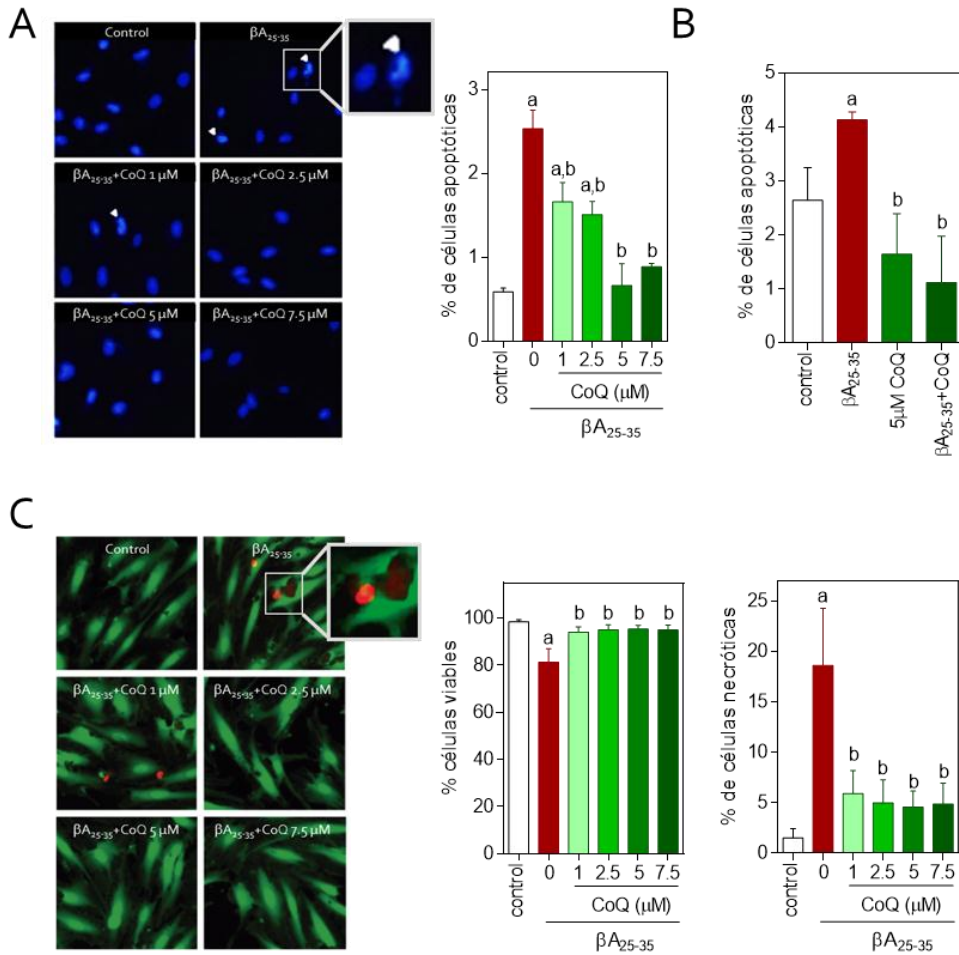


Figura 2.1. El CoQ10 protege células endoteliales de la apoptosis y necrosis inducida por el βA . La apoptosis (A) se determinó por tinción con DAPI y análisis morfológico de núcleos. Las flechas blancas indican un núcleo apoptótico típico. Los resultados se muestran como porcentaje de núcleos apoptóticos frente al total (300 células/tratamiento, n=3). La apoptosis se cuantificó también por citometría de flujo (B). Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas para Anexina V vs. total (n=3). Viabilidad y necrosis (C, izquierda y derecha, respectivamente) se determinaron por co-tinción celular con calceínaAM (verde) y bromuro de etidio (rojo) y análisis cualitativo mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados aparecen expresados como porcentaje de células viables/necróticas vs. Total (n=3). Los resultados son la media \pm SEM a, $p < 0.05$ vs. Control; b, $p < 0.05$ vs. βA_{25-35} .

El βA daña la microvasculatura cerebral y compromete el suministro de nutrientes e intercambio gaseoso en etapas tempranas de la EA (Marchesi 2011). A consecuencia, se incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Biron, Dickstein et al. 2011), lo cual refuerza el concepto de una degeneración endotelial en estas etapas. Existen también, evidencias de que el βA inhibe la neovascularización *in vitro* (Folin, Baiguera et al. 2005, Patel, Quadros et al. 2008).

Según estas evidencias, el siguiente paso fue analizar el efecto del CoQ10 sobre la alteración de procesos angiogénicos y migración celular, *in vitro*, en respuesta al péptido β A. Mediante ensayos de reparación de herida se observó que la adición de β A reducía en un 50% la motilidad de las HUVECs respecto a condiciones control (Figura 2.2 A). Se obtuvieron resultados similares en la cuantificación de células con lamelipodia (células motiles y polarizadas) (Figura 2.2 B). El pretratamiento con CoQ10 revirtió por completo el efecto de β A sobre la migración de HUVECs en todas las dosis probadas (Figura 2.2 A, B). De forma similar, el β A redujo en un 60% la capacidad de las HUVECs de formar tubos similares a los capilares (Figura 2.2 C). Este efecto fue prevenido por el pretratamiento del CoQ10 de forma dosis-dependiente (Figura 2.2 C).

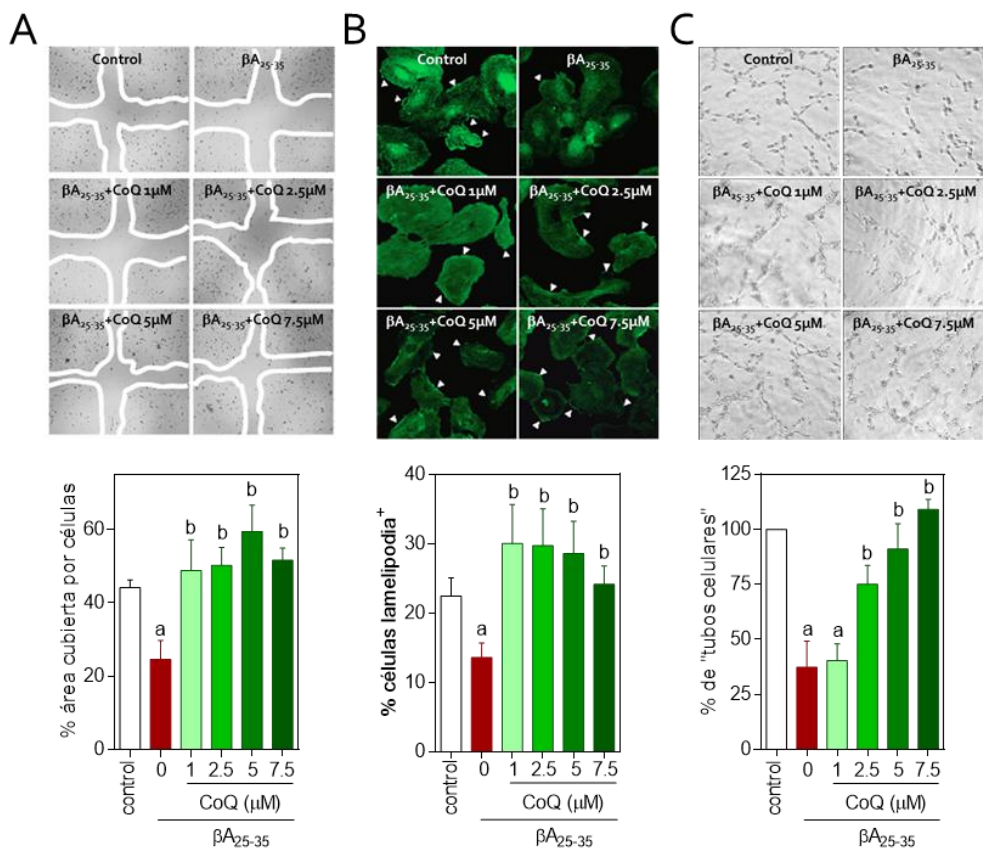


Figura 2.2. El CoQ10 bloquea la inhibición por β A de la migración celular y angiogénesis *in vitro* en HUVECs. La migración celular (A) se evaluó mediante un ensayo de reparación de herida. Los resultados muestran el porcentaje de área ocupada tras 12 h. Se identificaron las células motiles mediante inmunotinción frente a actina (B). Los resultados se expresan como % de células lamelipodia+ (Flechas blancas). La angiogénesis *in vitro* se determinó cuantificando la formación de tubos (C). Se muestra el porcentaje de tubos formados vs. control 6h tras los tratamientos. Los resultados son la media \pm SEM. N=3. a, $p < 0.05$ vs. Control; b, $p < 0.05$ vs. βA_{25-35} .

El CoQ10 previene el incremento de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y Ca^{2+} dependiente de βA en HUVECs

El efecto deletéreo del βA en células endoteliales es debido a un incremento en los niveles $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y a la alteración en la homeostasis del calcio (Suo, Fang et al. 1997, Iadecola 2004, Mattson 2004). Nuestros resultados mostraron que la administración de βA_{25-35} 5 μM a HUVECs, incrementó los niveles de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en 3 y 2 veces, respectivamente, frente a células control (Figura 2.3 A, B). El tratamiento solo de CoQ no afectó los niveles de ROS y Ca^{2+} libre citosólico. Sin embargo, el pre-tratamiento con CoQ redujo el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ a todas las dosis probadas, con niveles similares al control con dosis de 5 y 7,5 μM (Figura 2.3 A). De forma similar, el incremento en los niveles de H_2O_2 por acción de βA se vio reducido con el pre-tratamiento de CoQ 5 μM (Figura 2.3 B). De forma paralela, se evaluó el efecto del pretratamiento de CoQ sobre el daño inducido por el βA en la homeostasis del Ca^{2+} . La administración de βA_{25-35} 5 μM produjo a tres horas un incremento del 75% en los niveles de Ca^{2+} comparado con el nivel basal (Figura 2.4 A). El pre-tratamiento con CoQ10 redujo este incremento de Ca^{2+} a todas las dosis probadas (Figura 2.4 A). El tratamiento simultáneo de βA_{25-35} 5 μM y CoQ10 produjo un incremento similar en los niveles de Ca^{2+} , al tratamiento con βA_{25-35} 5 μM , indicando que el CoQ10 debe ser incorporado previamente a la célula para impedir la acción deletérea del βA .

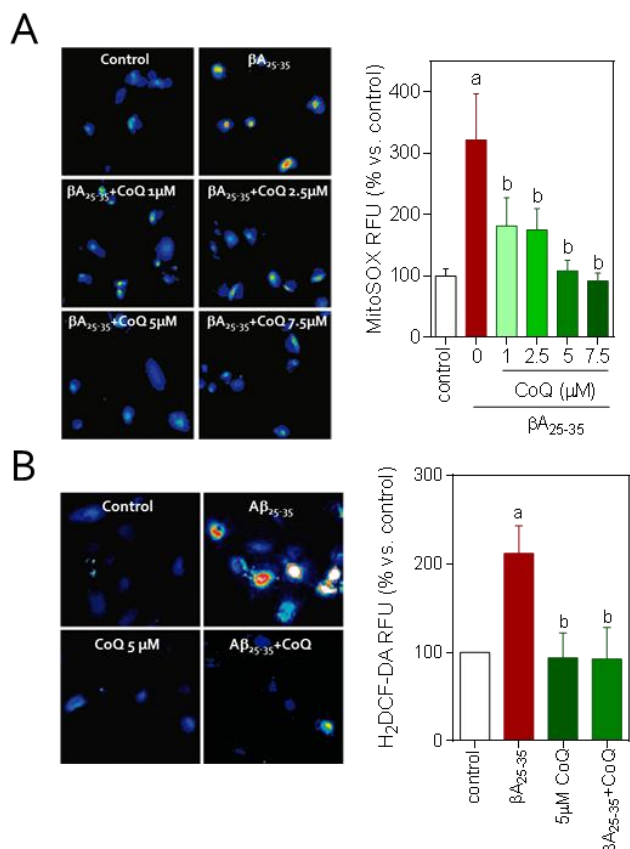


Figura 2.3. El CoQ10 previene el incremento en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 en HUVECs mediado por βA . Las HUVECs se incubaron durante 12h con concentraciones crecientes de CoQ10 y tratadas con βA_{25-35} 5 μM . Los niveles de $O_2^{\cdot -}$ se midieron por microscopía utilizando la sonda MitoSOX (A). Los niveles de H_2O_2 se midieron por microscopía utilizando la sonda $H_2DCF-DA$ (B). Los resultados se muestran como el porcentaje de variación de fluorescencia vs. Control (n=4). Las gráficas indican la media \pm SEM. a, $p < 0.05$ vs. Control; b, $p < 0.05$ vs. βA_{25-35} .

El CoQ10 previene la entrada de Ca^{2+} extracelular inducida por el βA en células HUVECs

Aunque el incremento en los niveles de Ca^{2+} mediado por βA está bien documentado (Suo, Fang et al. 1997, Bhatia, Lin et al. 2000), hay muy pocos estudios sobre la cinética de este segundo mensajero. Por tanto, se planteó un abordaje en tiempo real para estudiar el efecto del βA en células control y células pre-tratadas con CoQ10. Esta metodología reveló que la adición de βA_{25-35} 5 μM a HUVECs inducía un rápido incremento del Ca^{2+} desde el medio extracelular alcanzando un máximo 5 minutos tras la administración del péptido (Figura 2.4 B izq., línea verde). Este incremento de Ca^{2+} desaparecía cuando las células se incubaron en medio libre de Ca^{2+} (Figura 2.4 B izq., línea roja). Cabe destacar, que la entrada de Ca^{2+} inducida por el βA_{25-35} se previno completamente tras el pre-tratamiento con CoQ10 5 μM (Figura 2.4 B dcha.).

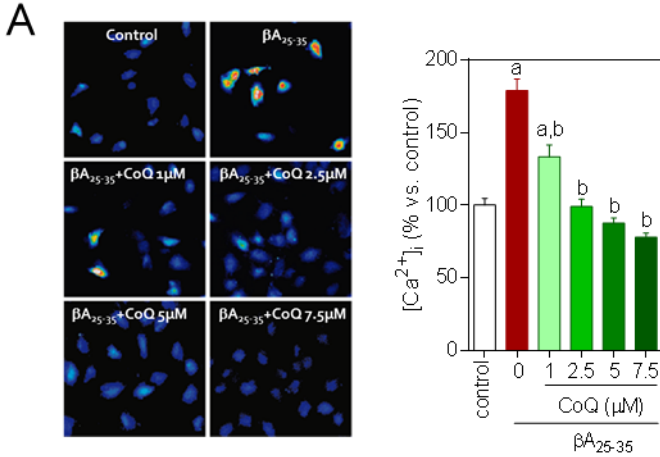
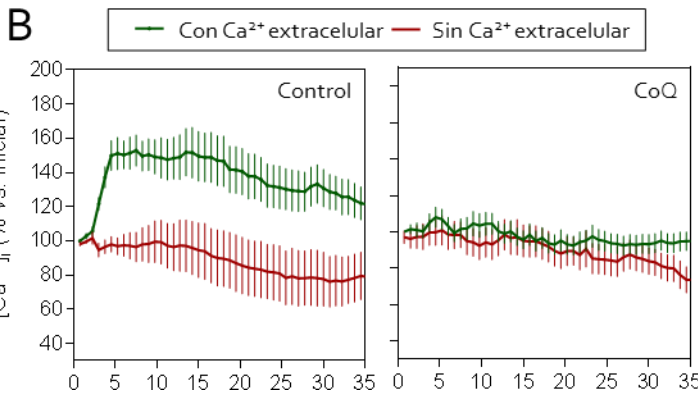


Figura 2.4. El CoQ bloquea la entrada de Ca²⁺ inducida por el βA en HUVECs. Las células fueron incubadas durante 12 h con vehículo (control) o CoQ y tratadas con βA₂₅₋₃₅ 5 μM. El nivel de Ca²⁺ se determinó por microscopía de fluorescencia utilizando la sonda Fluo4-AM. El Ca²⁺ se cuantificó tras 3 h de tratamiento con βA₂₅₋₃₅ en células pre-tratadas con CoQ (A). Los resultados muestran el % de variación de fluorescencia vs. Control (n=4) a, p<0.05 vs. Control; b, p<0.05 vs. βA₂₅₋₃₅. Los cambios en los niveles de Ca²⁺ (B) se monitorizaron por *microscopía en célula viva* cada 30 segundos en células control (B dcha.) o CoQ (B izq.), en presencia (línea verde) o ausencia de Ca²⁺ (línea roja) extracelular. El βA₂₅₋₃₅ se añadió en el minuto 1. Los resultados muestran la media del % de la variación de fluorescencia vs línea base antes de la adición de βA₂₅₋₃₅ (n=3).



El efecto citotóxico del βA en HUVECs no es prevenido por los antioxidantes tempol y α-tocoferol

Con el fin de determinar si el efecto protector del CoQ10 era por sus propiedades antioxidantes, se replicaron los ensayos de muerte celular y niveles de Ca²⁺ y O₂⁻ en HUVECs tratadas con βA₂₅₋₃₅ y pretratadas con los antioxidantes tempol y α-tocoferol. La pre-incubación con 1 mM de tempol o 100 μM de α-tocoferol no inhibió la apoptosis inducida por el péptido βA₂₅₋₃₅ (Figura 2.5 A), mientras que solo el tempol inhibió discretamente los niveles de necrosis sin alcanzar niveles control (Figura 2.5 B). La pre-incubación con estos compuestos no restauró los niveles de Ca²⁺ ni de O₂⁻, observándose solo una reducción parcial en el caso del tempol (Figura 2.5 C, D).

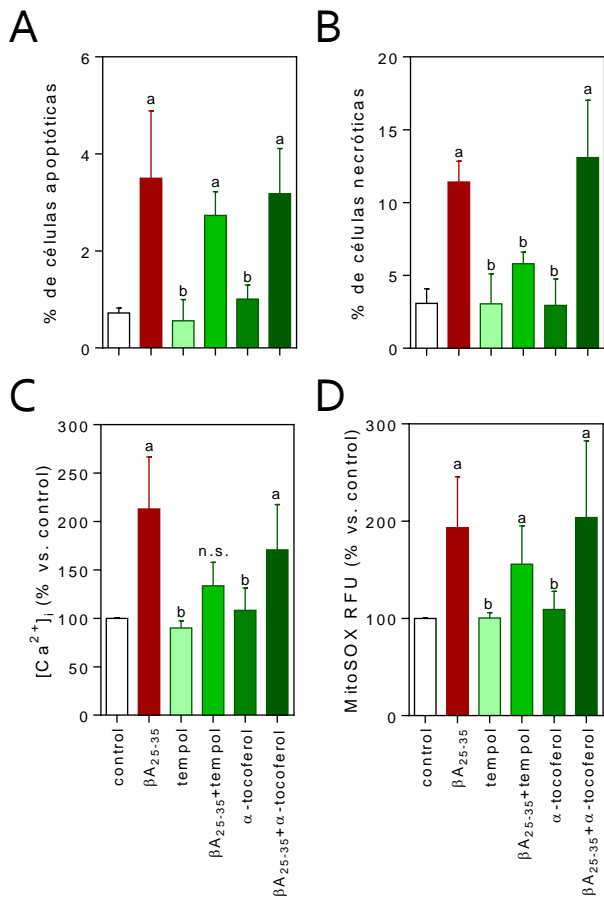


Figura 2.5. Efecto del tempol y el α -tocoferol sobre la apoptosis, liberación de Ca^{2+} y $O_2^{\cdot -}$ inducidos por el βA . Las HUVECs se incubaron durante 12h con 1mM de tempol o 100 μ M de α -tocoferol y después fueron tratadas otras 3-24h (para calcio y apoptosis/necrosis, respectivamente) con βA_{25-35} . La apoptosis se determinó por tinción de núcleos con DAPI y análisis morfológico (A). Los resultados aparecen expresados como % de núcleos apoptóticos vs. Total (300 cél./tratamiento n=3). La necrosis se determinó por tinción con bromuro de etidio en células vivas y se evaluó por microscopía de fluorescencia (B). Los resultados aparecen expresados como % de células necróticas vs. Total (n=3). El nivel de Ca^{2+} libre citosólico se determinó mediante fluorescencia con la sonda Fluo4-AM (C). El $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial se determinó por fluorescencia utilizando la sonda MitoSOX (D). Los resultados aparecen como el % de variación de fluorescencia vs. Control (n=4). Las gráficas indican la media \pm SEM. a, $p < 0.05$ vs. Control; b, $p < 0.05$ vs. βA_{25-35} .

El CoQ10 impide el descenso de NO provocado por βA en HUVECs

Los niveles de NO disminuyen en condiciones de estrés oxidativo, debido a su capacidad de reaccionar con el $O_2^{\cdot -}$ y formar peroxinitrito, que genera un daño oxidativo y nitrosilativo sobre las células endoteliales (Iadecola 2004). Nuestros resultados obtenidos mediante el método de Griess, mostraron como tras tratar HUVECs durante 24h con βA_{25-35} descendió la producción de NO en un 35% respecto a condiciones control. El pretratamiento con CoQ 5 μ M restauró los niveles NO (Figura 2.6), en línea con los resultados obtenidos previamente para los niveles de $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 .

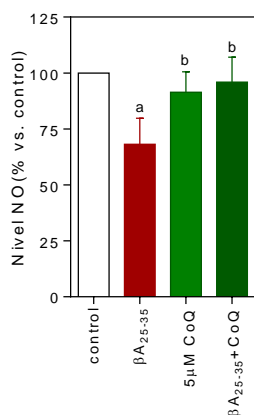


Figura 2.6. El descenso de NO es parcialmente bloqueado por el pretratamiento con CoQ10. Las HUVECs fueron incubadas durante 12h con vehiculo (control) o CoQ 5 μM y después tratadas con βA_{25-35} durante 24h. Los niveles de NO se determinaron de forma indirecta mediante el método de Griess. Los resultados se muestran como porcentaje de NO vs. Control (n=4). Los resultados se expresan como media \pm SEM a, p<0.05 vs. Control; b, p<0.05 vs. βA_{25-35} .

El CoQ10 previene la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial inducida por parte del βA en HUVECs

El incremento de Ca^{2+} , O_2^- y H_2O_2 mediado por βA está relacionado con la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), el cual libera contenido mitocondrial al citosol. Entre las moléculas liberadas desde el espacio intermembranas, se encuentra el citocromo c, que inicia el ensamblaje del apoptosoma y la muerte celular por apoptosis. Puesto que el CoQ10 inhibe la formación del PTPm en neuronas (Li, Zou et al. 2005, Belliere, Devun et al. 2012), se planteó que este podría ser el mecanismo por el que el antioxidante bloqueaba algunos de los efectos deletéreos inducidos por βA en HUVECs. Se evaluó el estado del PTPm mediante diferentes estrategias.

En primer lugar se analizó el efecto del βA_{25-35} 5 μM sobre el nivel de señal de la sonda MitoTracker, que en su variante *DeepRed* es sensible a potencial de membrana mitocondrial. El marcaje con esta sonda indicó una reducción del 25% de la señal tras 24h de tratamiento con βA_{25-35} 5 μM (Figura 2.7 A, resultados adicionales, [enlace](#)), indicativo de un cambio en el potencial de membrana mitocondrial. En segundo lugar, se evaluó el efecto del péptido βA sobre el nivel de Ca^{2+} de mitocondrial. El tratamiento de 3h con βA_{25-35} 5 μM fue acompañado con un descenso significativo (p<0.05) en los niveles de Ca^{2+} mitocondrial (Figura 2.7 B, C) apoyando la alteración de la permeabilidad mitocondrial. Tanto la señal de MitoTracker como los niveles de Ca^{2+} mitocondrial se mantuvieron inalterados en HUVECs pre-tratadas con CoQ 5 μM (Figura 2.7 A, B, C). Por otra parte, la apertura del PTPm se evaluó mediante la cuantificación del nivel de citocromo c liberado al citosol. La adición de βA_{25-35} 5 μM a HUVECs aumentó la liberación de citocromo c al citosol (Figura 2.7 D; resultados adicionales [enlace](#)). La liberación de citocromo c fue contrarrestada por el tratamiento con CoQ 5 μM (Figura 2.7 D; resultados adicionales [enlace](#)).

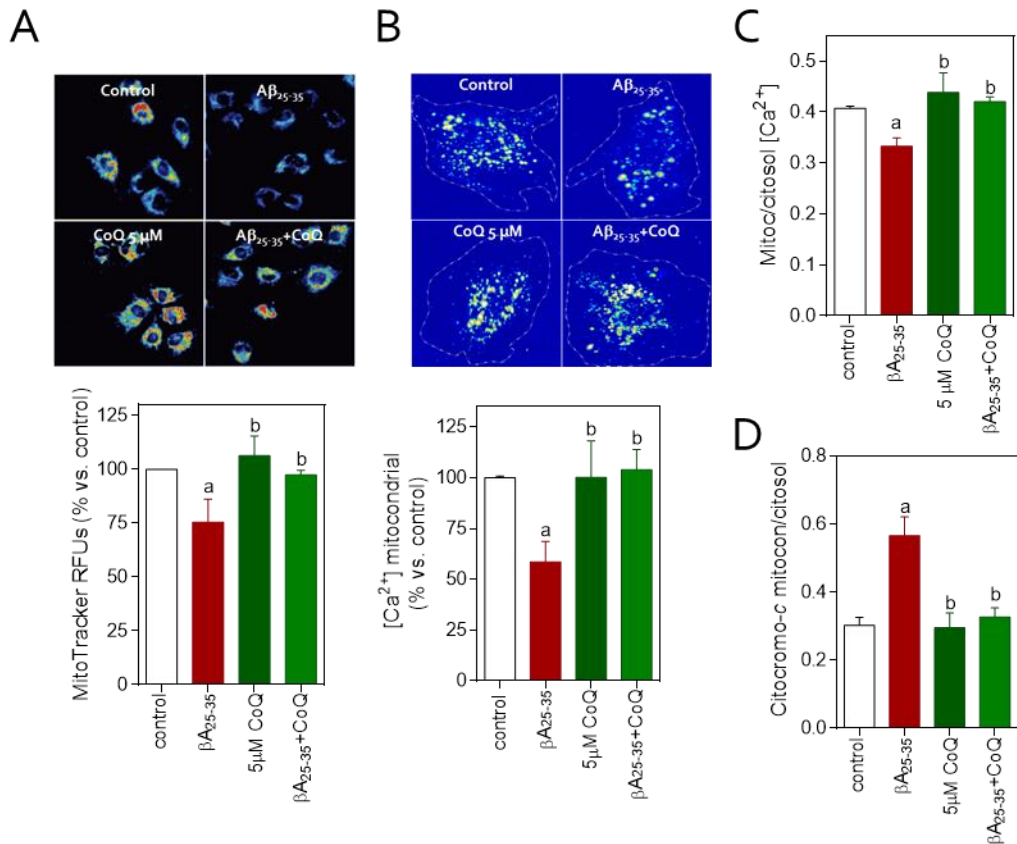


Figura 2.7. El CoQ10 impide la apertura del PTPm inducida por el βA . Las HUVECs se incubaron durante 12h con CoQ y después fueron tratadas otras 3-24h con βA_{25-35} . El efecto del tratamiento sobre la apertura del PTPm se cuantificó indirectamente cuantificando la intensidad de señal fluorescente de MitoTracker, el nivel de Ca^{2+} mitocondrial y la liberación de citocromo c. Tras el tratamiento con βA_{25-35} 5 μM las HUVECs fueron incubadas con MitoTracker (A), calceína y $CoCl_2$ (B) y MitoTracker más Fluo-4 (C). La intensidad de fluorescencia de cada ensayo se realizó con un microscopio de fluorescencia en células vivas (n=3/4). El Ca^{2+} mitocondrial se calculó mediante el bloqueo de la señal de la calceína citosólica con $CoCl_2$ (B) y por la colocalización de Fluo-4 y MitoTracker (C), las imágenes se procesaron con ImageJ. Las células fueron incubadas con MitoTracker e inmunoteñidas con un anticuerpo frente a citocromo c (D). La cantidad de citocromo c citosólico se calculó por colocalización mediante el procesamiento de las imágenes con ImageJ (n=3). Los resultados se muestran como el porcentaje de unidades relativas de fluorescencia (RFUs) vs. Control o como el ratio citosol/mitocondrial de RFUs de Fluo-4 o citocromo c. Los resultados son la media \pm SEM a, $p < 0.05$ vs. Control; b, $p < 0.05$ vs. βA_{25-35} .

El CoQ10 reduce la entrada y acumulación de βA en mitocondrias en HUVECs

Posteriormente se evaluó el efecto del CoQ10 en la incorporación del βA_{25-35} en HUVECs y su distribución subcelular. Dicho estudio se llevó a cabo mediante dos ensayos, con microscopía de epifluorescencia y confocal en células vivas. Los resultados mostraron como al añadir el βA_{25-35} fluorescente a las HUVECs, este comenzó a incorporarse a las células sobrepasando un umbral tras 15 m en células control, alcanzando un máximo a los 40 minutos (Figura 2.8, línea roja). El pre-tratamiento con CoQ 5 μ M retrasó en 10 minutos la incorporación, reduciendo además en un 60% la señal máxima respecto a células control (Figura 2.8, línea verde).

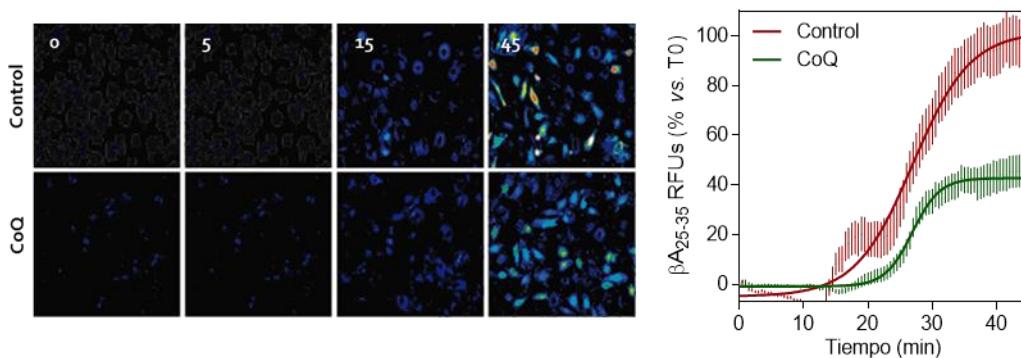


Figura 2.8. El CoQ10 retrasa y reduce la incorporación de βA en HUVECs. Las células se incubaron durante 12h con CoQ 5 μ M. Los cambios en la intensidad de βA_{25-35} fluorescente se monitorizaron por microscopía de epifluorescencia cada 30 segundos en células pre-tratadas con vehículo (control) y CoQ. El péptido fluorescente (5 μ M) fue añadido en el minuto 1. Las imágenes muestran la variación de señal en distintos tiempos desde 0 a 45 minutos. La gráfica muestra el promedio de la dinámica de la señal fluorescente (RFUs normalizadas) (n=3).

Estos resultados se complementaron mediante ensayos de microscopía confocal. Para esta estrategia, las células se marcaron con MitoTracker Deep Red y se administró el péptido βA_{25-35} fluorescente. Se adquirieron imágenes del βA_{25-35} fluorescente (verde) y mitocondrias (rojo) a 5, 10, 20 y 40 min tras la adición del péptido. En primer lugar, se observó una reducción del 45% en el nivel de fluorescencia del βA_{25-35} en HUVECs pre-tratadas con CoQ10 vs. células control, a 20 y 40 minutos tras la administración del péptido (Figura 2.9, gráfica arriba). El pretratamiento con CoQ10 no solo redujo el nivel total de βA_{25-35} incorporado a la célula, como se observó previamente mediante epifluorescencia, sino que además disminuyó drásticamente su acumulación en la mitocondria y en menor medida, en el citosol (Figura 10, gráfica central y abajo). De forma llamativa, la señal del βA fluorescente en mitocondria era significativamente inferior ($p < 0.05$) en células pretratadas con CoQ10 que en las tratadas con vehículo desde tiempos muy cortos (5 min) hasta el tiempo final (Figura 2.9, gráfica abajo). Las imágenes de

microscopía confocal de la figura 9 ilustran células representativas marcadas con MitoTracker Deep Red e incubadas durante 40 minutos con βA fluorescente.

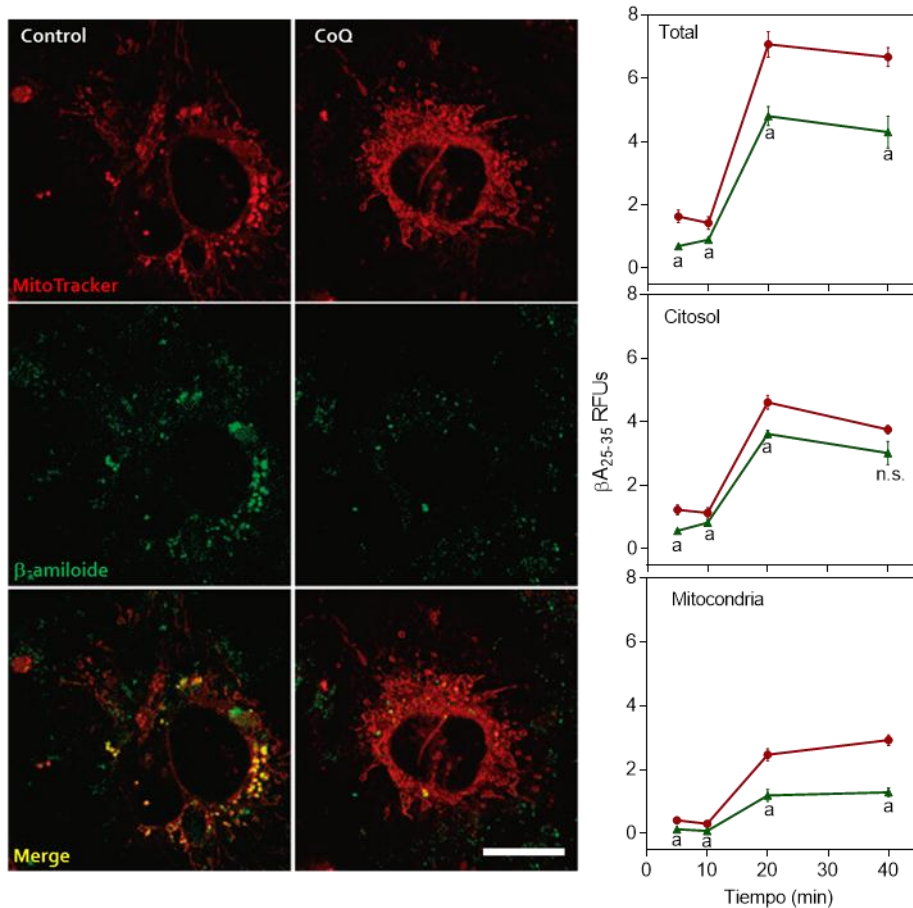


Figura 2.9. El CoQ10 disminuye la incorporación de βA en mitocondrias de HUVECs. Las células se incubaron durante 12h con vehículo (control) o CoQ 5 μ M. Se marcaron con MitoTracker Deep Red (rojo) y se añadió βA_{25-35} 5 μ M conjugado con *HyLite Fluor* (verde). Las imágenes se adquirieron a 5, 10, 20 y 40 min mediante microscopía confocal en células vivas. Se muestra el marcaje con MitoTracker, con βA_{25-35} fluorescente y la combinación de ambos marcajes, en células control (izq.) y células tratadas con CoQ (dcha.). La colocalización y cuantificación se realizó con el programa ImageJ. Las gráficas muestran las RFUs vs. tiempo del marcaje de βA_{25-35} fluorescente en toda la célula (gráfica superior), citosol (gráfica medio) y mitocondria (gráfica inferior), en controles (línea roja) y células tratadas con CoQ (línea verde). N=3. Los resultados son la media \pm SEM, a, $p < 0.05$ vs. Control

En conjunto, estos resultados demuestran que el CoQ10 retrasa y reduce la entrada de βA en HUVECs y disminuye su tráfico e incorporación a mitocondria.

Capítulo III. El CoQ10 reduce el depósito de placas de β A, la hipoxia y el grosor de la lámina basal de la microvasculatura cerebral en ratones 3xTg-AD

La microvasculatura cerebral presenta una gran variedad de alteraciones funcionales y estructurales, tanto en modelos murinos (Refolo, Malester et al. 2000) como en pacientes (Hayden, Zandi et al. 2006). El β A circulante daña el endotelio de la vasculatura cerebral en etapas asintomáticas de la EA que preceden a la deposición β A en el parénquima cerebral. Se altera el grosor de la lámina basal de la microvasculatura debido a un aumento en el depósito de colágeno IV (Kalaria and Pax 1995), alterando el intercambio de gases, nutrientes y la eliminación de desechos.

Para el estudio *in vivo* se establecieron cuatro grupos de animales: no transgénicos con dieta estándar (NTg), 3xTg-AD con dieta estándar (St), 3xTg-AD con dieta vehículo (Vh) y 3xTg-AD con dieta ubiquinol (Ub; forma reducida del CoQ10). Se alimentaron con las diferentes dietas desde los 2,5 hasta los 12 meses, tras lo cual fueron sacrificados previa extracción de muestras de sangre. Los tejidos se extrajeron y procesaron para poder realizar estudios de inmunohistoquímica, como se indica en el apartado "Experimentos *in vivo*" de "Material y Métodos" y en el Anexo I.

Los ratones 3xTg-AD alimentados con dieta suplementada con ubiquinol mostraron niveles incrementados de CoQ10 en plasma

Los niveles de CoQ10 y CoQ9 en plasma de ratones 3xTg-AD y NTg se cuantificaron mediante HPLC. Se utilizó un test *Mann-Whitney* para determinar la diferencia entre sexos y no se observó diferencia significativa por lo que los datos que se obtuvieron para ambos sexos se agruparon para su análisis estadístico. Se observó que los ratones tratados con Ubiquinol (CoQ) estabilizado en "Kaneka QHP30 powder" (Ub), mostraban un incremento significativo ($p < 0.001$) en los niveles plasmáticos de CoQ10 (Figura 3.1 A). Aunque en algunos casos se observó niveles bajos en los niveles de CoQ9, la dieta suplementada no modificó significativamente la concentración comparado con los ratones tratados con dieta estándar (Figura 3.1 B).

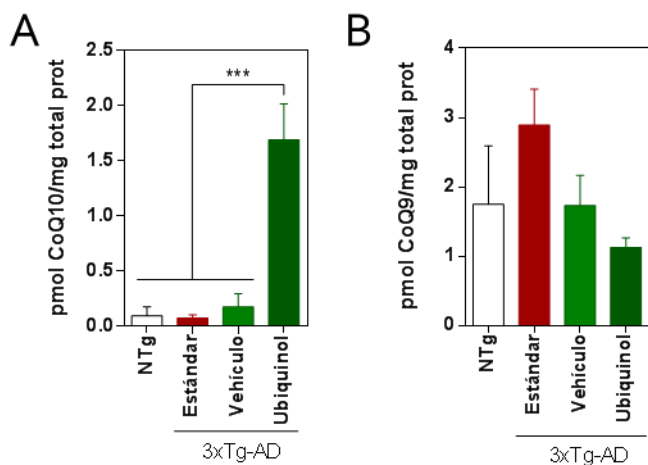


Figura 3.1. El suplemento con ubiquinol incrementa los niveles plasmáticos de CoQ10. Mediante HPLC se cuantificaron los niveles de CoQ10 (A) y de CoQ9 (B) en muestras de plasma de todos los animales de los diferentes grupos experimentales. Los resultados indican el promedio \pm SEM. $p < 0.001$.

El nivel de H₂O₂ desciende en los leucocitos de ratones 3xTg-AD alimentados con dieta suplementada con ubiquinol

La interacción entre los oligómeros de β A y Fe²⁺ o Cu⁺ genera H₂O₂ (Hardas, Sultana et al. 2013). Se ha determinado el estrés oxidativo en leucocitos de sangre periférica porque correlaciona con el estrés oxidativo observado en el parénquima cerebral en otras enfermedades neuropsiquiátricas como la ansiedad (Rammal, Bouayed et al. 2008), que también sufren los ratones 3xTg-AD desde estadios prodrómicos (Ver Anexo II). Tras la extracción de las muestras los leucocitos se separaron por centrifugación del plasma y eritrocitos y se incubaron con la sonda que se cuantificó por fluorimetría. Se utilizó un test *Mann-Whitney* para determinar la diferencia entre sexos y no se observó diferencia significativa por lo que los datos que se obtuvieron para ambos sexos se agruparon para su análisis estadístico. En primer lugar, se observó un incremento de 3,42 veces en los niveles de H₂O₂ en plasma de ratones transgénicos con dieta estándar (St) en comparación con ratones NTg (Figura 3.2). Comparando los niveles de H₂O₂ entre St y ratones con dieta vehículo (Vh) y Ub se observó un descenso significativo en los niveles de H₂O₂ en las muestras de los grupos Vh ($p < 0.05$) y Ub ($p < 0.01$) (Figura 3.2), alcanzando en el caso de Ub niveles muy similares a los de los NTg. Estos resultados indican que no sólo el Ub, sino que también y en menor medida el vehículo formulado por “Kaneka QH P30 powder” desciende los niveles de H₂O₂.

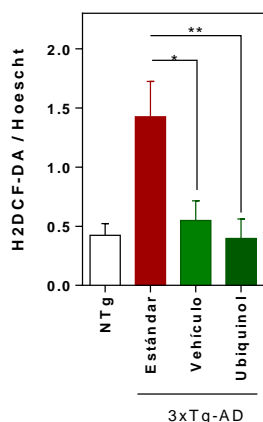


Figura 3.2. El nivel de H₂O₂ desciende en leucocitos de ratones 3xTg-AD alimentados con dieta suplementada con ubiquinol. Se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones y se separó el plasma y la fracción de leucocitos. Mediante el uso de la sonda H₂DCFDA se cuantificaron los niveles de H₂O₂ en muestras de leucocitos. Los resultados obtenidos se refirieron a la intensidad media de núcleos (Hoescht). Los resultados son la media ± SEM. *p<0.05; ** p<0.01.

Los parámetros de estrés oxidativo en plasma descienden en ratones 3xTg-AD alimentados con dieta suplementada con ubiquinol

Una vez estudiado el nivel de H₂O₂ en leucocitos, se analizaron marcadores de EO en plasma. Recientemente, en un artículo de revisión de Chang y colaboradores, se mostraban diferentes marcadores relacionados con el EO en pacientes en etapas distintas de la EA, destacando un incremento en la carbonilación de proteínas y en la peroxidación lipídica (Chang, Chang et al. 2014). En función de estas evidencias se abordó el efecto de las diferentes dietas sobre la peroxidación lipídica, cuantificando los niveles del malondialdehído (MDA), un producto final de este proceso. Los datos obtenidos mostraron un descenso significativo en animales alimentados con dieta suplementada con Ub (p<0.05) frente con ratones St, y un descenso no significativo en Vh, alcanzando ambos grupos niveles similares a los encontrados en los NTg (Figura 3.3 A). Por otra parte, no se observaron cambios significativos en los niveles de oxidación del LDL en ninguno de los grupos experimentales (Figura 3.3 B). Sin embargo, sí que se encontraron diferencias en el nivel de carbonilación de proteínas plasmáticas. De hecho, los resultados indicaron un descenso significativo la carbonilación en ratones alimentados con dietas suplementadas con Ub (p<0.01) y Vh (p<0.05) (Figura 3.3 C), siendo mayor el descenso en los ratones Ub. Se utilizó un test *Mann-Whitney* para determinar la diferencia entre sexos y no se observó diferencia significativa por lo que los datos que se obtuvieron para ambos sexos se agruparon para su análisis estadístico. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Raquel Santiago Mora.

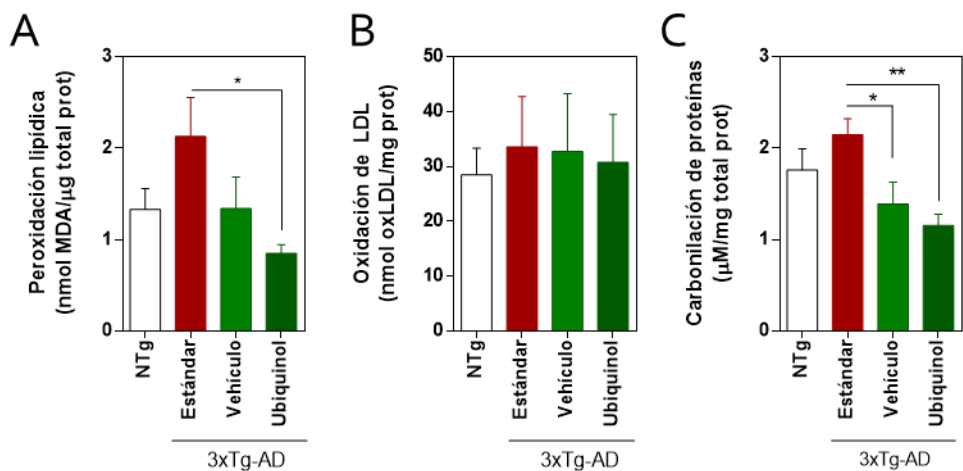


Figura 3.3. El ubiquinol reduce los niveles de marcadores de EO en plasma de ratones 3xTg-AD. Se extrajeron muestras de sangre de todos los ratones (machos y hembras) y se separó el plasma y la fracción de leucocitos. Mediante el uso de kits comerciales se determinaron en plasma los niveles de peroxidación lipídica (A), oxidación de LDL (B) y carbonilación de proteínas (C). Los resultados muestran el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

El modelo 3xTg-AD no presenta alteraciones en la permeabilidad de la vasculatura cerebral

Antes de ser sacrificados, se inyectó en los ratones *Evans blue*, vía intraperitoneal (4mg/kg). Este es un marcador de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Tras el sacrificio y procesado de las muestras, no se observó alteración de la barrera hematoencefálica en ninguno de los grupos de estudios, mediante este método, ni en los ratones NTg, ni en ratones 3xTg-AD. Estos resultados se correlacionan con estudios previos (Bourasset, Ouellet et al. 2009, Do, Alata et al. 2014).

El Ubiquinol reduce el grosor de la lámina basal de la microvasculatura cerebral en ratones 3xTg-AD

Una vez comprobada la alteración del nivel de EO en el modelo 3xTg-AD y que el Ub revertía parcialmente el daño, se estudió la alteración de la vasculatura cerebral en muestras de ratones tratados con las diferentes dietas. Se analizó el grosor de la lámina basal de la vasculatura de la fisura hipocámpal en ratones NTg y 3xTg-AD, región rica en vasculatura. Se utilizó un test *Mann-Whitney* para determinar la diferencia entre sexos y no se observó diferencia significativa por lo que los datos que se obtuvieron para ambos sexos se agruparon. Se cuantificó el grosor de la lámina mediante inmunohistoquímica frente a colágeno IV en 10 vasos por animal. Los resultados muestran un incremento en el grosor de la lámina basal, de más de

1 μM (47% de incremento) en ratones St comparado con NTg (Figura 3.4). Estos resultados son coincidentes con los que se han publicado recientemente en la microvasculatura de la corteza motora primaria y parietal con un incremento del 33% (Mehta, Short et al. 2013) y del 100% en los plexos coroideos de ratones de 16 meses (Gonzalez-Marrero, Gimenez-Llort et al. 2015). El engrosamiento de la lámina, disminuyó con la suplementación dietética un 13% (0,4 μM) en Vh y un 26% (0,9 μM) en el grupo Ub, que mostró un grosor solo el 9% mayor que en los animales NTg. La diferencia entre Ub y los otros dos grupos de animales transgénicos, St y Vh fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$) (Figura 3.4). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Francisco Sancho Bielsa.

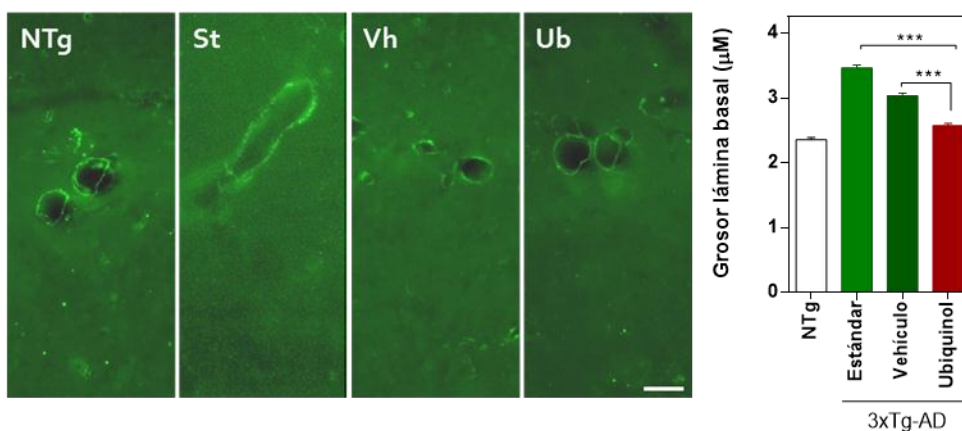


Figura 3.4. El ubiquinol disminuye el engrosamiento de la lámina basal en ratones 3xTg-AD. Se seleccionaron diferentes cortes por animal y se analizaron 10 vasos por animal de la fisura hipocámpal. Se realizó inmunohistoquímica frente a colágeno IV, el grosor se cuantificó con ImageJ. Los resultados son la media \pm SEM. *** $p < 0.001$. Escala = 50 μM .

El ubiquinol reduce la deposición de βA y la hipoxia en la región CA1 del hipocampo de hembras 3xTg-AD

En la mayoría de los modelos murinos la EA la deposición de placas de βA ocurre antes en hembras que en machos. En el modelo 3xTg-AD a la edad de 12 meses, las hembras muestran grandes placas de βA mientras que los machos muestran placas similares solo a los 15 meses (Hirata-Fukae, Li et al. 2008, Carroll, Rosario et al. 2010).

Se hizo un estudio completo en cortes seriados de 50 μM de grosor de las regiones comprendidas entre 1,7 y -4,16 de Bregma, y se vio que las hembras presentan una mayor cantidad de placas a lo largo de la región de estudio, especialmente en la

región CA₁, confirmando estudios previos (Hirata-Fukae, Li et al. 2008, Carroll, Rosario et al. 2010) (Figura 3.5).

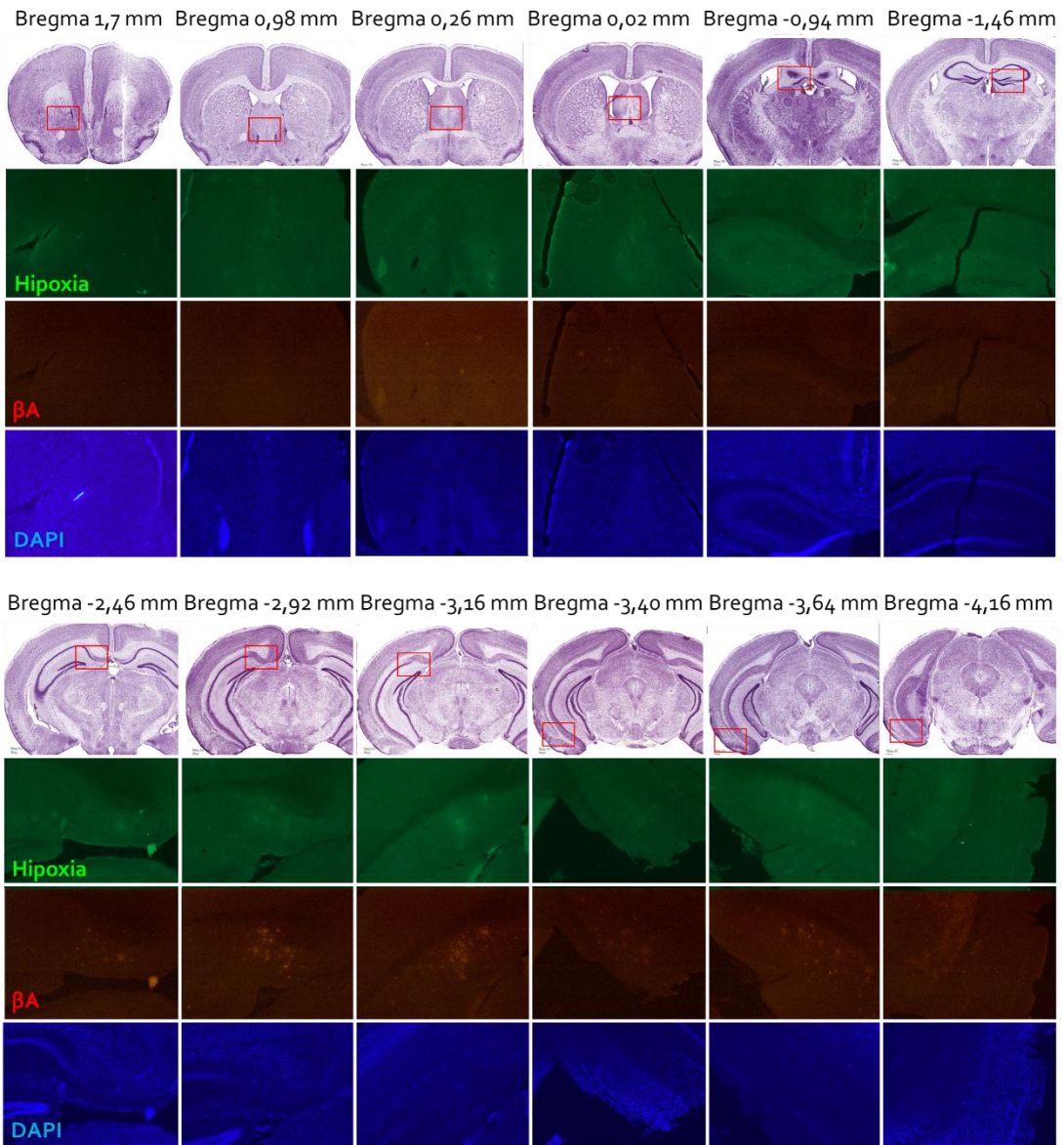


Figura 3.5. Distribución espacial de placas de β A y de hipoxia en cortes seriados de cerebro de ratón 3xTg-AD. Se seleccionaron cortes seriados de todo el cerebro para el estudio. Se realizó una inmunohistoquímica frente a β A (rojo) y pimonidazol (sonda de hipoxia; verde). Recuadrado en rojo aparece la región correspondiente de las imágenes de microscopía (Paxinos and Franklin, 2001). Se adquirieron imágenes a 4x.

Se estudió el número y extensión de las placas seniles y áreas hipóxicas en la región CA₁ de hipocampo y en corteza entorrinal. No se observaron placas seniles ni

regiones hipóxicas en los ratones NTg. Tras el análisis de los resultados se observó un número de placas de β A superior a 30 de media por campo en ratones St, descendiendo significativamente a 15 de media en ratones Vh y a 10 de media en ratones Ub (Figura 3.6 A). Aunque los resultados no mostraron diferencias significativas entre Ub y Vh, la reducción fue mayor en la dieta con Ub ($p < 0.01$) que en la observada en la dieta Vh ($p < 0.05$) (Figura 3.6 A). Además, el área media de las placas observado en el grupo St se redujo a la mitad en el grupo Vh ($p < 0.05$) y un 75% en el grupo Ub ($p < 0.01$). El área ocupada por las placas seniles en el grupo alimentado con la dieta Vh también fue significativamente mayor que en los animales suplementados con Ub ($p < 0.05$) (Figura 3.6 B).

El efecto del ubiquinol fue aún más potente cuando se consideran las zonas hipóxicas. Es de destacar que, en nuestro conocimiento, es la primera vez que se observa, en modelos murinos, la aparición de áreas hipóxicas en el hipocampo de ratones 3xTg-AD y que la hipoxia aparezca asociada a la deposición de placas de β A (Figura 3.6 C). El 60 % de la superficie las placas seniles en St mostró hipoxia (Figura 3.6 D), que se redujo al 40 % en la dieta Vh, pero en la dieta Ub la zona hipóxica sólo cubrió el 15 % de las placas seniles ($p < 0.001$). La reducción del área de hipoxia dentro de las placas seniles también fue significativa entre los grupos Vh y Ub ($p < 0.01$). Además, el área total de hipoxia cuantificado en el grupo St no se redujo significativamente en la dieta Vh (Figura 3.6 C), pero la zona hipóxica en la dieta Ub se redujo un 75 % ($p < 0.001$) y la reducción fue también estadísticamente significativamente entre Vh y Ub ($p < 0.01$).

Finalmente se analizó la correlación entre hipoxia y β A en todos los ratones de forma individual, con el fin de estudiar la dependencia entre ambos parámetros. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para cada grupo y se observó una correlación positiva para St (0,4185) y para Vh (0,3164) en el caso de las muestras de Ub el coeficiente obtenido fue muy cercano a 0 (0,002977) lo que implica que apenas hay correlación entre ambos parámetros en ratones Ub (Figura 3.6 E).

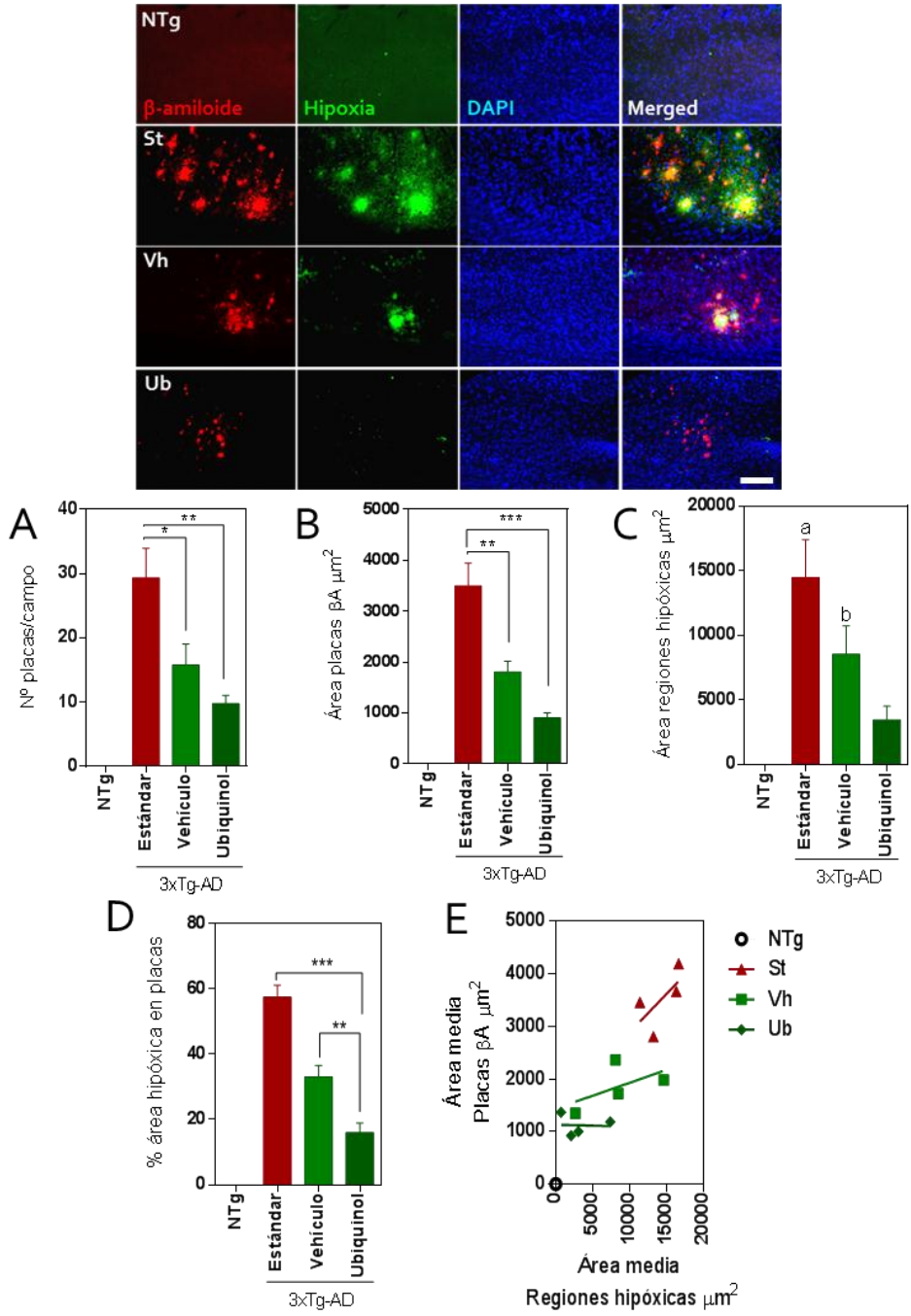


Figura 3.6. El ubiquinol reduce la deposición de placas de βA y la hipoxia en CA1 de ratones 3xTg-AD. Se realizó un análisis inmunohistoquímico frente a βA (rojo) y pimonidazol (sonda de hipoxia; verde). Se adquirieron 3 imágenes 10x en 2 cortes de cada animal. Se cuantificó el nº de placas (A), el área de placas (B), área hipóxica (C), el % hipóxica en placas (D) y la relación entre área de hipoxia y de placas por animal (E). Los resultados muestran el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. En D "a" $p < 0.001$ y "b" $p < 0.01$ comparado con Ub. Escala = 100 μm .

El ubiquinol reduce la deposición de β A y la hipoxia en la corteza entorrinal de hembras 3xTg-AD

Tras analizar el hipocampo, se estudió la deposición de placas y su relación con hipoxia en la corteza entorrinal, una de las estructuras más afectadas en este modelo a los 12 meses (Oddo, Caccamo et al. 2003). No se observaron placas seniles ni regiones hipóxicas en los ratones NTg. Tras el análisis de los resultados se observó un número de placas de β A cercano a 10 de media por campo en ratones St, descendiendo significativamente a 5 de media en ratones Vh y a 4 de media en ratones Ub ($p < 0.05$) (Figura 3.7 A). Además, el área media de las placas observado en el grupo St se redujo un 15% en el grupo Vh y un 50% en el grupo Ub, en este caso las diferencias no fueron significativas. El área ocupada por las placas seniles en el grupo alimentado con la dieta Vh también fue mayor que en los animales suplementados con Ub (Figura 3.7 B).

El efecto del ubiquinol fue aún más potente cuando al estudiar las zonas hipóxicas. Es de destacar que, en nuestro conocimiento, es la primera vez que se observa, en modelos murinos, la aparición de áreas hipóxicas en el corteza entorrinal de ratones 3xTg-AD y que la hipoxia aparece, al igual que en hipocampo, asociada a la deposición de placas de β A (Figura 3.7 C). Cerca del 40% de la superficie de las placas seniles en St mostró hipoxia (Figura 3.7 D), que se redujo al 20 % en la dieta Vh, pero en la dieta Ub la zona hipóxica sólo se cubrió el 15 % de las placas seniles ($p < 0.01$). La reducción del área de hipoxia dentro de las placas seniles también fue significativa entre los grupos Vh y Ub ($p < 0.05$). Además, el área total de hipoxia cuantificado en el grupo St se redujo significativamente en la dieta Vh y en la dieta Ub ($p < 0.001$) (Figura 3.6 C). En este caso no hubo diferencias significativas entre el grupo Vh y el Ub.

Finalmente se analizó la correlación entre hipoxia y β A en todos los ratones de forma individual, con el fin de estudiar la dependencia entre ambos parámetros. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para cada grupo y se observó una correlación positiva para Vh (0,6004) y para Ub (0,9013) en el caso de las muestras de St el coeficiente obtenido fue cercano a 0 (0,02941) lo que implica que apenas hay correlación entre ambos parámetros (Figura 3.7 E).

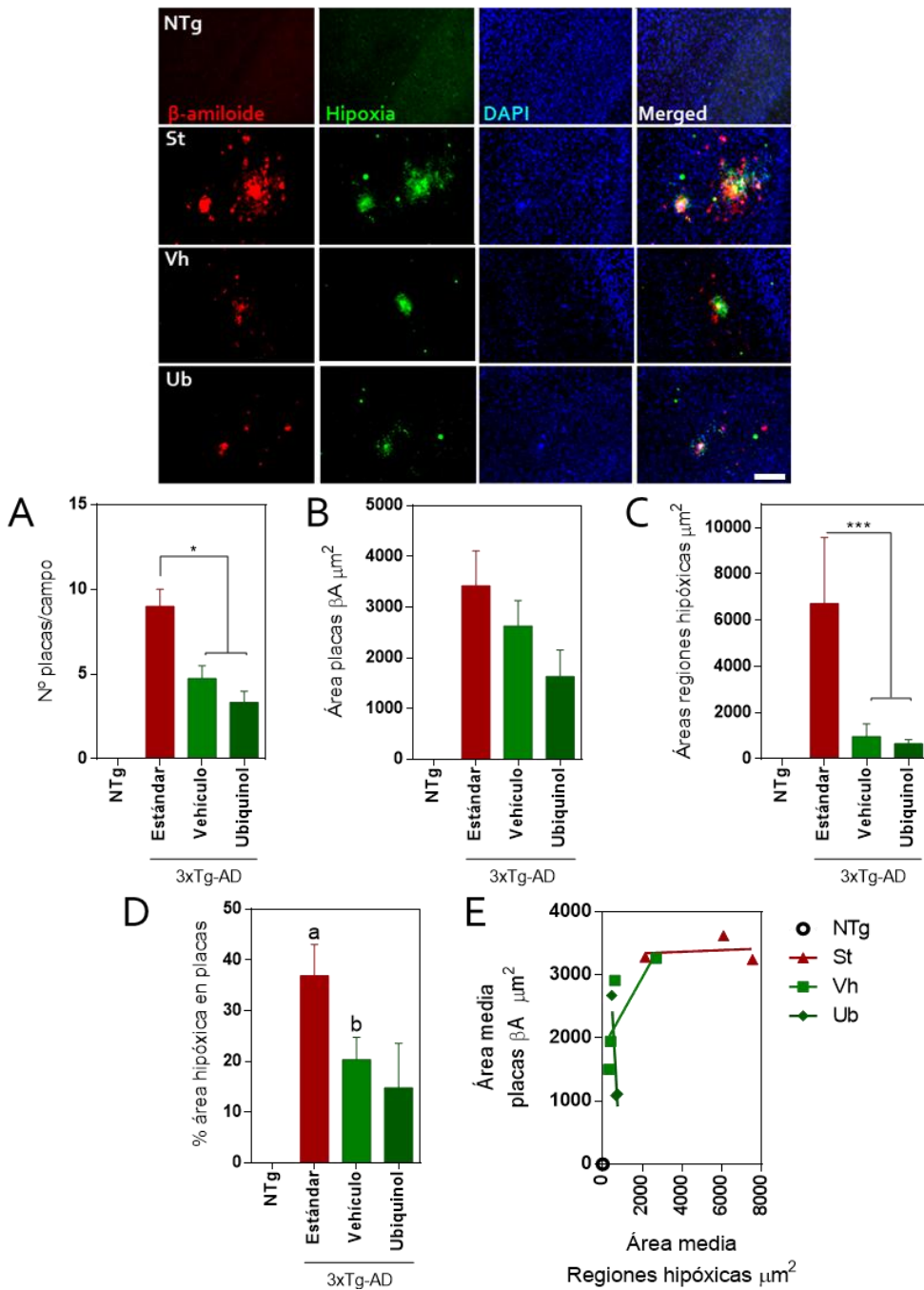


Figura 3.7. El ubiquinol reduce la deposición de placas de β A y la hipoxia en corteza entorrinal de ratones 3xTg-AD. Se realizó un análisis inmunohistoquímico frente a β A (rojo) y pimonidazol (sonda de hipoxia; verde). Se adquirieron 3 imágenes 10x en 2 cortes de cada animal. Se cuantificó el n° de placas (A), el área de placas (B), área hipóxica (C), el % hipóxica en placas (D) y la relación entre área de hipoxia y de placas por animal (E). Los resultados muestran el promedio \pm SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. En D "a" $p < 0.01$ y "b" $p < 0.05$ comparado con Ub. Escala = 100 μm .

El ubiquinol reduce el depósito de β A intracelular y de placas en machos 3xTg-AD

Los datos obtenidos en el presente trabajo confirman que la formación de las placas seniles es más tardía en los machos, como se ha descrito previamente (Hirata-Fukae, Li et al. 2008, Carroll, Rosario et al. 2010). No se observaron placas seniles ni regiones hipóxicas en los machos NTg y tampoco se observaron regiones hipóxicas en machos a los 12 meses de edad.

El número de placas observadas en machos era 10 veces menos abundantes y presentaban la mitad de tamaño que en hembras 3xTg-AD de la misma edad (Figura 3.8 A y B). El número de placas observado en el grupo St se redujo a la mitad en el grupo Vh ($p < 0.05$) y un 75% en el grupo Ub ($p < 0.01$). El área media de las placas observado en el grupo Vh no presentó diferencias significativas con el grupo St pero si se redujo más de un 50% en el grupo Ub, reducción que fue estadísticamente significativa comparada con Vh ($p < 0.05$) (Figura 3.8 B).

En función de estos resultados, analizamos también el nivel de β A intraneuronal en el hipocampo de ratones machos alimentados con las diferentes dietas. Mediante inmunohistoquímica y revelado con DAB estudiamos los depósitos intracelulares en la región CA1 de hipocampo (Figura 3.8 C).

El número de células con depósitos intracelulares descendió un 5% en la dieta Vh y un 33% en la dieta Ub con respecto a la dieta St, pero el descenso no fue significativo (Figura 3.8 C). Sobre la misma región se determinó el área total ocupada por los depósitos intracelulares de β A y se observó un descenso del 69,1% entre el grupo Ub y el grupo St ($p < 0.01$) y entre el grupo Ub y Vh del 59,2% que también fue significativo (Figura 3.8 D) ($p < 0.05$). No hubo diferencias significativas entre las dietas St y Vh.

En conjunto, estos resultados indican que el ubiquinol retrasa la acumulación intracelular del β A y en consecuencia, la aparición de las placas seniles en los ratones 3xTg-AD.

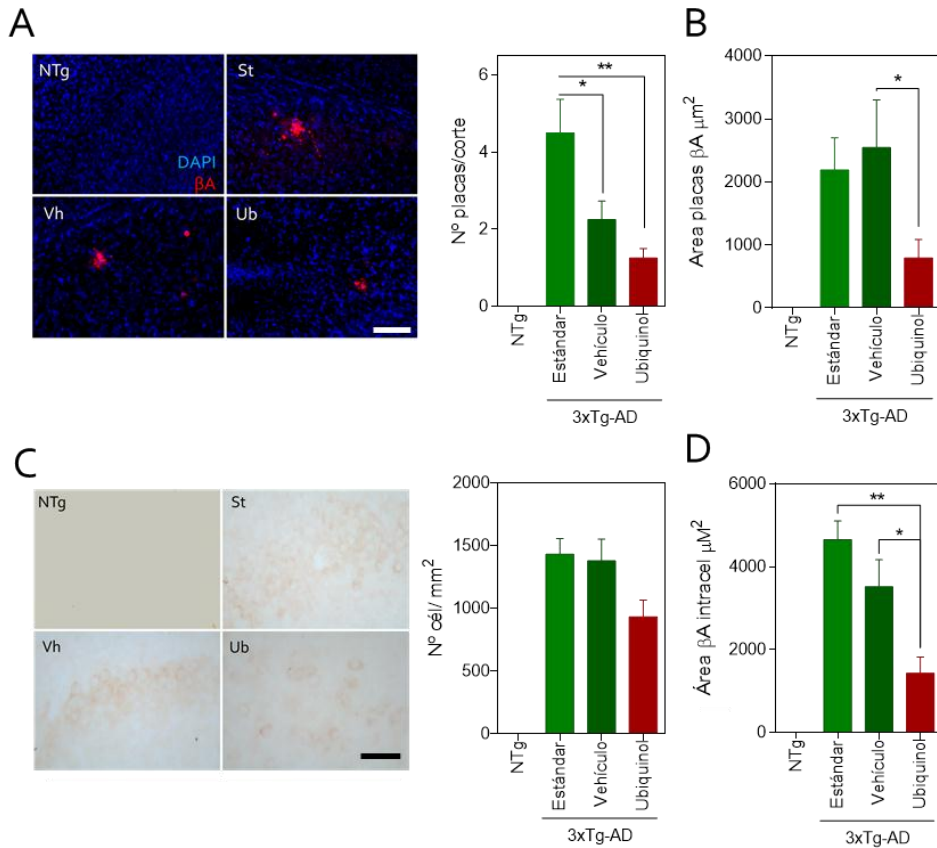


Figura 3.8. El ubiquinol reduce el acúmulo de βA extracelular e intracelular en CA1 de machos 3xTg-AD. Se realizó un análisis inmunohistoquímico frente a βA (rojo). Se adquirieron 3 imágenes 10x en 2 cortes de cada animal. Se cuantificó el nº de placas (A) y el área de placas (B). Escala= 100 μM . Para el estudio de βA intracelular se hizo una inmunohistoquímica con revelado ABC-DAB y se adquirieron 3 imágenes a 40x en 2 cortes de cada animal. El estudio se llevó a cabo en CA1 de hipocampo. Se cuantificó el nº de células con depósitos (C) y el área total usando una máscara de señal específica de βA intracelular (D). Los resultados son la media \pm SEM.; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Escala= 25 μM .

El ubiquinol reduce el nivel de BACE1 en el cerebro de ratones 3xTg-AD

BACE1 es una proteína clave en el procesamiento amiloidogénico del APP. Varios estudios demuestran su regulación por estrés oxidativo y por hipoxia (Apelt, Bigl et al. 2004). Analizamos el nivel de BACE1 en hipocampo (CA1) y *sustancia nigra*, regiones es donde se encuentran los niveles más elevados de esta proteína (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=23621). Se utilizó un test *Mann-Whitney* para determinar la diferencia entre sexos y no se observó diferencia significativa por lo que los datos que se obtuvieron para ambos sexos se agruparon. Los niveles de BACE1 analizados fueron muy reducidos

en el grupo NTg pero se incrementaron espectacularmente en el grupo 3xTg-AD St (Figura 3.9 A). El área ocupada por señal de BACE1 fue del 8,3% y 7,2% en hipocampo y sustancia nigra respectivamente en ratones St (Figura 3.9 A y B). El área marcada para BACE1 descendió significativamente en muestras de ratones Vh hasta niveles de 1,4% y 1,6% y hasta niveles de 0,4% y 0,46% en ratones con la dieta Ub en hipocampo y sustancia nigra respectivamente ($p < 0.001$). Aunque el área ocupada por BACE1 en ratones con dieta Ub fue menor que la de ratones con dieta Vh en ambas regiones, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

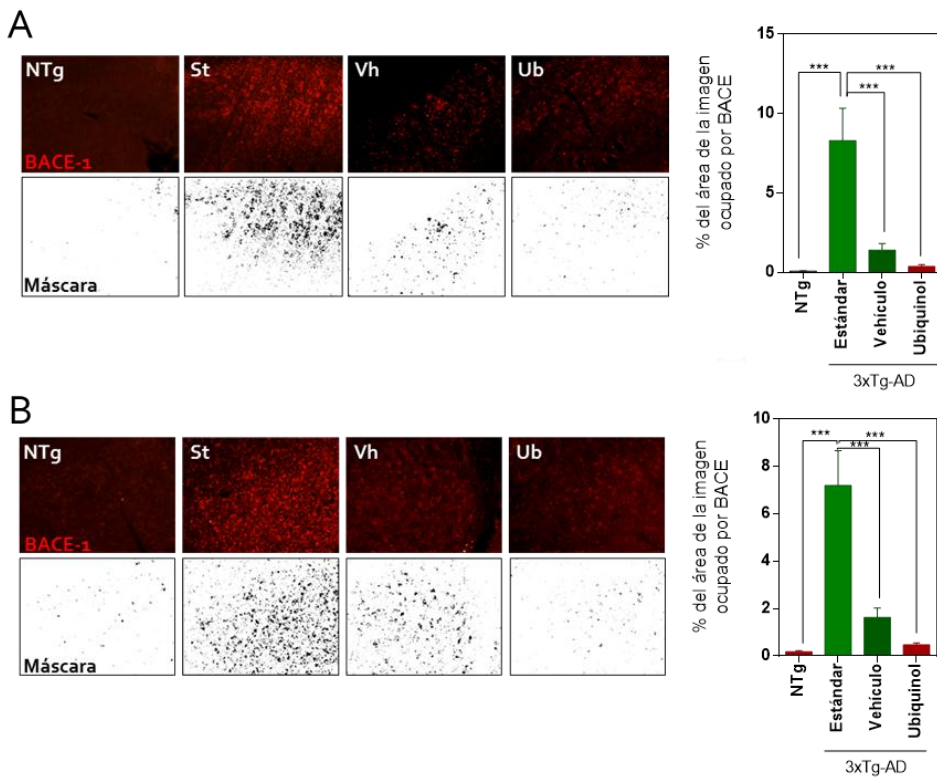


Figura 3.9. El ubiquinol reduce los niveles de BACE-1 en ratones 3xTg-AD. Se realizó un análisis inmunohistoquímico frente a BACE1 (rojo). Se adquirieron 3 imágenes 10x en 2 cortes de cada animal. Se cuantificó el área ocupada por BACE1 en CA1 hipocámpico (A) y en sustancia nigra (B). Los resultados muestran el promedio \pm SEM. *** $p < 0.001$.

Estos resultados se complementaron con un estudio comportamental de los mismo ratones, desarrollado por la Dra. Lydia Gimenez-Llort (Universidad Autónoma de Barcelona). Se observaron una serie de alteraciones en los ratones 3xTg-AD St, con respecto a ratones con dieta Ub y Vh. Destacó el descenso en comportamientos de neofobia y una mejora en la memoria espacial a corto plazo en Ub y Vh respecto a St (Ver resultados en Anexo III).

Capítulo IV. El CoQ10 sensibiliza a la línea celular humana de glioblastoma U251 frente a radiación y a temozolomida

El GBM es extremadamente radio- y quimioresistente, debido a la sobreproducción de ROS y el incremento paralelo de los sistemas antioxidantes que eliminan gran parte del daño inducido por las terapias citotóxicas (Bravard, Luccioni et al. 1999, Villalva, Cortes et al. 2012).

En este capítulo, investigamos el efecto del antioxidante lipofílico CoQ10 sobre la reducción de niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial en células U251 de GBM humano, y su relación con la inducción de apoptosis por parte de la radiación ionizante y la temozolomida (TMZ). Se ha observado como el CoQ10 reduce los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial y de H_2O_2 citosólico más de un 30%, induciendo un cambio pro-oxidante del estatus celular. Esta reducción de la capacidad antioxidante total en las células se basa en una disminución de la actividad catalasa (CAT) y SOD2 a través de la inactivación por fosforilación del factor de transcripción FOXO-3A. El CoQ10 también afecta al metabolismo, reduciendo el nivel de lactato intracelular y de varios metabolitos clave relacionados con la síntesis de glutatión, lo que lleva al descenso en los niveles de esta molécula clave en la eliminación de radicales libres. Basado en esto, las células de GBM tratadas con CoQ10 fueron dos veces más sensibles que células control al daño del DNA inducido por radiación y a la apoptosis en ensayos clonogénicos a corto y largo plazo. Las células tratadas con CoQ10 y TMZ mostraron también una mayor sensibilidad al daño que las células tratadas con TMZ solo. El tratamiento con CoQ10 descende la senciencia, longitud de telómeros y autofagia en células tratadas con TMZ, favoreciendo la apoptosis. Finalmente se estudió el efecto del tratamiento combinado de TMZ y radioterapia con CoQ10, observando como en células tratadas con el antioxidante incrementaba la apoptosis.

El CoQ10 reduce la capacidad antioxidante total de células de GBM y potencia la producción de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 inducida por la radioterapia

Como primera aproximación al efecto del CoQ en la producción de ROS en GBM se realizó un ensayo de dosis respuesta, in vitro, incubando células U251 con dosis crecientes de CoQ10 (2,5, 5 y 10 μ M) y se determinaron los niveles de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial y H_2O_2 (Figura 4.1 A, B y C). Los resultados indicaron como el nivel de ambas ROS se reducía significativamente, de forma dosis-dependiente, alcanzando niveles un 45% inferiores a los de células tratadas con vehículo (a las 24h de incubación) a dosis de 5 μ M ($p < 0.05$) (Figura 4.1 A), pero cuando las células se irradiaron a dosis de 2 y 4 Gy, las células pre-tratadas con CoQ10 mostraron niveles superiores de ambas ROS respecto de células tratadas con vehículo. Los

niveles de O_2^- se incrementaron significativamente 1,2 y 1,4 veces a 2 y 4 Gy, respectivamente ($p < 0.01$) (Figura 4.1 B). Se observaron resultados similares con H_2O_2 , obteniéndose incrementos significativos de 1,35 y 1,3 veces sobre el nivel de células irradiadas y tratadas con vehículo, a 2 y 4 Gy, respectivamente ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente) (Figura 4.1 C).

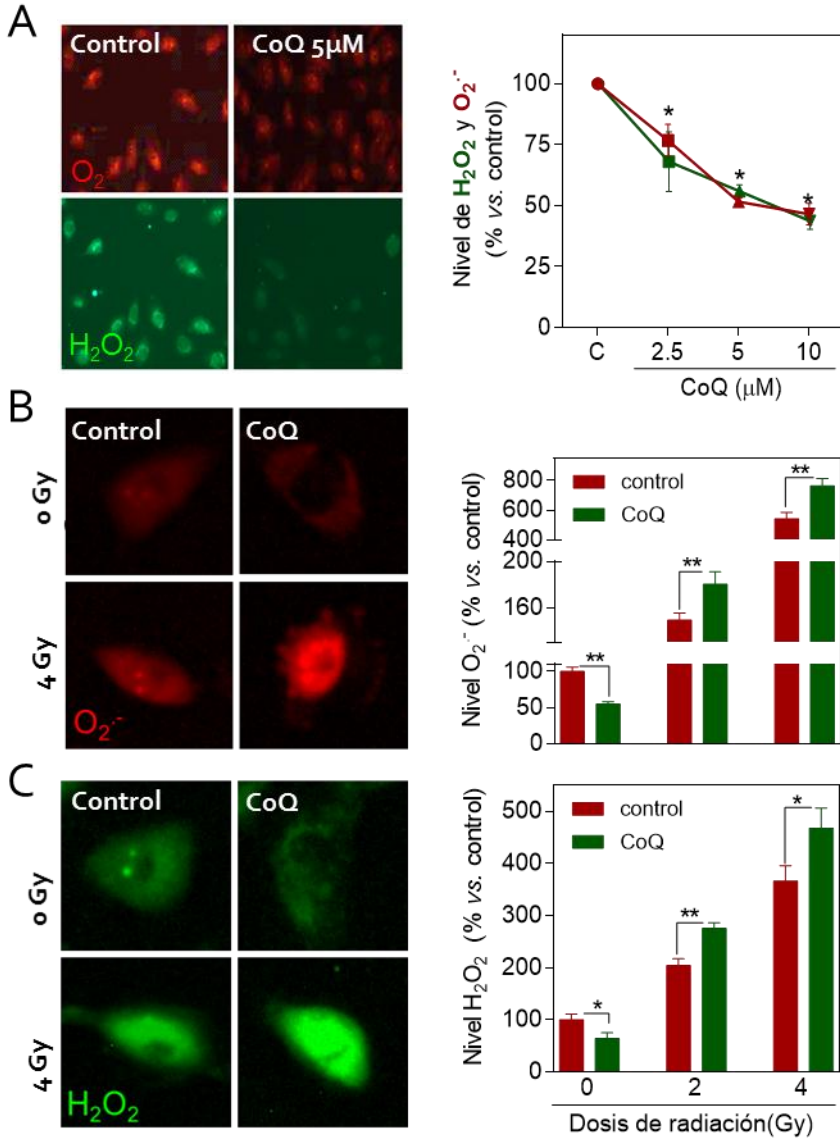


Figura 4.1. Efecto del CoQ10 en los niveles de O_2^- y H_2O_2 en células U251. Las se incubaron con dosis crecientes de CoQ10 (2,5, 5 y 10 μM) durante 24h y posteriormente se determinaron los niveles de O_2^- mitocondrial y H_2O_2 con las sondas MitoSOX (rojo) y H_2DCFDA (verde), respectivamente, mediante microscopía de fluorescencia. (A) Los resultados se muestran cómo % del promedio de señal de cada sonda en cada tratamiento vs. células tratadas con vehículo (control). En experimentos posteriores, las células se incubaron con 5 μM de CoQ10 durante 24h y posteriormente se irradiaron

(0-4 Gy). Los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (B) and H_2O_2 (C) se cuantificaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando MitoSOX (rojo) y H_2DCFDA (verde), respectivamente. Los resultados muestran el % del promedio de señal de cada sonda en cada tratamiento vs. células control (tratadas con vehículo y no irradiadas). N=3/4, min=50 células, *, $p<0.05$; ** $p<0.005$.

Este efecto dual sobre los niveles de ROS indica una modulación de la capacidad antioxidante total de las células. De hecho, las células tratadas con CoQ10 mostraron un descenso significativo del 15% ($p<0.01$) en la capacidad antioxidante total frente a células no tratadas (Figura 4.2 A). Esto indica un cambio hacia un estado celular pro-oxidante, mientras que no se observaron cambios en el medio de cultivo (Figura 4.2 B). Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Raquel Santiago Mora y con Consuelo María Nieva-Velasco.

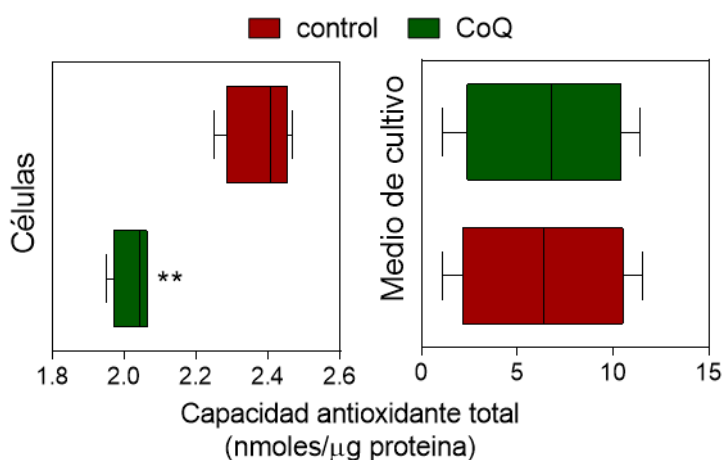


Figura 4.2. Efecto del CoQ10 sobre la capacidad antioxidante total en células U251. Las células se incubaron con una dosis 5 μM de CoQ10 durante 24h. La capacidad antioxidante celular y de los medios de cultivo (izquierda y derecha respectivamente) se determinó mediante colorimetría. Los resultados se muestran como nanomoles normalizados frente a concentración de proteínas, cuantificada por BCA. n= 5, ** $p<0.005$.

El CoQ10 potencia el daño en el DNA y la apoptosis inducida por la radioterapia

La radiación induce apoptosis a través del impacto directo sobre la doble hélice del DNA, lo que causa su rotura, pero también a través de la ionización del citosol y el nucleoplasma, incrementando los niveles de ROS que reaccionan con el DNA provocando más daño (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011).

Como marcador de daño en el DNA se utilizó la histona γ -H2AX, un indicador aceptado de la ruptura de la doble hélice del DNA (Pouliliou and Koukourakis 2014). Mediante ICC, se determinó el número de foci γ -H2AX en células irradiadas, tratadas con vehículo o CoQ10, en comparación con las no irradiadas. Se observó un promedio de 3,5 foci γ -H2AX por célula en células control irradiadas con 4Gy,

valor que se vio incrementado de forma significativa en 2,7 veces en células pretratadas durante 24h con 5 μ M CoQ₁₀ ($p < 0.01$) (Figura 4.3 A). Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Raquel Santiago Mora.

Dado el incremento del daño en el DNA producido por la radioterapia en células pretratadas con CoQ₁₀, se determinó el efecto de este tratamiento sobre la muerte celular por apoptosis a corto plazo y la capacidad de supervivencia, a largo plazo. La muerte celular por apoptosis se cuantificó determinando por ICC de fluorescencia el nivel de Anexina V translocada a la hemicapa externa de la membrana plasmática. Mediante esta técnica se comprobó que la radiación incrementaba significativamente en 13,6 veces el nivel de Anexina V en células pretratadas con 5 μ M de CoQ₁₀, a 96h tras la irradiación ($p < 0.001$) (Figura 4.3 B). El incremento de la apoptosis se tradujo en un descenso significativo en la viabilidad celular ($p < 0.01$) en un 60 y 70% a 2 y 4 Gy respectivamente, en células pretratadas con 5 μ M de CoQ₁₀ frente al 35 y 50% de reducción obtenido para células tratadas con vehículo a las mismas dosis de radiación (Figura 4.3 C). En resumen, pretratando con CoQ se consigue reducir el IC₅₀ 2,5 Gy (control) a 1,3 Gy; se duplica el efecto citotóxico de la radioterapia.

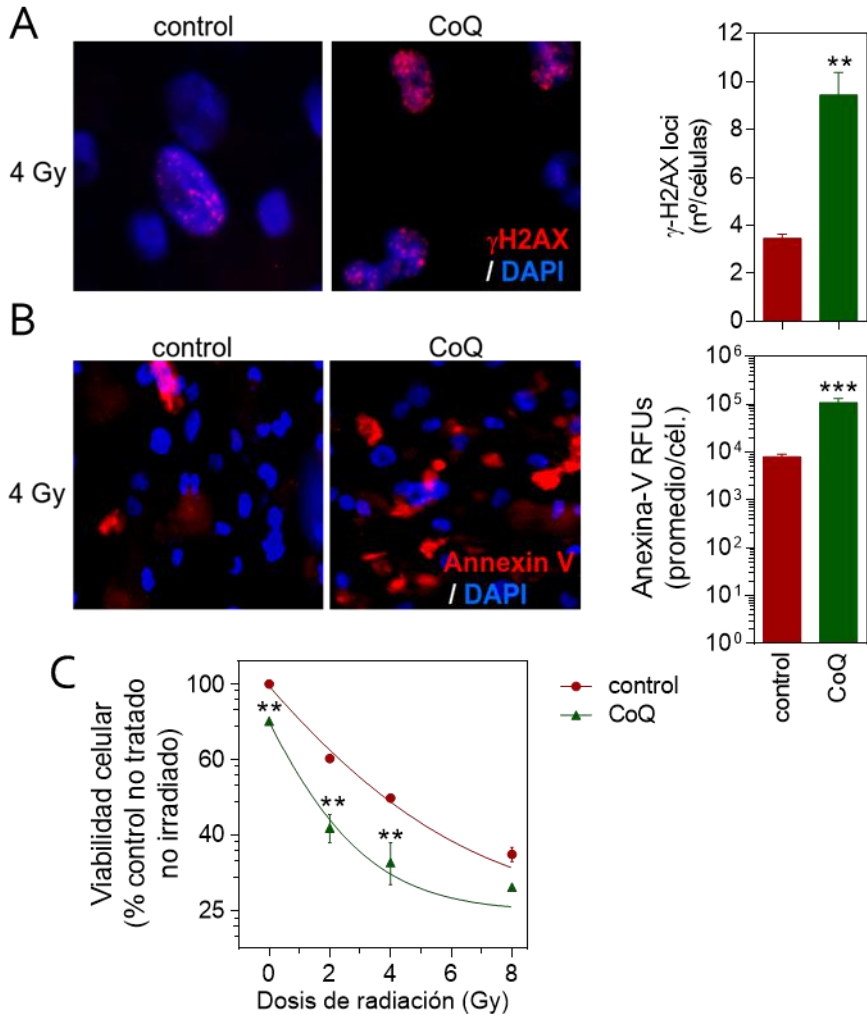


Figura 4.3. El pretratamiento con CoQ10 incrementa la apoptosis inducida por la radioterapia en células de GBM U251. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24h y después irradiadas (0-4 Gy). El daño en el DNA (A) se determinó mediante inmunomarcaje frente a γ H2AX (rojo), comarcaje directo con Hoescht (azul) y posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados se muestran como promedio del número de foci γ H2AX por célula. La apoptosis (B) se determinó por inmunotinción frente a Anexina V (rojo) en células no permeabilizadas, co-marcadas con Hoescht (azul). Los resultados se muestran como promedio de las unidades relativas de fluorescencia (RFU) de Anexina V por célula. La viabilidad celular (C) se determinó analizando la morfología nuclear. Los resultados se muestran como el porcentaje del promedio de células viables respecto al control, tratado con vehículo y no irradiado. N=3; min=100 células., **, $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

El CoQ10 potencia el efecto citotóxico de la radioterapia a largo plazo

El efecto citotóxico de la radioterapia a largo plazo se determinó mediante ensayos clonogénicos. Mediante esta técnica se determinó que la radiación disminuía la supervivencia en 15% y 60% a 4 y 8 Gy, respectivamente (Figura 4.4). El pretratamiento con CoQ10 disminuyó significativamente la supervivencia en un 48 y 81% a las mismas dosis de radiación, lo cual triplicaba el efecto observado en células control a dosis de 4Gy ($p < 0.05$) (Figura 4.4).

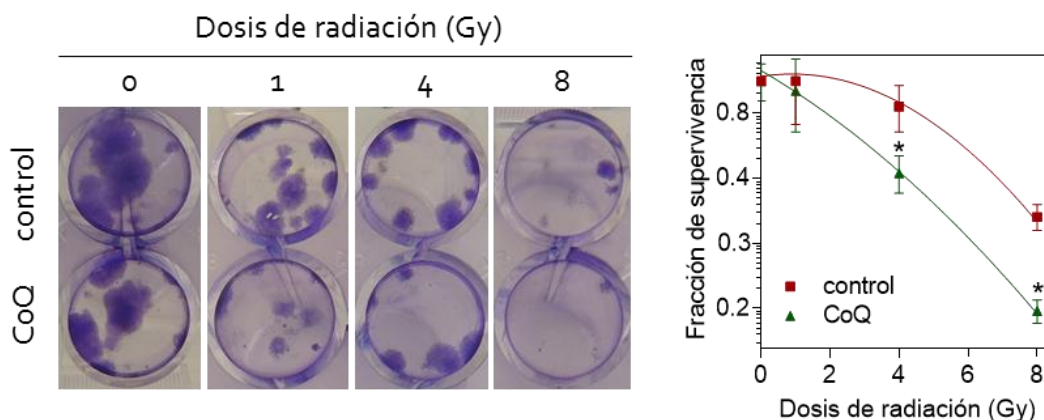


Figura 4.4. El CoQ10 potencia el efecto citotóxico de la radioterapia en células U251, a largo plazo. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24h y después se irradiaron (0-4 Gy). El número de clones se determinó a los 15 días tras la irradiación, mediante tinción con cristal violeta. Los resultados se muestran como el promedio de la fracción de clones en cada tratamiento (pocillo) vs. células no tratadas y no irradiadas. $n = 4$, *, $p < 0.05$.

El CoQ10 reduce los niveles de lactato

El elevado nivel de lactato del GBM debido a su metabolismo glicolítico, está relacionado con la radioresistencia (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011). La disminución del nivel de lactato intracelular podría contribuir a potenciar el efecto proapoptótico de la radioterapia. Para ver si el tratamiento con CoQ10 afectaba de alguna manera al nivel de lactato, este se cuantificó en extractos celulares procedentes de U251 tratadas durante 24h con 5 μ M de CoQ10. La determinación se realizó mediante resonancia magnética nuclear, en colaboración con la Dra. María Victoria Gómez Almagro (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas, Universidad de Castilla la Mancha). Mediante esta técnica, se observó una disminución significativa del 46% en el nivel de lactato intracelular, en células tratadas con CoQ10 frente a células tratadas con vehículo ($p < 0.01$) (Figura 4.5).

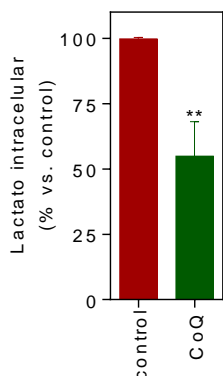


Figura 4.5. El CoQ10 reduce el nivel de lactato intracelular. Las células se incubaron con 5 μM de CoQ durante 24h. El nivel de lactato intracelular se determinó por resonancia magnética nuclear. Los resultados muestran el % del promedio del nivel de lactato vs. control (vehículo). n= 4, **, p<0.005.

El CoQ10 incrementa los niveles citosólicos de p-FOXO-3A reduce la actividad catalasa y el nivel de SOD2, sin alterar los niveles de SOD1 y NQO1

FoxO es una familia de factores de transcripción que regulan la respuesta frente al estrés celular, promoviendo la defensa antioxidante celular (Klotz, Sanchez-Ramos et al. 2015). Las ROS modulan la actividad de FoxO a diferentes niveles, incluyendo modificaciones postraduccionales, modificaciones en la localización subcelular, etc. FoxO estimula la transcripción de genes que codifican proteínas antioxidantes de fase 2 en diferentes compartimentos subcelulares (SOD2 o catalasa, entre otras) siendo un factor de transcripción clave para la maquinaria antioxidante celular (Klotz, Sanchez-Ramos et al. 2015). El incremento en los niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa y SOD2 está directamente relacionado con radioresistencia, ya que estas eliminan los radicales libres que se producen tras la irradiación de las células tumorales, evitando su muerte (Lee, Kim et al. 2004, Deighton, Le Bihan et al. 2014).

Como el CoQ10 disminuye los niveles de $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , el siguiente paso fue cuantificar el nivel de FOXO-3A y las enzimas antioxidantes de fase 2 bajo el control de este factor de transcripción. La incubación de células de GBM U251 con CoQ10 de 2.5 a 10 μM redujo significativamente la actividad catalasa entre un 35 y un 50% (p<0.01) (Figura 4.6 A). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Juan Ramón Peinado. La reducción en la actividad catalasa sensibilizaría las células de GBM al efecto citotóxico causado por el H_2O_2 exógeno. De hecho, las células tratadas con CoQ10, en ensayos de viabilidad en respuesta a H_2O_2 muestran valores de IC50 de 3 μM , frente a 8 μM obtenido en células control (Figura 4.6 B).

El nivel de SOD2 también se redujo significativamente en un 44% por el tratamiento con CoQ10 (p<0.05), mientras que los niveles de otras enzimas de fase 2 como SOD1 y NQO1 no variaron tras el tratamiento con el antioxidante (Figura 4.6 C). Ya que la catalasa y SOD2 se regulan por FOXO3A, se analizó el nivel de este

factor de transcripción, mediante *Western blot*, en colaboración con el Dr. José Manuel Villalba (Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba). Los resultados indican cómo el nivel de p-FOXO3A citosólico (inactivo) se incrementó significativamente 1,6 veces en células tratadas con CoQ respecto a células control tratadas con vehículo ($p < 0.01$) (Figura 4.6 C).

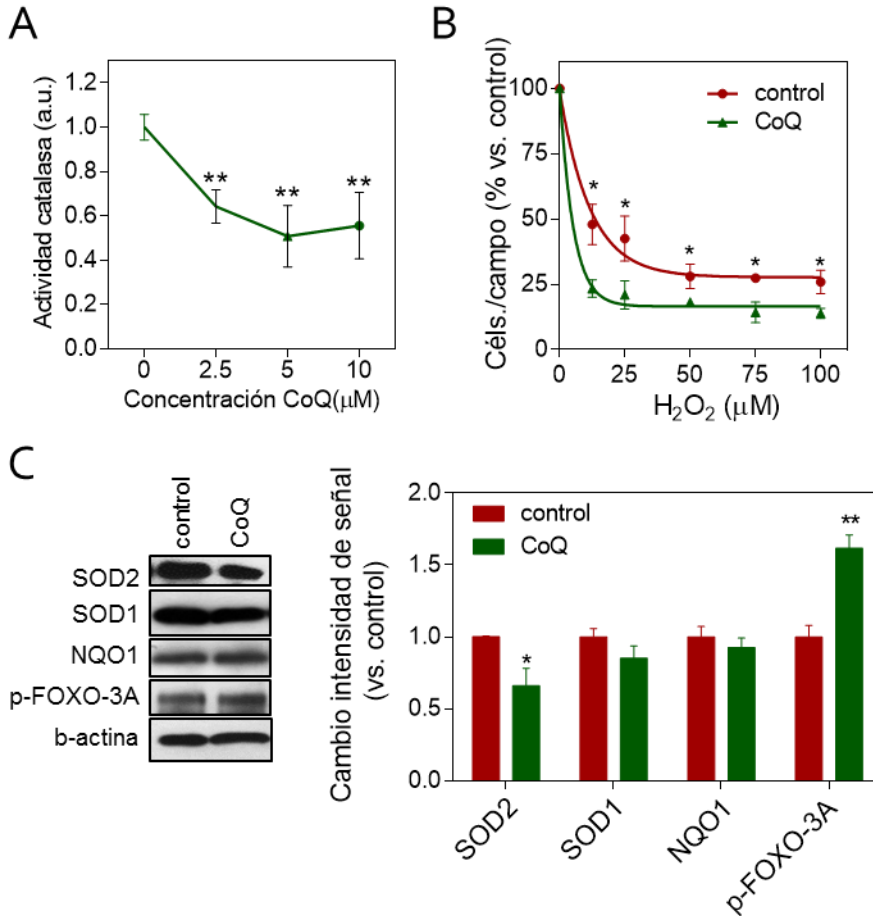


Figura 4.6. El CoQ₁₀ inactiva FOXO-3A y reduce la actividad catalasa y el nivel de SOD₂, sensibilizando las células U251 al efecto citotóxico del H₂O₂. Las células se incubaron con 5 μM de CoQ₁₀ durante 24h. La actividad catalasa (A) se cuantificó por espectrofotometría. Se expresa cómo % del promedio de la actividad enzimática frente al control (vehículo). Las células se incubaron durante 8h con concentraciones crecientes de H₂O₂ (12.5-100 μM) (B) y después lavadas y fijadas. Los resultados se muestran cómo porcentaje del promedio de células por campo para cada tratamiento, frente al control (vehículo). Los niveles de SOD₁, SOD₂, NQO₁ y p-FOXO-3A (C) se determinaron mediante *Western blot* y análisis densitométrico. Los resultados se expresan como promedio de la intensidad de cada proteína normalizada con la actina. n= 4, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

El CoQ10 regula la síntesis de glutatión

El glutatión (GSH) es uno de los antioxidantes celulares más abundantes e importantes, su síntesis está regulada por ROS y estrés oxidativo, protege a las células del daño producido por la oxidación inducida por $O_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 (Ortega, Mena et al. 2011). Un incremento en los niveles de ROS provoca un descenso a corto plazo en los niveles de GSH, que está asociado con un incremento en los niveles de glutatión oxidado (GSSG). Los niveles de glutatión están directamente relacionados con la resistencia a radiación ionizante (Ortega, Mena et al. 2011). De hecho, hay una correlación negativa entre el nivel de GSH y la sensibilidad a radiación ionizante en muestras de GBM (Kudo, Kokunai et al. 1990). En la síntesis y producción del GSH intervienen precursores clave como el glutamato, glicina, serina y glutamina (Gorrini, Harris et al. 2013).

Dado que experimentos previos incluidos en apartados anteriores indican que en tratamiento con CoQ10 disminuye la capacidad antioxidante total de células de GBM, se ensayó el efecto del tratamiento con el antioxidante sobre el balance de GSH/GSSG. Nuestros resultados muestran que el nivel neto de GSH no se ve alterado por el tratamiento con CoQ10 5 μ M (Figura 4.7 A, derecha), mientras que sí disminuye significativamente en un 25% los niveles de GSSG ($p < 0.01$) (Figura 4.7 A, centro), lo que se traduce en un descenso significativo del 25% en el cociente GSSG/GSH ($p < 0.001$) (Figura 4.7 A, izquierda). Estos experimentos se desarrollaron en colaboración con la Dra. Milica Pêsic (*Institute for Biological Research "Sinisa Stankovic"*, Universidad de Belgrado).

Por otra parte, el análisis de los metabolitos intracelulares por RMN reveló el descenso de varios metabolitos clave, implicados en la síntesis de GSH. Por tanto su descenso podría estar implicado en la disminución del nivel neto de este antioxidante. En concreto, se detectó un descenso significativo en aminoácidos como glutamato, glicina, serina y glutamina, reducidos en un 42% ($p < 0.05$), 52% ($p < 0.01$), 50% ($p < 0.01$) y 40% ($p < 0.05$), respectivamente, en células tratadas con CoQ10 respecto a células tratadas con vehículo (Figura 4.7 B). La determinación de estos metabolitos se realizó en colaboración con la Dra. María Victoria Gómez Almagro (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Químicas, Universidad de Castilla la Mancha).

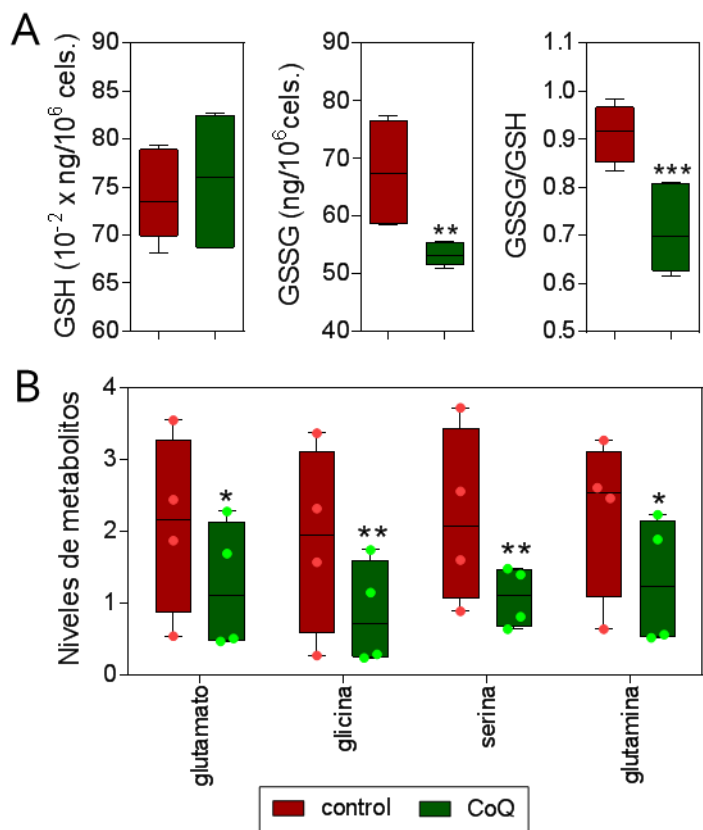


Figura 4.7. El CoQ10 reduce el nivel de GSH/GSSG en células U251 regulando metabolitos clave para su síntesis. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24h. Los niveles de GSH y GSSG (A) se determinaron mediante el uso de un kit colorimétrico comercial. Los resultados muestran los niveles de GSH (izq.), GSSG (medio) y el cociente GSSG/GSH (dcha.). Los niveles de glutamato, glicina, serina y glutamina (B) se determinaron por RMN. Los resultados muestran el promedio del nivel de lactato vs. control (vehículo). n= 4, *, p<0.05; **, p<0.005; ***, p<0.001.

El CoQ10 sensibiliza a células de GBM frente al efecto citostático/tóxico inducido por la temozolomida, *in vitro*

Otro de los sellos de identidad del GBM es la resistencia a terapias citostáticas/tóxicas. Hasta el momento, la temozolomida (TMZ) es el quimioterápico citotóxico que mayor eficacia ha mostrado frente al GBM, que también ofrece una fuerte quimioresistencia (Stupp and Newlands 2001). Estudios previos han demostrado como el antioxidante resveratrol puede sensibilizar a células de GBM frente al daño inducido por la TMZ (Filippi-Chiela, Thome et al. 2013, Li, Liu et al. 2016), por lo que el efecto antioxidante del CoQ10 podría sensibilizar frente al tratamiento con TMZ.

El efecto del CoQ₁₀ sobre la acción de la TMZ se evaluó mediante un ensayo dosis-respuesta del quimioterápico, combinado con vehículo y CoQ, evaluando el número de células por pocillo. Específicamente, las células fueron pre-tratadas durante 24h con 5 μ M de CoQ₁₀ tras lo cual se administraron dosis de 0, 50, 100 y 200 μ M de TMZ durante 72h. Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de células en la condición de CoQ₁₀ frente a vehículo, a todas las dosis de TMZ. La dosis de 50 μ M de TMZ redujo el número de células por campo un 40%, mientras que la misma dosis sobre células pretratadas con CoQ₁₀ redujo un 65% el número de células, siendo el descenso significativo con respecto a células control ($p < 0.05$). La dosis de 100 μ M de TMZ redujo el número de células por campo un 79%, mientras que la misma dosis sobre células pretratadas con CoQ₁₀ redujo un 88% el número de células. Finalmente, la dosis de 200 μ M de TMZ redujo el número de células por campo un 93%, mientras que la misma dosis sobre células pretratadas con CoQ₁₀ redujo un 97,5% el número de células (Figura 4.8). Estos resultados se traducen en una IC₅₀ de 35,6 μ M para CoQ₁₀ frente a 59,9 para vehículo. El pretratamiento con el antioxidante reduce cerca del 40% la concentración de TMZ para obtener un efecto citostático/tóxico similar (Figura 4.8).

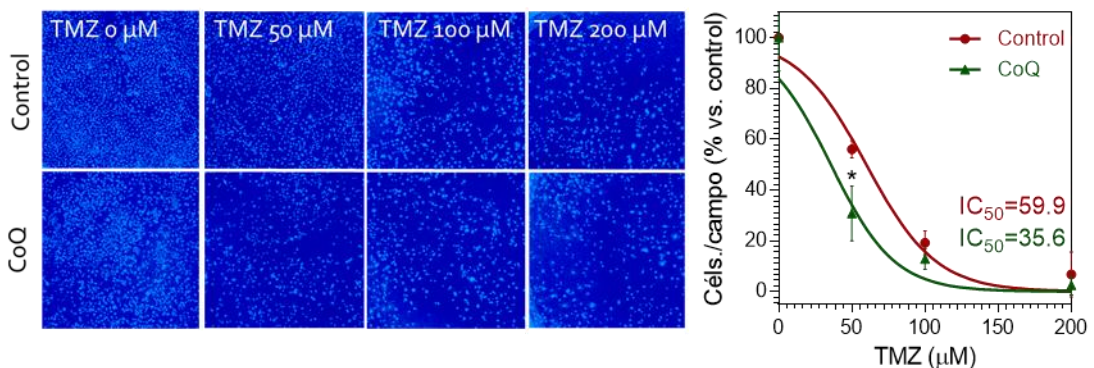


Figura 4.8. El CoQ₁₀ incrementa el daño citostático/tóxico inducido por TMZ, *in vitro*. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ₁₀ durante 24h tras lo cual se incubaron con concentraciones crecientes de TMZ, tras 72h se fijaron y se tiñeron con DAPI. Se adquirieron imágenes de microscopía de fluorescencia a 4x y se cuantificó el número de células por campo (en 4 campos aleatorios por pocillo). Se determinó el valor de IC₅₀ para cada curva mediante la normalización de la respuesta y la eliminación automática de *outliers*. Los valores obtenidos de r^2 para control y CoQ fueron 0,9743 y 0,8862 respectivamente. Los resultados muestran la curva correspondiente a la dosis respuesta. N=3. ($p < 0.05$).

En estas mismas muestras se determinó el número de células apoptóticas mediante un estudio de morfología nuclear. La dosis de 50 μ M de TMZ produjo un 20% de células apoptóticas, mientras que la misma dosis sobre células pretratadas

con CoQ₁₀ produjo un 30% de células apoptóticas. La dosis de 100 μM de TMZ produjo un 28% de células apoptóticas, mientras que la misma dosis sobre células pretratadas con CoQ₁₀ produjo un 40% de células apoptóticas. Por lo tanto para ambas dosis de TMZ, el pretratamiento con CoQ₁₀ incrementó significativamente la apoptosis ($p < 0.05$) (Figura 4.9 A). Este estudio se corroboró determinando el nivel de Anexina V translocada a la hemicapa externa de la membrana plasmática, un marcador establecido de apoptosis. El tratamiento con CoQ₁₀ mostró un incremento del nivel de Anexina V del 30% frente a células control que no fue significativo estadísticamente. En células tratadas con TMZ se observó un incremento significativo del 130% frente a células control. En células tratadas pretratadas con CoQ₁₀ y tratadas con 50 μM de TMZ se observó un incremento significativo en la apoptosis del 18% con respecto a células tratadas solo con 50 μM de TMZ ($p < 0.05$) y del 180% con respecto a células control (Figura 4.9 B).

La proteína p53 es clave en la regulación de la apoptosis en GBM (Louis, Ohgaki et al. 2007), por lo que también se estudió el efecto del CoQ₁₀ sobre su nivel de expresión. El nivel de p53 se determinó mediante *western blot* y no mostró diferencias entre células control y células tratadas con CoQ₁₀. El tratamiento con TMZ produjo un incremento del 50% con respecto a células control. En células pretratadas con CoQ₁₀ y tratadas con 50 μM de TMZ se observó un incremento significativo del 12% ($p < 0.05$) con respecto al tratamiento con TMZ, y del 62% con respecto a las células control (Figura 4.9 C).

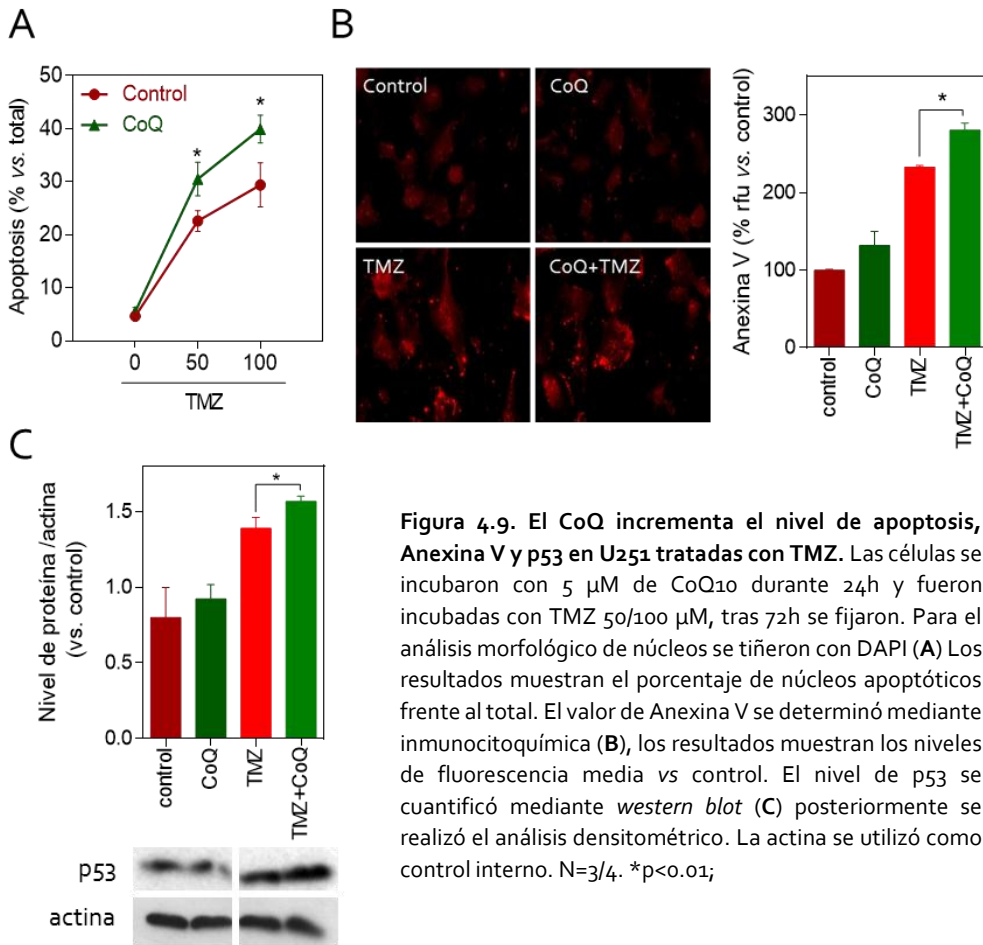


Figura 4.9. El CoQ incrementa el nivel de apoptosis, Annexina V y p53 en U251 tratadas con TMZ. Las células se incubaron con 5 μM de CoQ10 durante 24h y fueron incubadas con TMZ 50/100 μM, tras 72h se fijaron. Para el análisis morfológico de núcleos se tiñeron con DAPI (A) Los resultados muestran el porcentaje de núcleos apoptóticos frente al total. El valor de Annexina V se determinó mediante inmunocitoquímica (B), los resultados muestran los niveles de fluorescencia media vs control. El nivel de p53 se cuantificó mediante western blot (C) posteriormente se realizó el análisis densitométrico. La actina se utilizó como control interno. N=3/4. *p<0.01;

El CoQ10 potencia el efecto citotóxico de la TMZ en células U251 a largo plazo

El efecto del CoQ10 sobre la citotoxicidad a largo plazo se determinó mediante un ensayo clonogénico. Las células humanas de GBM se pretrataron con CoQ10 o vehículo 24 horas antes del tratamiento con TMZ a dosis de 50, 100 y 200 μM. Se mantuvieron en cultivo durante 15 días, tras los cuales se tiñeron con DAPI y se cuantificó el número de clones por pocillo. La dosis 50 μM de TMZ indujo una fracción de supervivencia media de 0.033, descendiendo hasta 0.01 en células tratadas previamente con CoQ10. La dosis 100 μM de TMZ indujo una fracción de supervivencia media de 0.0083, descendiendo hasta 0.0033 en células tratadas previamente con CoQ10. En células tratadas con 200 μM de TMZ no se observaron diferencias (Figura 4.10).

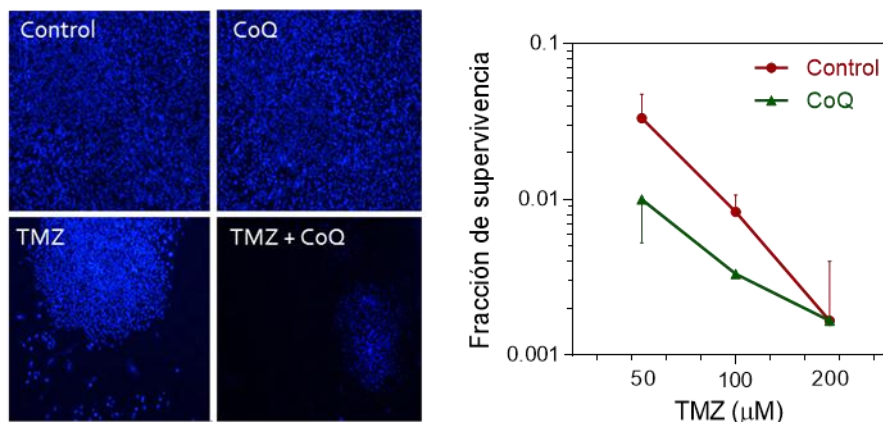


Figura 4.10. El CoQ10 potencia el efecto citotóxico de la TMZ en células U251 a largo plazo. Las células se incubaron con 5 μM de CoQ10 durante 24h y posteriormente con TMZ 50/100 μM. El número de clones se determinó 15 días tras el tratamiento citotóxico, mediante tinción con DAPI. Se consideraron como clones aquellos con más de 50 células. Los resultados aparecen como la fracción de supervivencia vs. células no tratadas. n= 4.

El CoQ10 reduce el nivel efectivo de MGMT

Una de las principales defensas frente al daño inducido por TMZ en células de GBM es la sobreexpresión de MGMT. Esta proteína repara el daño por alquilación en el DNA inducido por TMZ (Hegi, Diserens et al. 2005). El incremento de la muerte celular inducida por TMZ en células tratadas con CoQ10 podría estar relacionado con la regulación del nivel de MGMT. Hasta el momento, no existen evidencias en la bibliografía sobre este hecho, aunque sí sobre la disminución de su nivel de expresión en otras patologías (Goder, Nagel et al. 2015).

Las células U251 se pre-trataron con 5 μM de CoQ10 durante 24h tras lo cual se trataron con 50 μM de TMZ, y tras 72h se fijaron y se hizo una inmunocitoquímica frente a MGMT. El tratamiento con 5μM de CoQ10 redujo el nivel de MGMT significativamente en un 25% con respecto a células control (p<0.001). El tratamiento con 50 μM de TMZ redujo el nivel de MGMT un 10% con respecto a células control. El pretratamiento de CoQ10 y TMZ redujo significativamente el nivel de MGMT un 27% comparado con células tratadas solo con TMZ (p<0.001) (Figura 4.11 A). A continuación se estudió la localización subcelular (cociente de la señal nuclear/citoplasmática) de MGMT con los diferentes tratamientos. El tratamiento con 5μM de CoQ10 redujo el cociente de la señal nuclear/citoplasmática significativamente en un 40% con respecto a células control (p<0.05). El pretratamiento de CoQ10 y TMZ redujo el cociente significativamente un 35% comparado con células tratadas solo con TMZ (p<0.01) (Figura 4.11 A), lo que se traduce como una mayor acumulación de MGMT en el

citoplasma en células tratadas con CoQ10 (Figura 4.11 B). Este efecto es muy importante ya que MGMT en citoplasma está inactivo.

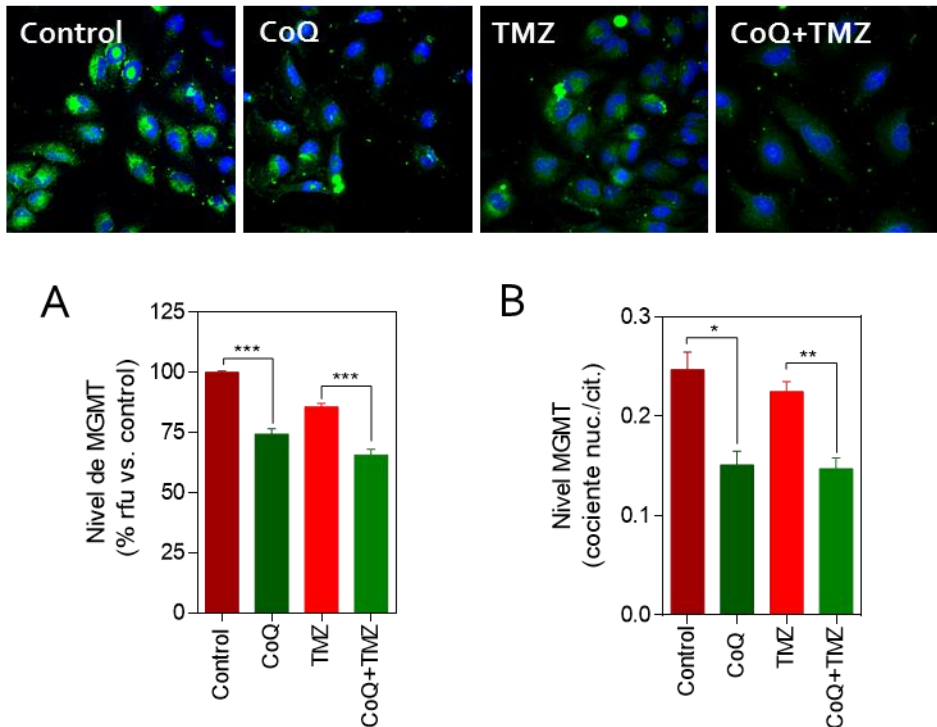


Figura 7.11. El CoQ10 reduce el nivel de MGMT y su translocación a núcleo en células tratadas con TMZ. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24h y posteriormente con 50 μ M de TMZ, tras 72h se fijaron y se realizó la inmunocitoquímica frente a MGMT (verde), como contraindicación nuclear se utilizó DAPI (azul). Se determinó el porcentaje de fluorescencia frente a la señal control (A) y el cociente entre la señal nuclear y la señal citoplasmática (B). N=4. * $p < 0.01$; ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

El CoQ10 reduce la senescencia en U251 tratadas con TMZ

La proteína p53 modula la respuesta anti-tumoral por diferentes procesos, entre ellos la regulación de la apoptosis y la senescencia (England, Huang et al. 2013). Una vez estudiado el efecto del CoQ10 sobre la apoptosis se abordó su papel sobre la senescencia. Para ello se utilizó el kit comercial *DetectaGen Green CMFDG lacZ Gene Expression* (Molecular Probes) basado en la detección de la actividad β -galactosidasa, que se produce en condiciones de senescencia. El componente CMFDG del kit, al detectar la actividad β -galactosidasa forma unos aductos visibles con microscopía de fluorescencia.

El tratamiento con 50 μ M de TMZ incrementó en número de células senescentes más de un 50% con respecto a células control y tratadas con CoQ10. El

pretratamiento con CoQ₁₀ y con 50µM de TMZ redujo significativamente el nivel un 20% con respecto a células tratadas con TMZ ($p < 0.05$) (Figura 4.12).

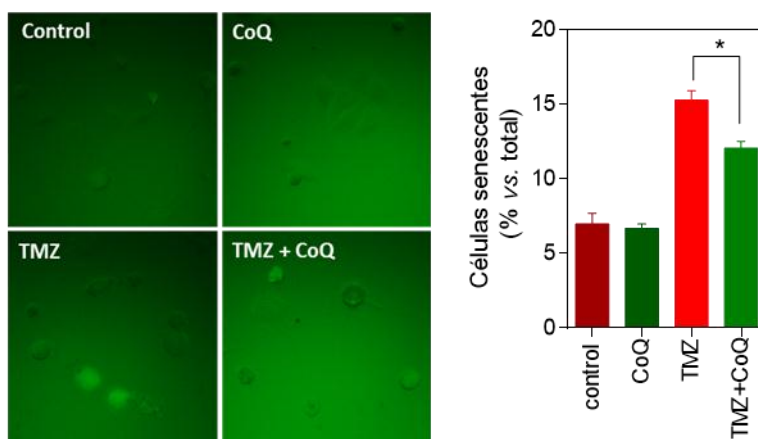


Figura 4.12. El CoQ₁₀ reduce la senescencia en células tratadas con TMZ. Las células se incubaron con 5 µM de CoQ₁₀ durante 24h y posteriormente con 50 µM TMZ, tras 72h se utilizó el kit *DetectaGene Green CMFDG lacZ Gene Expression* (Molecular Probes) que reconoce la actividad β-galactosidasa y genera aductos. Se adquirieron imágenes de fluorescencia y de contraste de fases a 10x por tratamiento. Se cuantificó el porcentaje de células senescentes. N=3. * $p < 0.01$.

El CoQ₁₀ reduce la longitud de los telómeros en U251 en combinación con TMZ

Es bien sabido que las secuencias teloméricas se acortan tras cada división mitótica. Por ello los telómeros reciben el nombre de relojes mitóticos. Este proceso contribuye a la senescencia celular. Estas estructuras están formadas por la secuencia nucleotídica TTAGGG repetida entre cientos y miles de veces y se considera que su función, en principio, es protectora de los cromosomas (Bodnar, Ouellette et al. 1998).

La actividad telomérica podría ser otra vía por la que el CoQ₁₀ modularía la apoptosis de las células tumorales. Este hecho se abordó cuantificando la longitud de los telómeros con un kit PNA/FITC (*Dako*) que reconoce los hexámeros teloméricos y se une a ellos, mostrando mayor señal cuanto mayor es la longitud de los telómeros. Los resultados mostraron que el tratamiento con 5µM de CoQ₁₀ reducía significativamente la señal telomérica en un 20% con respecto a células control ($p < 0.01$). El tratamiento con 50µM de TMZ mostró un incremento del 10% en la señal con respecto a células control. El pretratamiento con 5µM de CoQ₁₀ y 50µM de TMZ, redujo significativamente la señal más de un 30% comparada con la señal de células tratadas con TMZ ($p < 0.01$) (Figura 4.13). Esta reducción podría

deberse a la inhibición de la enzima telomerasa, aunque esta hipótesis aun no se ha comprobado.

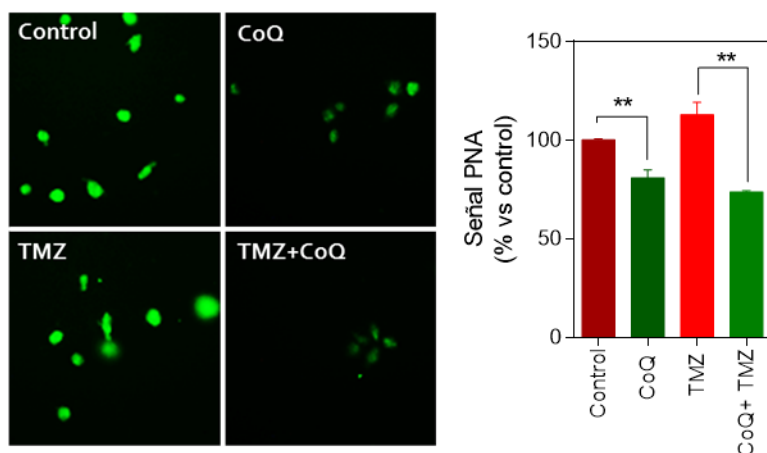


Figura 4.13. El CoQ10 reduce la longitud de los telómeros en células U251. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24h y fueron incubadas con TMZ 50 μ M, tras 72h, se utilizó el kit *Telomere PNA* (Dako). Se adquirieron imágenes de fluorescencia a 10x. Se cuantificó el porcentaje de señal vs. control. N=4. **p<0.05.

El CoQ10 reduce la autofagia en células tratadas con TMZ

Las células de GBM pueden sobrevivir bajo las condiciones de estrés generado por la TMZ, incrementando la autofagia (Sharma, Goehe et al. 2014). Este es un mecanismo de evasión de la apoptosis en determinadas condiciones de estrés y de quimioresistencia en el GBM (Filippi-Chiela, Villodre et al. 2011).

Para abordar el efecto del CoQ10 solo o en combinación con TMZ sobre la autofagia se han utilizado dos estrategias basadas en la cuantificación de LC3 II/I. LC3 es una proteína soluble que se distribuye por todos los tejidos en mamíferos. Durante la autofagia se forman los autofagosomas con material citoplasmático, incluyendo la forma citosólica de LC3 (LC3 I) que se conjuga con una fosfatidiletanolamina para formar LC3II, que se asocia a las membranas de los autofagosomas. Siendo por lo tanto, LC3II un marcador de autofagia (Daniel J Klionsky, Hagai Abeliovich et al. 2016).

Mediante *Western blot* se estudió el cociente entre la intensidad de la banda correspondiente a las LC3 II y a LC3 I, teniendo en cuenta que cuanto menor sea este cociente, se considera que hay menos autofagia. Tras el análisis se observó cómo el tratamiento con 50 μ M de TMZ incrementó el cociente un 30% con respecto a células control, lo que indicó un incremento en la autofagia. Este

incremento se revirtió hasta niveles similares al control en células pretratadas 5µM de CoQ10 y 50µM de TMZ (Figura 4.14 A).

El siguiente abordaje fue estudiar por inmunocitoquímica el número de vesículas marcadas con LC3 por célula, y se observó un patrón similar al observado en *Western blot*. El tratamiento con 50 µM de TMZ incrementó el número de vesículas de más del 60% con respecto a células control. Este incremento se revirtió en células pre-tratadas con 5 µM de CoQ10 y 50 µM de TMZ (Figura 4.14 B).

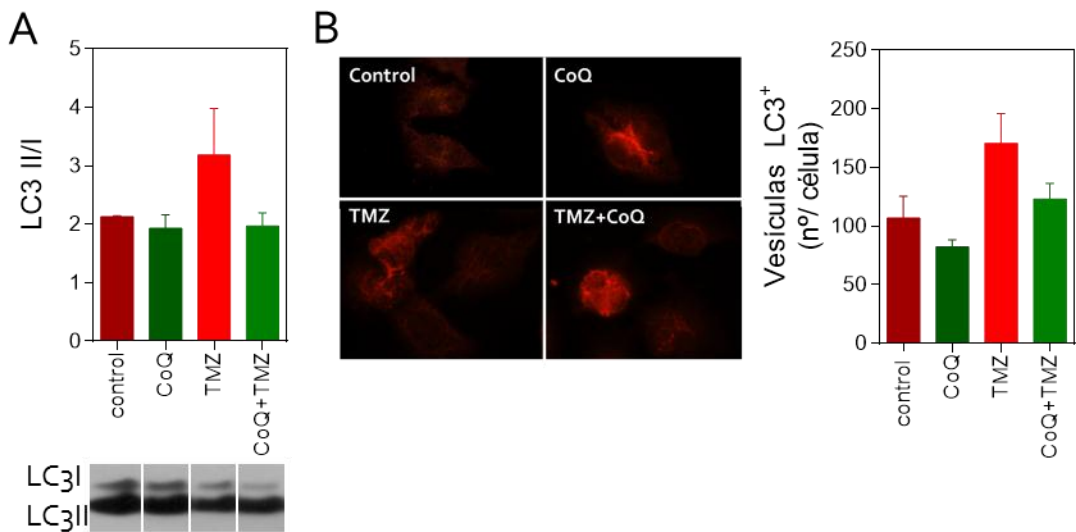


Figura 4.14. El CoQ reduce la autofagia en U251 tratadas con TMZ. Las células se incubaron con 5 µM de CoQ10 durante 24h y posteriormente con 50 µM de TMZ, tras 72h se extrajeron las proteínas. De forma paralela se trataron y fijaron para inmunocitoquímica. Se realizó un *western blot* frente a LC3, los resultados muestran el ratio de LC3II/LC3I. Las muestras fijadas se marcaron frente a LC3, se adquirieron imágenes y se cuantificó el número de vesículas por célula mediante el uso de máscaras específicas. n=4. **p<0.05.

El CoQ10 potencia la acción de la temozolomida y la radioterapia en células U251

La radioterapia y la TMZ son, junto con la cirugía, el único tratamiento frente al GBM. Una vez observado el efecto sensibilizador del CoQ10 en células tratadas con radiación ionizante y con TMZ, se estudió el efecto sobre el tratamiento combinado de ambas terapias.

Por lo tanto, se analizó la posible interacción entre el TMZ y el CoQ10 en la citotoxicidad de la radioterapia en células U251. Los resultados indican que en células no irradiadas, el tratamiento con CoQ10 y TMZ incrementó en un 5% el número de células apoptóticas con respecto a células tratadas solo con TMZ. A una

dosis de 2 Gy el CoQ10 y la TMZ, de forma independiente, incrementan el número de células apoptóticas en un 5 y 9% respectivamente, mientras que el tratamiento combinado de TMZ y CoQ10 incrementa la apoptosis inducida por radioterapia un 15%, con respecto a células tratadas con vehículo. A una dosis de 4 Gy, el CoQ10 y la TMZ, de forma independiente, incrementan el número de células apoptóticas en un 13 y 17% respectivamente, mientras que el tratamiento combinado de TMZ y CoQ10 incrementa la apoptosis inducida por radioterapia un 28%, con respecto a células tratadas con vehículo (Figura 4.15). Estos resultados muestran un efecto aditivo del CoQ y de la TMZ en el incremento de la apoptosis inducida por la radiación, sugiriendo que ambos compuestos actúan por vías independientes.

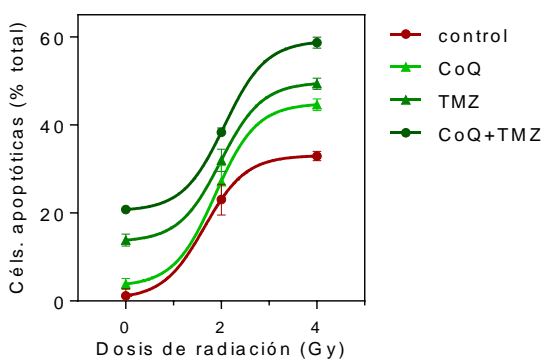


Figura 4.15. El tratamiento con CoQ10 y TMZ potencia el efecto de la radioterapia en células U251. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24h, posteriormente con 50 μ M de TMZ o vehículo (DMSO) durante otras 24h y después fueron irradiadas. La apoptosis se determinó a 72h tras la irradiación. Los resultados muestran el promedio del % de células apoptóticas frente al total de células por campo. n=3.

Capítulo V. El CoQ10 regula la proliferación, motilidad y capacidad invasiva de células de GBM U251 *in vitro* e *in vivo*

Las células de GBM se caracterizan por una elevada motilidad y capacidad invasiva siguiendo gradientes quimiotácticos (Paw, Carpenter et al. 2015). Esto implica cambios o reorganizaciones del citoesqueleto y alteraciones en la interacción y degradación de componentes de la matriz extracelular (Paw, Carpenter et al. 2015). Estos procesos celulares tienen una regulación compleja, donde tienen un papel principal el factor de transcripción HIF-1 α (Shi, Zheng et al. 2015) y los diversos cambios metabólicos que pone en marcha (Meijer, Kaanders et al. 2012), así como como las de la quinasas Akt, Erk y AMPK, también implicadas en el control metabólico, la supervivencia y la evasión de la apoptosis (Wang, Zhan et al. 2014).

El CoQ10 reduce la viabilidad y capacidad proliferativa de células de GBM *in vitro*

El GBM presenta una serie de alteraciones del metabolismo energético intermediario que le permite una gran capacidad proliferativa. En estos cambios metabólicos la mitocondria y las ROS juegan un papel clave (Murphy 2009, Levine and Puzio-Kuter 2010). Dado que el CoQ10 reduce los niveles de ROS en células de GBM, cabe esperar que regule procesos metabólicos y que éstos influyan en procesos celulares como la proliferación.

Según estos antecedentes, en primer lugar se estudió el efecto del CoQ10 sobre la proliferación celular. Se realizaron ensayos de conteo en cultivos celulares tratados con 5 μ M de CoQ10 y vehículo durante 48h, en los que posteriormente se cuantificó mediante ICC el nivel del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Los resultados indican un descenso significativo del 17 % en el número de células totales por pocillo ($p < 0.05$) (Figura 5.1 A) y de un 15% en la intensidad de marcaje del PCNA en respuesta al tratamiento con CoQ10 (Figura 5.1 B). Mediante tinción con Hoescht, se analizó el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular. La morfología de los núcleos indicó que el tratamiento con CoQ10 de 72 horas, disminuyó significativamente la viabilidad celular por un aumento de la apoptosis ($p < 0.001$) (Figura 5.1 C).

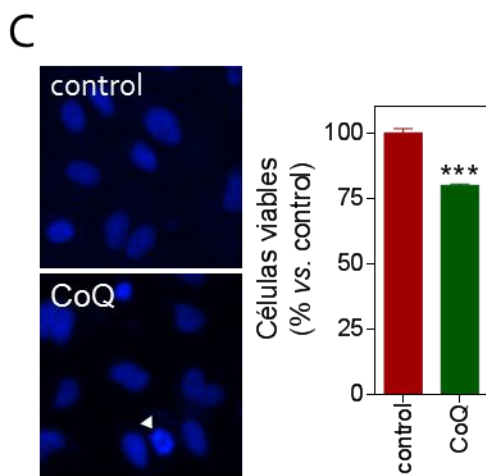
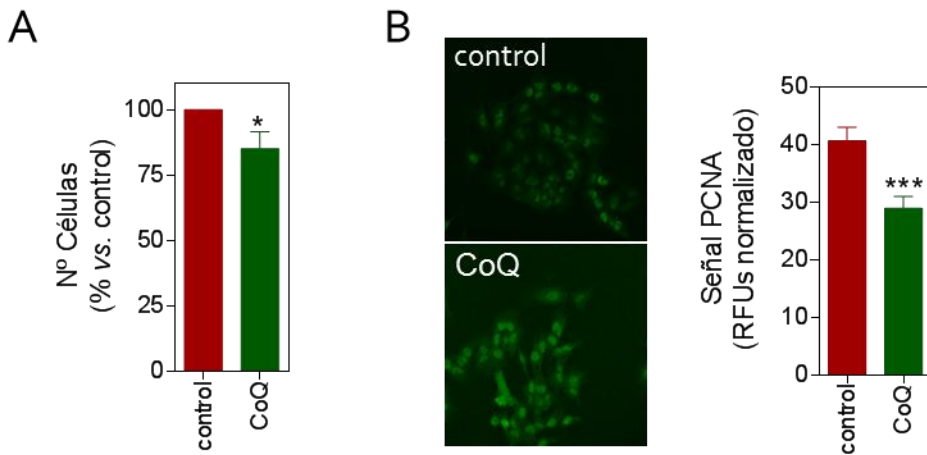


Figura 5.1. El CoQ₁₀ reduce la proliferación y viabilidad de células U251. Las U251 se incubaron durante 48/72 h con 5µM de CoQ₁₀. Se cuantificó el número de células (A). Los resultados se muestran como el porcentaje del número de células vs. control. El estudio de proliferación (B) se llevó a cabo por inmunocitoquímica y microscopía de fluorescencia, mediante el marcaje frente a PCNA y la cuantificación de señal utilizando ImageJ. Los resultados se muestran como el porcentaje de variación de fluorescencia vs. control. La muerte celular se cuantificó por el análisis morfológico (flecha blanca) de núcleos marcados con Hoescht, los resultados aparecen como porcentaje de células viables vs. control. n=3. Los resultados son la media ± SEM. ***p<0.001.

El CoQ₁₀ reduce el nivel de HIF-1α en células U251

HIF-1α está regulado por O₂, tanto en condiciones de hipoxia como de normoxia (Dewhirst, Cao et al. 2008). Un incremento en los niveles de ROS inhibe la degradación proteosomal de la subunidad α de HIF-1, estabilizándola (Meijer, Kaanders et al. 2012). HIF-1α actúa sobre numerosos genes relacionados con proliferación celular, migración e invasión, resistencia a terapias, etc. (Meijer, Kaanders et al. 2012).

Se analizó el nivel de HIF-1α en respuesta a CoQ₁₀ en células de humanas de GBM U251, mediante ICC y *Western blot*. Mediante ICC, se observó como el tratamiento con 5µM de CoQ₁₀ disminuyó significativamente en un 25% el nivel de HIF-1α a 24h (p<0.01), mantenido tras 48h desde el tratamiento (p<0.001) (Figura 5.2 A). De hecho, esta reducción es estable incluso tras 7 días desde el tratamiento,

observándose esta reducción significativa del 25% ($p < 0.05$) (Figura 5.2 A). El efecto del CoQ10 sobre el nivel de HIF-1 α es moderado, pero estable.

Mediante *western blot* se han obtenido resultados similares; el tratamiento con CoQ10 reduce significativamente en un 25% ($p < 0.05$) el nivel de HIF-1 α a 24h, mientras que a tiempos posteriores esta reducción es ligeramente mayor, entorno al 30% ($p < 0.05$) (Figura 5.2 B).

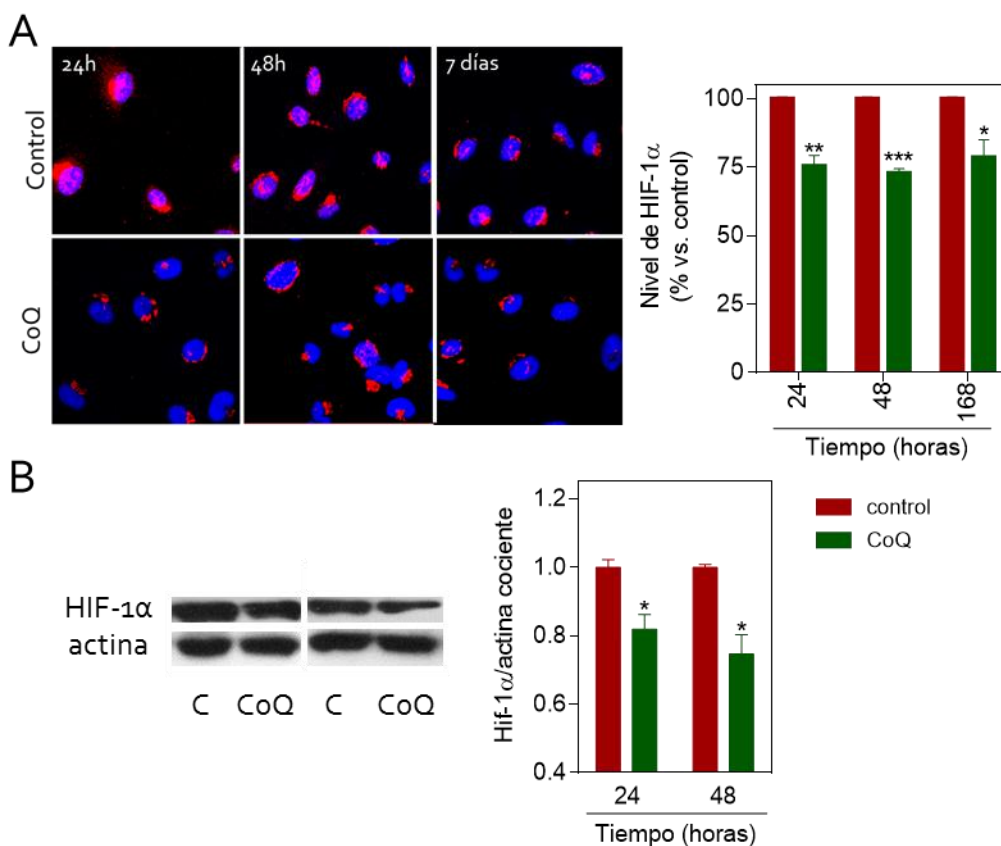


Figura 5.2. El CoQ10 reduce el nivel de HIF-1 α en células U251. Las células se incubaron durante 24/48/168h con 5 μ M de CoQ10. El nivel de HIF-1 α se determinó mediante inmunocitoquímica en células fijadas (A). Los resultados se muestran como el porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia vs. control (n=3). De forma complementaria, el nivel de HIF-1 α se determinó mediante western blot (B) y el posterior análisis densitométrico, utilizando actina como control interno. Los resultados se muestran como cociente de la intensidad de HIF-1 α /actina frente a células tratadas con vehículo (control; n=3). Los resultados se muestran como el promedio \pm SEM. N=4 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

El CoQ10 induce la remodelación metabólica de células U251

Uno de los efectos de HIF-1 α es la remodelación del metabolismo desde la fosforilación oxidativa hacia la glicolisis, aeróbica o anaeróbica o efecto Warburg (Meijer, Kaanders et al. 2012).

El impacto del CoQ10 sobre el metabolismo se abordó con una aproximación metabolómica basada en resonancia magnética nuclear, como en apartados previos incluidos en la presente Tesis Doctoral (Capítulo II y Capítulo IV del apartado "Resultados").

Los resultados, como se indica en apartados anteriores, muestran que el tratamiento con 5 μ M de CoQ10 reduce el nivel de lactato intracelular en un 35% respecto a células tratadas con vehículo (Figura 5.3). Este descenso indica un cambio en el metabolismo de la célula tumoral tratada con CoQ10.

También destaca el descenso significativo, en células tratadas con CoQ10, de aminoácidos esenciales como la colina ($p < 0.05$), serina ($p < 0.01$), glicina ($p < 0.01$), tirosina ($p < 0.05$), isoleucina ($p < 0.01$), valina ($p < 0.001$), lisina ($p < 0.01$), glutamina ($p < 0.05$), etc. (Figura 5.3). También se ha observado un descenso en los niveles de UDP ($p < 0.01$) o de succinato ($p < 0.05$) (Figura 5.3).

De hecho, la reducción en el nivel de estos metabolitos se traduce en una bajada significativa en el contenido en ATP de más de un 60% ($p < 0.05$) (Figura 5.3), lo que comprometería el estado energético de las células tumorales.

Estos estudios se realizaron en colaboración con la Dra. María Victoria Gómez Almagro (Dpto. Química Orgánica, UCLM).

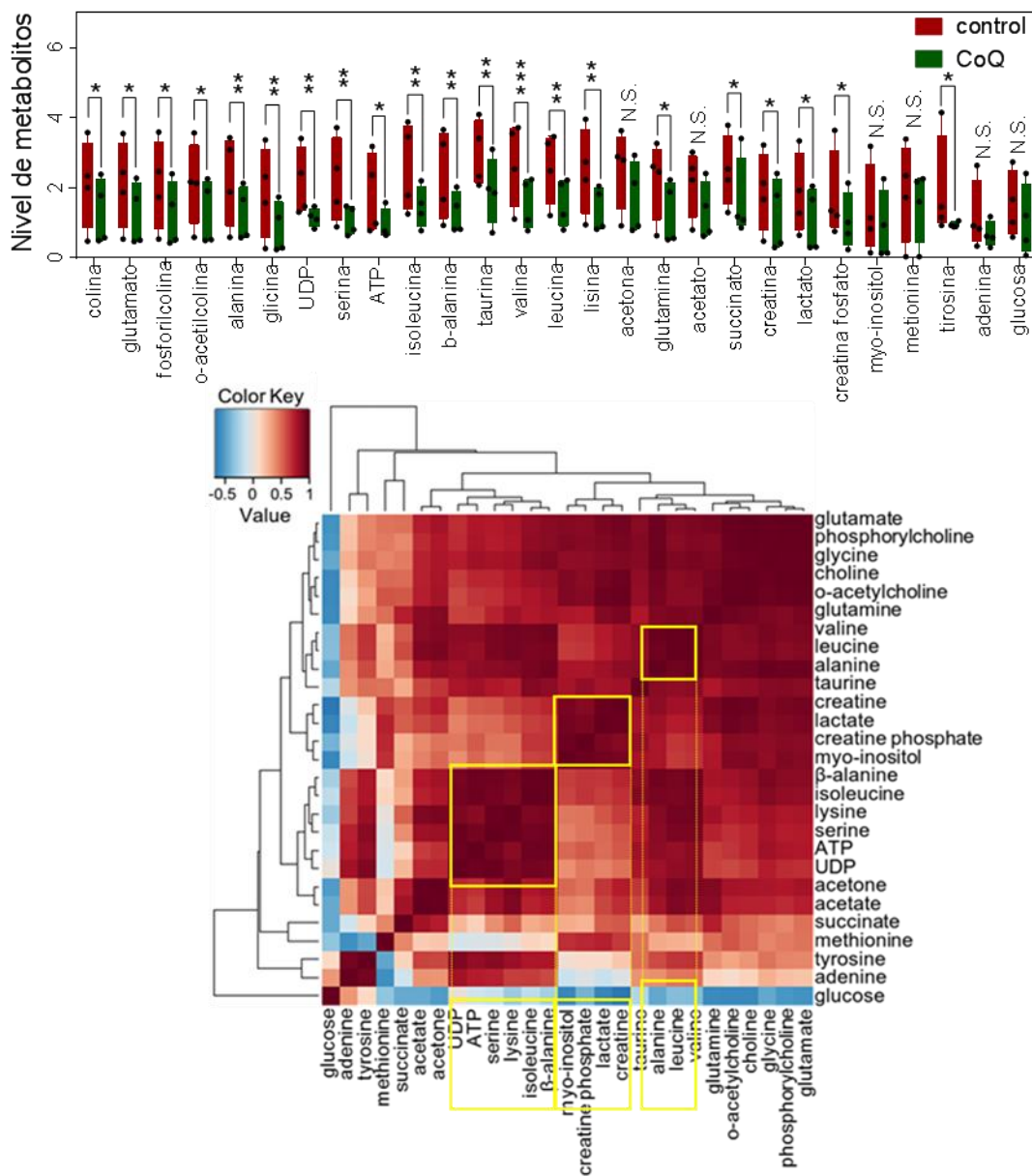


Figura 5.3. Efecto del CoQ sobre el metaboloma de células U251. Las U251 fueron incubadas durante 48 con CoQ 5μM. Para la determinación metabolómica las células fueron procesadas y se realizó la RNM utilizando un “Varian VNMRS-400”. El espectro obtenido se procesó utilizando Mestrenova (Mestrelab Research) y Chenomis Profiler (Chenomx Inc.). El análisis se realizó utilizando el software libre MEV 4.9 (www.tm4.org/mev.html). Los resultados se muestran como el nivel de cambio de campo (fold change) vs. control (n=4). Los resultados son la media ± SEM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

El CoQ10 no modifica los niveles de Glut1 en células U251

En el apartado anterior se vio como el tratamiento con CoQ10 reducía el nivel de metabolitos clave, sugiriendo una alteración en el metabolismo glicolítico característico del GBM. No se observaron cambios en el nivel de glucosa, para corroborar este resultado se realizó un *Western blot* frente a Glut1, el principal transportador de glucosa en GBM, que está directamente relacionado con un incremento en el nivel de glucosa intracelular. Se observó como el nivel de este transportador no se alteró en células tratadas con CoQ10 durante 24 horas.

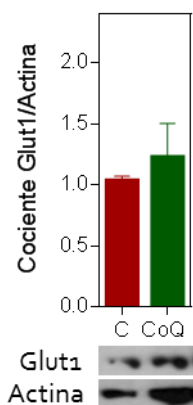


Figura 5.4. El CoQ10 no regula el nivel de Glut1. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24. Los niveles de Glut1, se determinaron por *Western blot* y análisis densitométrico utilizando actina como control interno. Los resultados se muestran como cociente de la intensidad de Glut1/actina frente a células tratadas con vehículo. n=3.

El CoQ10 incrementa el consumo de oxígeno asociado al complejo II mitocondrial en células U251

El descenso en los niveles de ATP observados en el apartado anterior, sugiere que se está afectando la glicolisis y la fosforilación oxidativa. Para comprobarlo determinamos el consumo de oxígeno sobre células U251 tratadas con CoQ10 5 μ M durante 48h. El consumo se cuantificó con un electrodo tipo *Clark Oxytherm* y con la adición de diferentes inhibidores de los complejos. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la respiración endógena y la respiración desacoplada (Figura 5.4 A), mientras que si se vio un incremento significativo del 30% en el consumo de oxígeno asociado al complejo II mitocondrial ($p < 0.05$) (Figura 5.4 B). Estos experimentos se han realizado en colaboración con el Dr. Gustavo Ferrín (Instituto de Investigación Biomédica Maimónides, Córdoba).

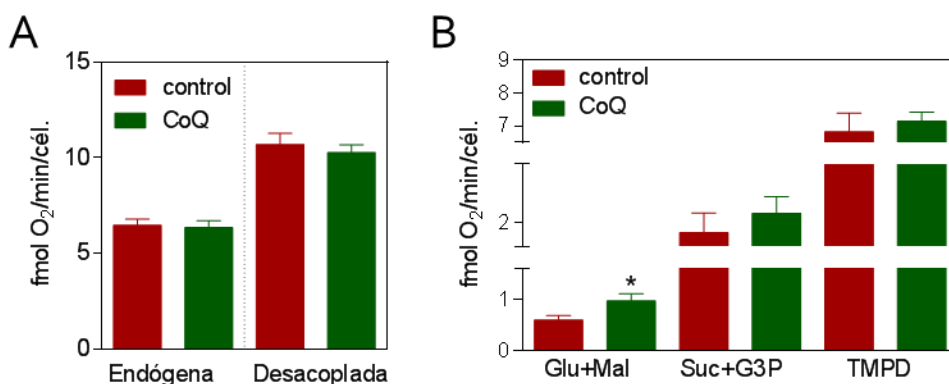


Figura 5.4. El CoQ incrementa el consumo de oxígeno asociado al complejo II mitocondrial. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 48h. El consumo de oxígeno se determinó usando un electrodo tipo *Clark Oxytherm*. Se analizó la respiración endógena y desacoplada (A) y se estudió el consumo asociado a los diferentes complejos mitocondriales mediante la adición de inhibidores para el Complejo I (5 mM Glutamato más 5 mM Malato, y 2 μ M Rotenona), Complejo II + III (5 mM Succinato más 5 mM Gliceraldehido-3-P, y 0.1 μ M Antimicina A) y Complejo IV (1.2 mM TMPD, y 6 mM KCN) (B). Los resultados muestran el promedio del consumo en fmolO₂/min/cél. N=3; *p<0.05.

El CoQ10 regula la fosforilación de las quinasas Akt, Erk1/2, AMPK

Las alteraciones en los niveles de HIF-1 α y del balance energético provocadas por el tratamiento con CoQ10 en células U251 deben estar relacionadas con el estado de activación de quinasas clave como Akt, Erk y AMPK. Estas quinasas forman parte de las principales rutas de activación que favorecen los principales sellos de identidad del GBM (Chiu, Shen et al. 2010, McDowell, Riggins et al. 2011, Rios, Foretz et al. 2013). Akt fosforilado aparece incrementado en líneas celulares y muestras humanas de GBM (McDowell, Riggins et al. 2011). La ruta de Akt está relacionada con alteraciones en proliferación, migración e invasión y resistencia a terapias en GBM (McDowell, Riggins et al. 2011), lo mismo ocurre con Erk (Chiu, Shen et al. 2010) y con AMPK (Rios, Foretz et al. 2013). Además de sus funciones sobre proliferación, migración y resistencia a terapias, la activación de estas quinasas estabiliza HIF-1 α (Dewhirst, Cao et al. 2008). Basado en estas premisas, decidimos estudiar el estado de fosforilación de Akt, Erk y AMPK.

El ensayo de fosforilación de quinasas se realizó mediante *western blot*, cuantificando el nivel de proteína fosforilada frente al nivel de proteína total. Se observó un descenso en el nivel de Akt 1,2,3 de más del 50% tras 24h de tratamiento con CoQ10 (p<0.05) y no significativo a las 48h (Figura 5.5 A y D).

De forma similar, para Erk 1/2 se observó un descenso significativo del 30% tras el tratamiento de 24h con CoQ10 (p<0.05) perdiéndose la significación a 48h (Figura 5.5 B y D).

Finalmente estudiamos los niveles de AMPK observando descenso significativo del 25% tras 24h de tratamiento con CoQ10 ($p < 0.05$) y uno descenso no significativo a las 48h (Figura 5.5 C y D).

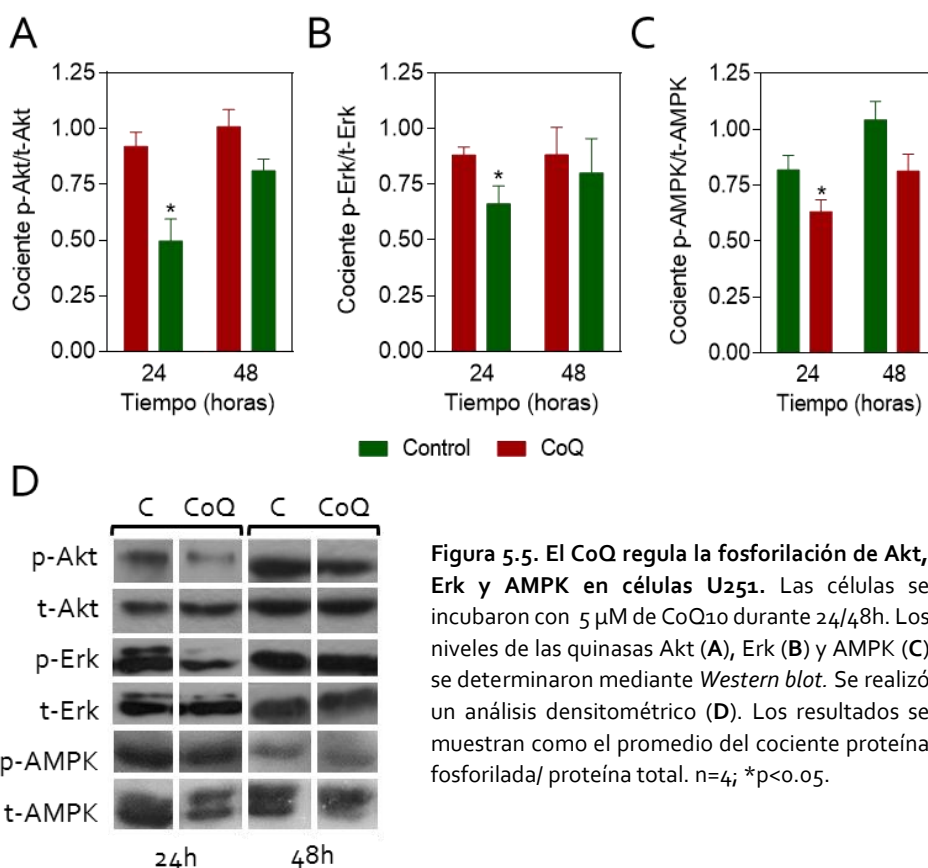


Figura 5.5. El CoQ regula la fosforilación de Akt, Erk y AMPK en células U251. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24/48h. Los niveles de las quinasas Akt (A), Erk (B) y AMPK (C) se determinaron mediante *Western blot*. Se realizó un análisis densitométrico (D). Los resultados se muestran como el promedio del cociente proteína fosforilada/ proteína total. $n=4$; $*p < 0.05$.

El CoQ10 reduce el nivel de PFKP en células U251

La glucólisis es un proceso de obtención energético formado por 10 pasos en los que intervienen más de 15 enzimas, varias de ellas son clave para que se desarrolle de forma adecuada (Sanzey, Abdul Rahim et al. 2015). Entre ellas, destaca la PFKP (isoforma plaquetaria de la fosfofructoquinasa) que se ha visto que favorece el crecimiento en células de GBM (Sanzey, Abdul Rahim et al. 2015). Esta quinasa está regulada por hipoxia y se activa por AMPK (Domenech, Maestre et al. 2015). Nuestros resultados relacionados con cambios metabólicos y con los niveles de AMPK sugieren que puede estar alterada en células tratadas con CoQ10.

El estudio de los niveles de PFKP se hizo por *Western blot*. Los resultados muestran como en células tratadas con CoQ10 48 horas hay un descenso significativo en los niveles de PFKP del 20% ($p < 0.01$) (Figura 5.6). En células tratadas durante 24 horas se observó un descenso no significativo del 15% (Figura 5.6).

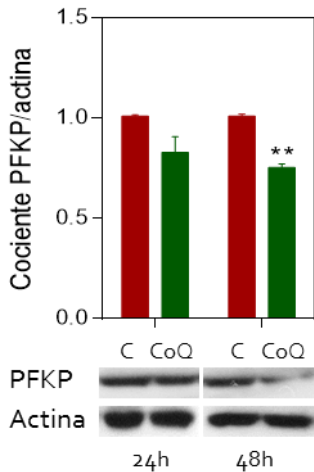


Figura 5.6. El CoQ10 regula el nivel de PFKP. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24/48h. Los niveles de PFKP, se determinaron por *Western blot* y análisis densitométrico utilizando actina como control interno. Los resultados se muestran como cociente de la intensidad de PFKP/actina frente a células tratadas con vehículo. n=4; **p<0.01.

El CoQ10 disminuye la motilidad e invasión de células de GBM *in vitro*

HIF-1 α , Akt y Erk regulan la motilidad e invasión en GBM (Dewhirst, Cao et al. 2008, Chiu, Shen et al. 2010, Wang, Zhan et al. 2014). El incremento en los niveles de ROS está asociado a un incremento en la formación de *invadopodia*, estructuras clave en la motilidad celular (Mallawaarachy, Buckland et al. 2015). Por lo tanto el tratamiento con CoQ10 podría reducir la motilidad y capacidad invasiva de células de GBM a través de la modulación de los niveles de ROS, de HIF-1 α , rutas de señalización y metabolitos clave.

Las células U251 se trataron con 5 μ M de CoQ10 durante 48h. La migración se analizó por el método de "reparación de herida", por el cual se traza una cruz sobre una monocapa de células y se cuantifica el área abierta (no invadida) 24h después. Mediante esta técnica se observó un descenso del 30% en el área abierta, lo que se traduce como una menor motilidad en células tratadas con CoQ10 (Figura 5.7 A). Estas mismas células se fijaron y se marcó el citoesqueleto de actina mediante ICC para analizar la formación de *lamelipodia*. Mediante esta técnica se observó un descenso en el número de células con estas estructuras tras el tratamiento con CoQ10 (Figura 5.7 B).

Con el objetivo de favorecer la migración e invasión, las células de GBM desarrollan una serie de estructuras especializadas, como los ya mencionados *lamelipodia* (Machesky 2008, Li, Xu et al. 2014, Djuzenova, Fiedler et al. 2015, Mallawaarachy, Buckland et al. 2015):

- *Lamelipodia*: estructuras polarizadas de actina relacionadas con la dirección del movimiento (quimiotaxis).
- *Filopodia*: estructuras de anclaje asociadas a las adhesiones focales.

- Fibras de estrés: haces contráctiles utilizados durante la extensión y retracción de la célula en movimiento.
- *Invadopodia*: son estructuras donde se acumulan y secretan las MMPs que van a degradar el sustrato.

Para el análisis de estas estructuras se trataron las U251 con $5\mu\text{M}$ de CoQ10 48h y se marcaron con *ActinRed* con el objetivo de marcar el citoesqueleto de actina. Se adquirieron imágenes y se vio que en células tratadas con CoQ10 había un menor número de todas estas estructuras (Figura 5.7 C).

La invasión celular se determinó mediante una cámara de microquimiotaxis (cámara de Boyden), utilizando membranas de policarbonato recubiertas con Matrigel y medio de cultivo con FBS como quimioattractor, siendo el control negativo, medio de cultivo sin FBS. Tras tratar las células con $5\mu\text{M}$ de CoQ10, se observó un descenso en la quimioatracción de células del 35% y 45% en células tratadas durante 24 y 48h respectivamente (Figura 5.8 A).

Por lo tanto, hasta el momento hemos visto como las células de GBM tratadas con CoQ10 tienen la capacidad de migración reducida, presentando un menor número de estructuras de actina que favorecen la motilidad celular. Como además se reduce la invasión, puede que se esté afectando la capacidad de degradar gelatina y la actividad metaloproteasa (MMP).

Las células deben degradar la matriz extracelular, para lo cual es clave la función de las MMPs, enzimas proteolíticas que aparecen sobreexpresadas en GBM. Estas metaloproteasas, con actividad gelatinasa y colagenasa (entre otras) son secretadas en los invadopodia por las células de GBM al medio extracelular, e inician la degradación de la matriz (Paw, Carpenter et al. 2015). Para estudiar la degradación se utilizaron dos aproximaciones. En primer se determinó la capacidad de degradar gelatina fluorescente. Se observó un descenso significativo del 60% en la capacidad de degradar gelatina en células tratadas con CoQ10 durante 48h ($p < 0.05$) (Figura 5.8 B). Se utilizó un sustrato fluorescente y microscopía de epifluorescencia. Por otra parte, se determinó la actividad la MMP2 y MMP9 mediante el kit *EnzCheck* y la determinación fluorimétrica, observando un descenso significativo, de más del 70%, en el ratio de la actividad de dichas enzimas, en células tratadas con CoQ10 durante 48h ($p < 0.05$) (Figura 5.8 C).

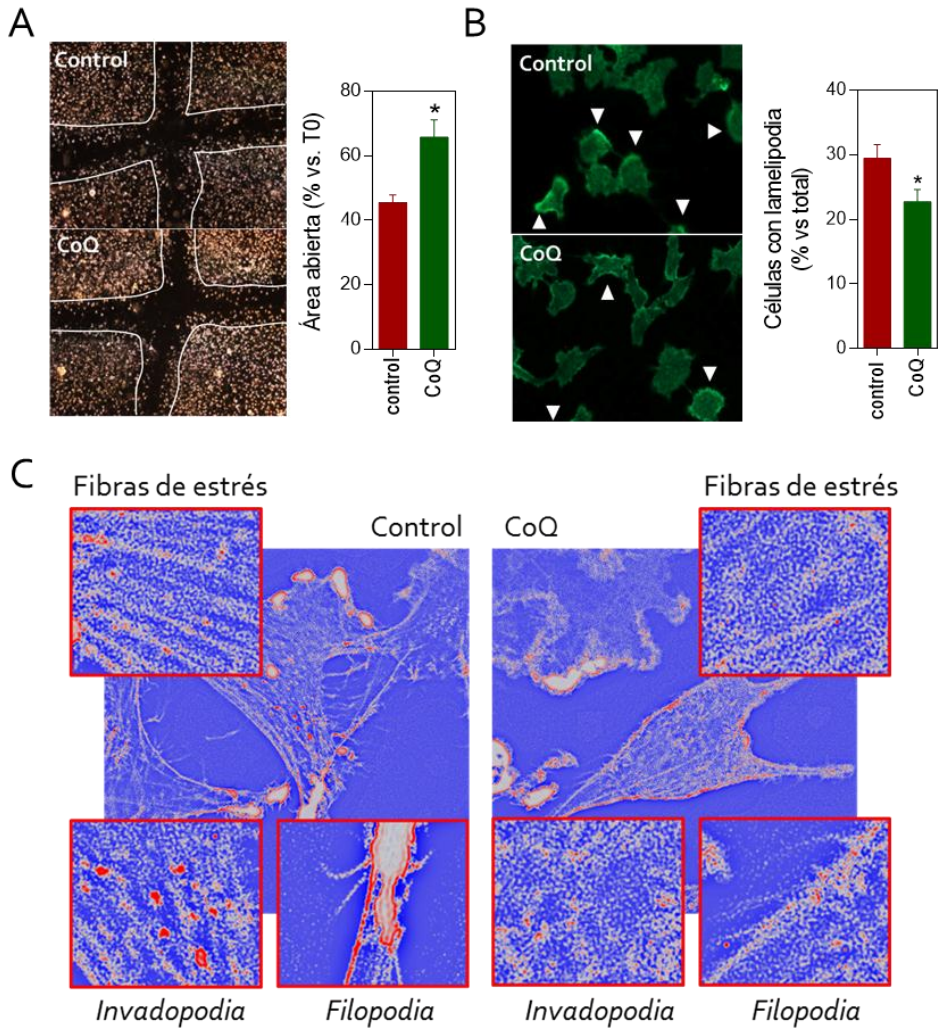


Figura 5.7. El CoQ10 reduce la motilidad de células U251, *in vitro*. Las células se incubaron con 5 μ M de CoQ10 durante 24/48h. La migración se analizó por el método de "reparación de herida", cuantificando el área abierta tras 24h (A). Los resultados muestran el porcentaje de área abierta vs. To. El estudio se complementó con un marcaje de lamelipodia por ICC frente a actina (B) Los resultados aparecen como el porcentaje del nº de células polarizadas por campo. Para el estudio de las estructuras de motilidad se hizo una tinción con ActinRed y se adquirieron imágenes con un microscopio de epifluorescencia (C). N=3, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

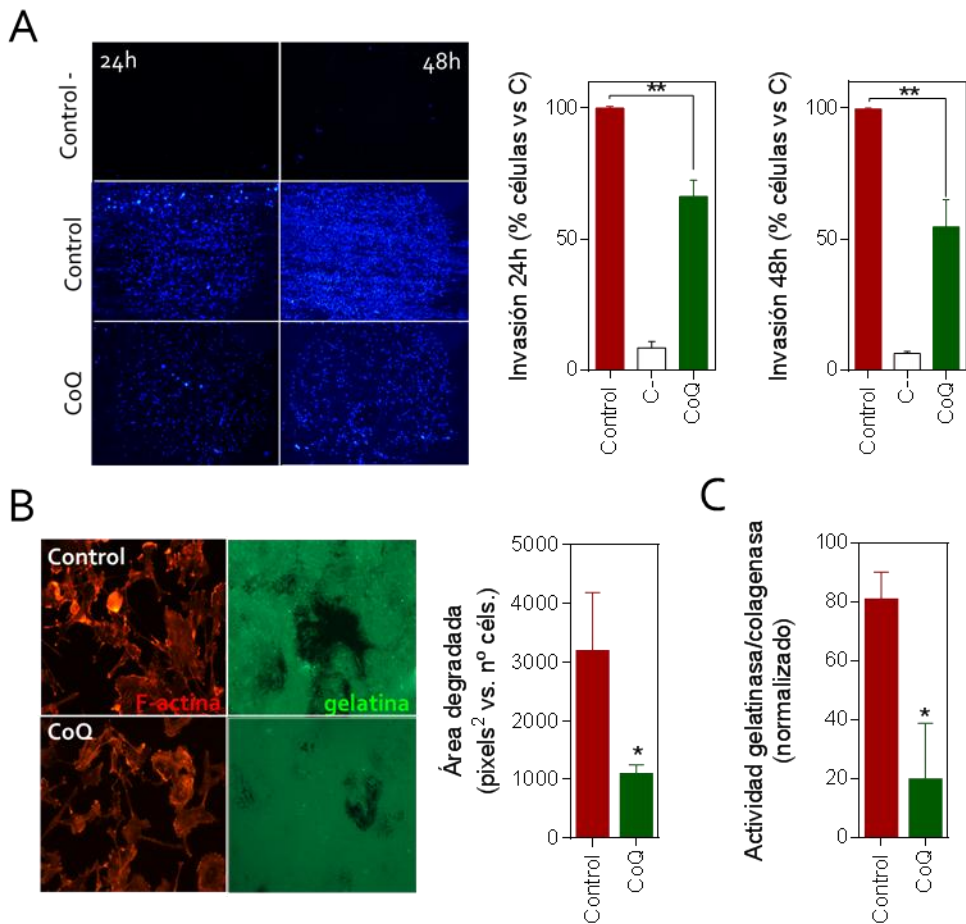


Figura 5.8. El CoQ10 reduce la capacidad invasiva de células U251. Las células se incubaron con 5 μM de CoQ10 durante 24/48h. La capacidad invasiva se determinó con una cámara de microquimiotaxis, utilizando membranas de policarbonato recubiertas con Matrigel (A). Los resultados muestran el porcentaje de células que han atravesado la membrana. La degradación de la matriz se estudió mediante un ensayo de actividad gelatinasa (B). Los resultados muestran el área degradada vs. nº de células. También se estudió mediante un ensayo enzimático (C). Los resultados muestran el ratio normalizado de actividad gelatinasa/colagenasa. N=3; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$.

El CoQ10 induce cambios morfológicos en células de GBM, *in vitro*

Las alteraciones observadas en la motilidad e invasión de células de GBM en respuesta al CoQ10 podrían traducirse en una alteración de su morfología. Un fenotipo celular redondeado, pero viable, es indicativo de un citoesqueleto no polarizado y por tanto, de una menor capacidad migratoria. Mediante un análisis morfológico se determinó el cociente (ancho/largo) de células tratadas con CoQ10 respecto a células control. Se vio un descenso significativo en dicho cociente en células tratadas con CoQ10 ($p < 0.001$), lo que implica un cambio morfológico hacia

un fenotipo más redondeado y menos motil (Figura 5.9, centro). Además se analizó el área de las células, observando un tamaño significativamente menor cuando estas se tratan con CoQ10 ($p < 0.05$) (Figura 5.9, derecha).

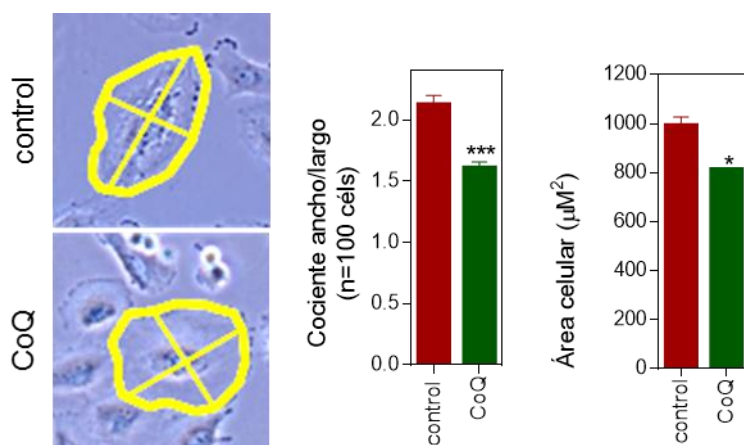


Figura 5.9. El CoQ10 induce cambios morfológicos en células U251. Las células fueron incubadas con 5 μM de CoQ10 durante 48h. El análisis de morfología celular se realizó con *ImageJ* trazando un área alrededor de cada célula y dos ejes. Los resultados muestran la media del cociente ancho/largo ($n > 100$ células). $N=3$; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

El tratamiento con CoQ10 combinado con TMZ reduce la proliferación celular y el crecimiento del tumor U251 implantado de forma subcutánea en ratones nu/nu.

Los resultados obtenidos *in vitro* condujeron a plantear aproximaciones más complejas que permitieran analizar el efecto del CoQ no solo sobre las células U251, sino también sobre su microentorno. Para ello se plantearon dos modelos, uno de xenoinplante subcutáneo y otro ortotópico, según se publicó previamente (Curtin, King et al. 2005, Candolfi, Curtin et al. 2007).

El modelo de xenoinplante se basa en la inyección de células U251 de forma subcutánea. Se hizo un grupo de ratones tratados con vehículo, un segundo grupo de ratones tratados con CoQ10, un tercer grupo tratados con TMZ y un cuarto grupo tratados con CoQ10 y TMZ. Durante 12 semanas se tomaron medidas de los tumores. El tratamiento con CoQ10 (100mg/Kg ratón) o vehículo se hizo de forma intraperitoneal desde la primera semana (Figura 5.10 A, flecha negra). Durante la octava semana se hizo el tratamiento diario con 50 mM de TMZ de forma intraperitoneal (Figura 5.10 B, flecha gris). Tras 12 semanas los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos. Tras lo cual se pesaron y se tomaron las medidas. Posteriormente los tumores fueron procesados y se cortaron en secciones de 50 μm , que se almacenaron para los diferentes estudios.

Desde la semana 5 se observó que los tumores de los ratones tratados con CoQ10 tenían un tamaño más reducido. A partir de esa semana se vio un crecimiento exponencial en los tumores de ratones vehículo, en la semana 12 se vio como los tumores de ratones tratados con CoQ10 eran un 50% más pequeños que los ratones tratados con vehículo. Además se observó cómo los tumores de ratones tratados con CoQ10 y TMZ apenas mostraron incremento en el tamaño tumoral, siendo en la semana 12 un 30% más pequeños que los tumores de ratones tratados solo con TMZ y un 70% que los tumores de ratones tratados con vehículo (Figura 5.10 A)

Para el estudio de la proliferación se cuantificó, mediante inmunohistoquímica, el número de células marcadas con Ki-67, un marcador establecido de proliferación. Se observó un descenso significativo ($p < 0.01$) del 50% en el número de células Ki67⁺ en cortes de tumores de ratones tratados con CoQ10. (Figura 5.10 B). Tras estos resultados se observó un descenso significativo del 40% en muestras de ratones tratados con CoQ y TMZ frente a ratones tratados solo con TMZ ($p < 0.001$) (Figura 5.10 B).

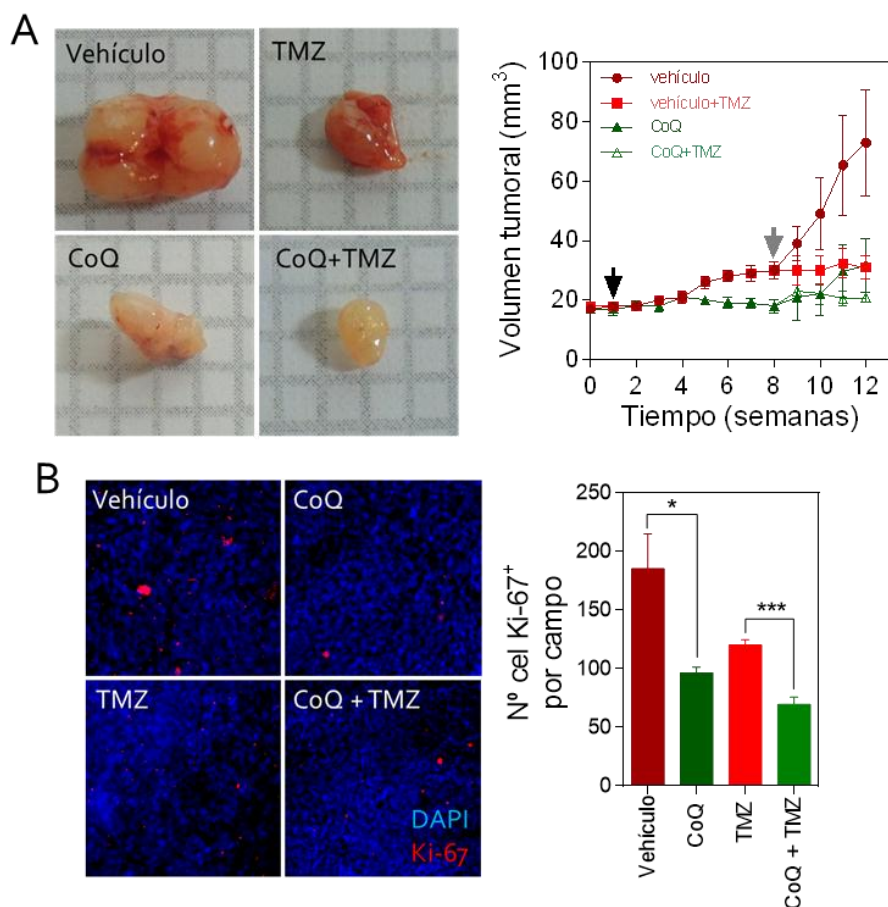


Figura 5.10. El CoQ10 reduce la proliferación y el tamaño de tumores en ratones tratados con TMZ, *in vivo*. Se desarrollaron modelos subcutáneos con células U251 en ratones nu/nu. Se monitorizó el crecimiento de los tumores durante 12 semanas (A), a partir de la semana uno se empezó a tratar a los ratones el CoQ10 (flecha negra). Durante la semana 8 se dio el tratamiento con TMZ (flecha gris). Tras 12 semanas los ratones fueron sacrificados y los tumores extraídos y procesados, se hicieron cortes de 50µM. La proliferación se cuantificó mediante inmunohistoquímica frente a Ki-67 (B). Los resultados muestran el número de células Ki-67+ por campo. N=4 control; 4 CoQ10. *p<0. 05; ** p<0. 01.

El tratamiento con CoQ10 reduce la hipoxia en modelos de xenoinplante

Ya que HIF-1α es un factor clave en el control del metabolismo y crecimiento tumoral. Se determinó la hipoxia por IHC. Para ello, antes de sacrificar a los ratones, se les inyectó pimonidazol, un compuesto que forma aductos en regiones hipóxicas, que luego pueden observarse mediante microscopía de fluorescencia utilizando un anticuerpo específico. Se observó un descenso de más del 80% en la señal hipóxica en los xenoinplantes de ratones tratados con CoQ10 (Figura 5.11

A). De hecho en 2 de 4 casos control, se observó como la fluorescencia que marcaba la hipoxia reproducía estructuras muy similares a las pseudoempalizadas características del GBM humano (Brat and Van Meir 2004). Dichas estructuras no se encontraron en ningún ratón tratado con CoQ10 (Figura 5.11 B).

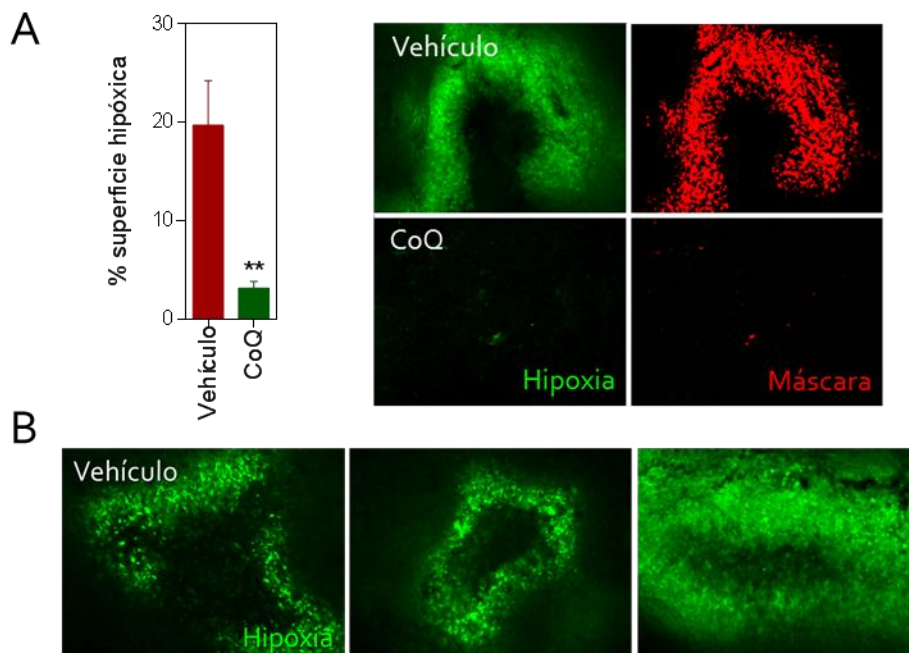


Figura 5.11. El CoQ10 reduce la hipoxia, *in vivo*. Se desarrollaron modelos subcutáneos con células U251 en ratones *nu/nu*. Con el objetivo de estudiar la hipoxia se llevó a cabo una inmunohistoquímica con el kit *Hipoxyprobe* (A). Se cuantificó el porcentaje de área ocupada por hipoxia con respecto a cada imagen, utilizando *ImageJ*. Mediante microscopía de fluorescencia se identificaron estructuras similares a pseudoempalizadas (B). $n=4$ vehículo; 3 CoQ10. $**p<0.005$.

El CoQ10 disminuye la infiltración de células de GBM *in vivo*

El modelo ortotópico se basa en la inyección intracraneal mediante estereotaxia de células U251. La inyección se hizo en el cuerpo estriado. Se hizo un grupo de ratones tratados con CoQ10 y un grupo vehículo. El tratamiento con CoQ10 o vehículo se hizo de forma intraperitoneal desde la semana 1. Tras dos meses, los ratones se sacrificaron, los cerebros se extrajeron en bloque, se fijaron y se realizaron secciones de 50 μM de grosor. Posteriormente los cerebros se procesaron y se cortaron en secciones de 50 μM , que se almacenaron para los diferentes estudios.

Las células U251 se localizaron mediante una tinción de hematoxilina y eosina y posteriormente una IHC frente a vimentina. Mediante esta técnica se determinó el

área del tumor primario y la de infiltración. Mediante cortes seriados se obtuvieron valores volumétricos.

Se observó un descenso del 40% significativo en el volumen tumoral aplicando un *Cavalieri Stimator* en los ratones tratados CoQ10 comparado con vehículo ($p < 0.05$) (Figura 5.13 A).

El siguiente paso fue estudiar la infiltración de las células tumorales en el cerebro de los ratones. Se tomaron 5 o 6 imágenes por ratón, en cada una se calculó la distancia de las 10 células más infiltradas y se calculó la media utilizando *ImageJ*. Se observó un descenso significativo en la migración máxima, en ratones tratados con CoQ10, de 0,75 mm comparado con muestras de ratones control ($p < 0.001$) (Figura 5.12 B, C). Además, se tomaron como referencia las células que más se infiltraron para determinar un área máxima de infiltración en cada imagen. Mediante un *Cavalieri Stimator* se usaron todas las imágenes por ratón y se calculó el volumen máximo de infiltración, se observó que los ratones tratados con CoQ10 tenían un volumen 10 mm³ menor de media que los tumores del grupo control (Figura 5.12 D). Además, se determinó si dentro de ese volumen máximo de infiltración había más o menos células infiltradas. Para ello y mediante el uso de máscaras se cuantificó el área total ocupada por células vimentina positivas por cada corte y se aplicó un *Cavalieri Stimator*. Se observó un descenso significativo del volumen de células infiltradas en ratones tratados con CoQ10 del 90% comparado con ratones del grupo control ($p < 0.05$) (Figura 5.12 E).

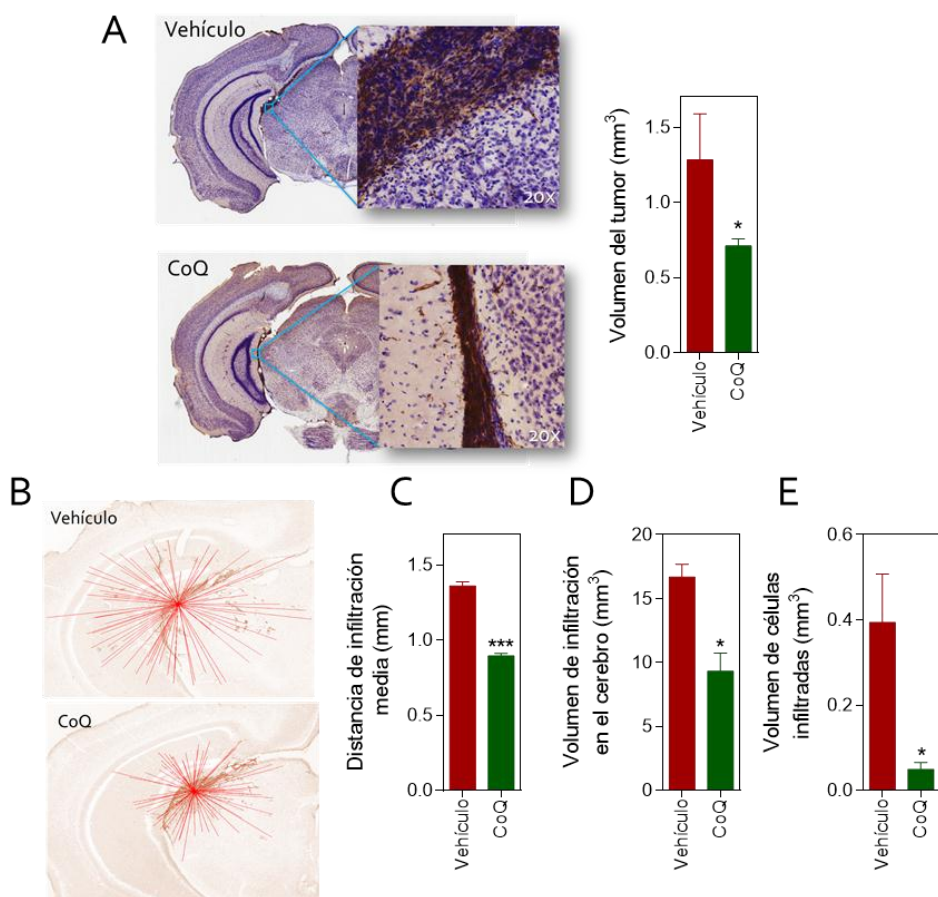


Figura 5.12. El CoQ10 desciende el volumen tumoral y la capacidad de infiltración, *in vivo*. Los animales se dividieron en dos grupos, uno tratado con CoQ10 y otro vehículo. Los tratamientos comenzaron en la semana 1 y se mantuvieron durante 9 semanas, mediante inyección intraperitoneal de CoQ10 (100mg/Kg ratón) o vehículo. Se cuantificó el área y volumen de los tumores mediante inmunohistoquímica frente a vimentina humana sobre cortes seriados (A), y se cuantificó la infiltración celular máxima sobre las imágenes con el *ImageJ* (B, C). Los resultados muestran la distancia media en mm. Se estimó el volumen de infiltración máxima (D) y el volumen total de células infiltradas (E). Los resultados muestran el volumen medio en mm³. n=4 vehículo; 5 CoQ10. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Capítulo VI. El CoQ10 regula la angiogénesis e inflamación en GBM *in vitro* e *in vivo*

Estudios recientes muestran como la capacidad invasiva de las células de GBM viene regulada por el microambiente tumoral, donde juegan un papel clave la vasculatura y las células inflamatorias infiltradas (Charles, Holland et al. 2012). Estos procesos inflamatorios y angiogénicos, a su vez, están muy relacionados con la sobreexpresión HIF-1 α (Dewhirst, Cao et al. 2008) y NF- κ B (Nogueira, Ruiz-Ontanon et al. 2011).

Hasta el momento nuestros resultados han mostrado como el CoQ10 reduce los niveles de HIF-1 α afectando directamente a la capacidad migratoria e invasiva y al crecimiento de las células tumorales. En este capítulo se estudiará como la regulación de los niveles de ROS, metabolitos y rutas clave y de HIF-1 α por parte del CoQ10 puede modular procesos inflamatorios y pro-angiogénicos.

El CoQ10 reduce la angiogénesis *in vitro*

El GBM es el tipo de cáncer más vascularizado, por lo tanto sus células se caracterizan por su capacidad de inducir angiogénesis (Lorger 2012). Este proceso, que ocurre por diferentes mecanismos, suele ser aberrante y está mediado por varios factores secretados por células de GBM (Hardee and Zagzag 2012).

Para estudiar el efecto del CoQ10 en la angiogénesis inducida por células de GBM utilizamos aproximaciones *in vitro* e *in vivo*. En primer lugar se utilizó un modelo de angiogénesis *in vitro*, basado en la adición de medios condicionados de células U251 tratadas con CoQ10 5 μ M durante 48h y células control, a células endoteliales humanas (HUVECs). Mediante esta aproximación, se puede estudiar el efecto de los factores secretados por las U251 en células endoteliales. Se analizó la capacidad de proliferar, migrar y formar tubos celulares. Se observó como las HUVECs con medios condicionados por U251 tratadas con CoQ10 formaban en torno a un 40% menos tubos celulares (Figura 6.1 A). Además se estudió la motilidad de estas células, observando que HUVECs con medios condicionados por U251 tratadas con CoQ10 migraban un 25% menos (Figura 6.1 B). Por último se determinó el número de células HUVECs, y se observó un número significativamente menor de HUVECs incubadas con medio de cultivo de U251 tratadas con CoQ10 ($p < 0.001$) (Figura 6.1 C). Estos resultados indican que el tratamiento de células de GBM con CoQ10 modula la secreción de factores angiogénicos, reduciendo los pro-angiogénicos y posiblemente aumentando los anti-angiogénicos.

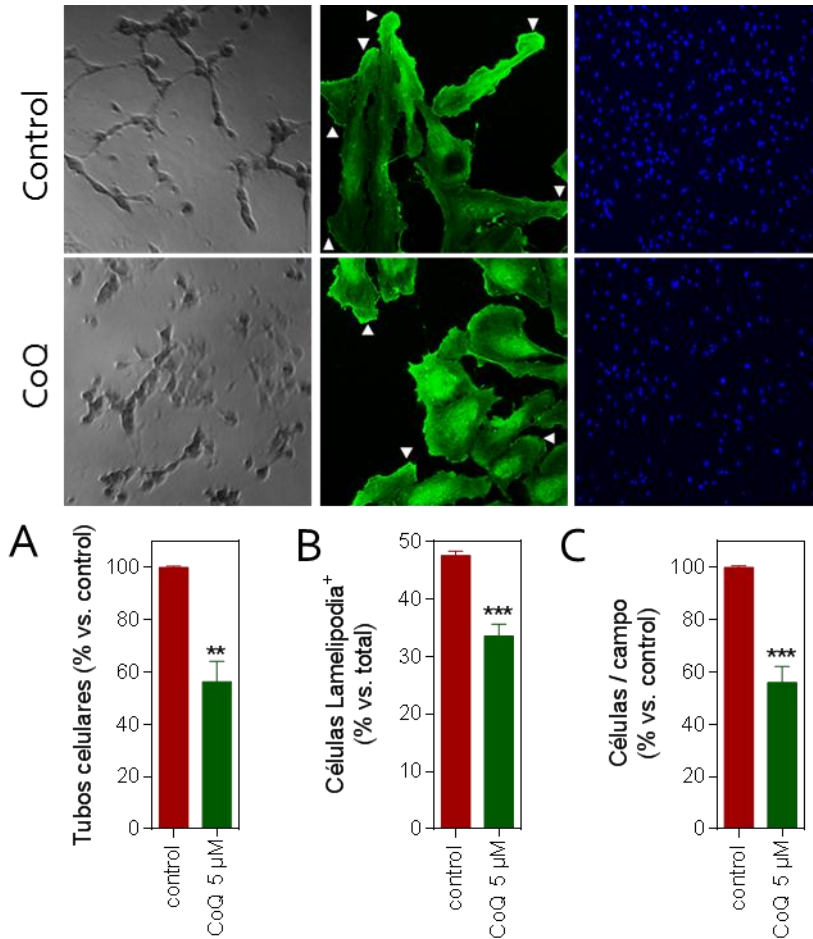


Figura 6.1. Los medios condicionados de U251 tratadas con CoQ10 reducen la angiogénesis *in vitro*. Se utilizaron medios de cultivo de células U251 (tratadas con CoQ10 y vehículo) en células HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) para analizar angiogénesis *in vitro* (A). Los resultados muestran el porcentaje de tubos celulares vs. control. Se fijaron las células y se realizó una inmunocitoquímica frente a actina para determinar el número de células con lamelipodia (B). Los resultados muestran el porcentaje de células lamelipodia⁺ vs. control. Finalmente se estudió la viabilidad de estas células (C) cuantificando el número de células. Los resultados muestran el porcentaje de células vs. control. N=4. **p<0.01;***p<0.001.

El CoQ10 reduce los niveles de NF- κ B en células de GBM humano

NF- κ B es una familia de factores de transcripción que juegan un papel clave en la respuesta inmune e inflamatoria, además regulan genes directamente relacionados con la apoptosis, crecimiento celular, desarrollo y diferenciación (Hayden and Ghosh 2008, Morgan and Liu 2011). Dicha familia está formada por cinco formas diferentes en mamíferos que pueden formar homodímeros y heterodímeros entre sí. Entre estas formas destacan NF- κ B p65 y p50 que

constituyen el heterodímero principal de la ruta canónica de este factor de transcripción (Hayden and Ghosh 2008). Normalmente se encuentra asociado a la proteína I κ B que lo mantiene en citoplasma. Cuando esta proteína recibe determinadas señales se ubiquitina y permite que NF- κ B se transloque al núcleo donde desempeña su función (Friedmann-Morvinski, Narasimamurthy et al. 2016). Uno de los principales moduladores de NF- κ B es el incremento en los niveles de ROS que induce su translocación a núcleo donde activa la transcripción proteínas de respuesta al daño oxidativo (Hayden and Ghosh 2008). Por lo tanto la regulación de los niveles de ROS por parte del CoQ10 podría estar modificando los niveles de NF- κ B y su translocación a núcleo.

Se estudió el nivel de NF- κ B por *western blot* y por inmunocitoquímica en células U251 tratadas durante 24h con CoQ10 5 μ M y vehículo (Figura 6.2). Mediante inmunocitoquímica no se observó variación en el nivel citoplasmático de ambas subunidades tras el tratamiento de 24h con CoQ10 /vehículo (Figura 6.2 A). A nivel nuclear observamos un descenso significativo de casi el 50%, en ambas subunidades, en células tratadas con CoQ10 ($p < 0.05$) (Figura 6.2 B). El cociente entre marcaje nuclear y citoplasmático también mostró un descenso en células tratadas con CoQ10 tanto en p50 como en p65 con respecto a células control ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente) (Figura 6.2 C). Este resultado indica que el tratamiento con CoQ10 además de descender el nivel de NF- κ B, también induce su retención en el citoplasma, donde es inactivo. Mediante *Western blot* se observó en células tratadas con CoQ10 un descenso significativo en los niveles totales de más de un 30% tanto en p50 como en p65 con respecto a células control ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ respectivamente) (Figura 6.2 D).

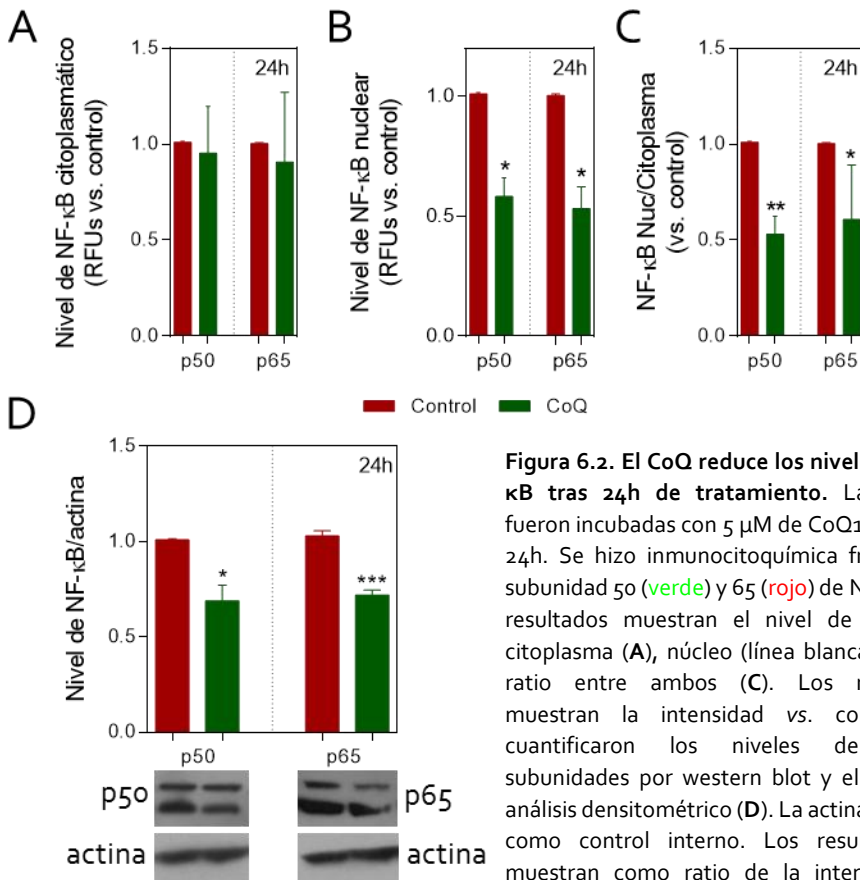
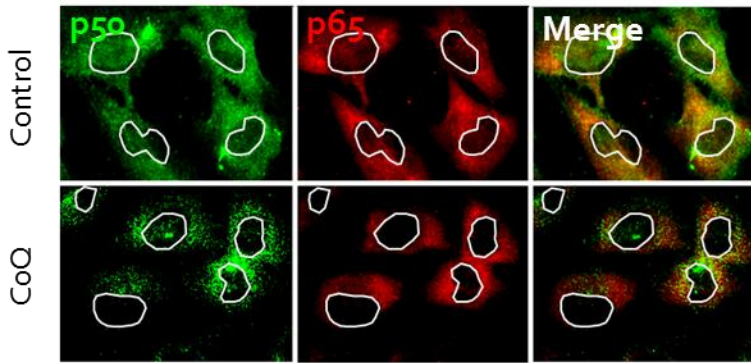


Figura 6.2. El CoQ reduce los niveles de NF-κB tras 24h de tratamiento. Las células fueron incubadas con 5 μM de CoQ10 durante 24h. Se hizo inmunocitoquímica frente a la subunidad 50 (verde) y 65 (rojo) de NF-κB. Los resultados muestran el nivel de RFUs en citoplasma (A), núcleo (línea blanca) (B) y el ratio entre ambos (C). Los resultados muestran la intensidad vs. control. Se cuantificaron los niveles de ambas subunidades por western blot y el posterior análisis densitométrico (D). La actina se utilizó como control interno. Los resultados se muestran como ratio de la intensidad vs. control. n=4/3. *p<0.01; **p<0.05; ***p<0.001

El CoQ10 reduce la secreción de factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios

La secreción de factores angiogénicos y citoquinas por parte de las células del GBM regula el microambiente tumoral y favorece el crecimiento. El efecto inhibitor del CoQ10 sobre angiogénesis e inflamación *in vitro*, indica la posible alteración de

estos factores. Por ello se desarrolló un *array* de factores solubles de los mismos medios condicionados de células U251 tratadas con CoQ10 y vehículo.

Se observó la disminución de los niveles de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) la proteína r-agouti (AgRP), leptina, el factor de crecimiento placentario (PIGF) y la angiogenina (Figura 6.3). No se observaron diferencias significativas en el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), en la angiopietytina 2 ni en la angiopoyetina *like 4*. Además se observó un incremento en el nivel del factor activina A en medios de células U251 tratadas con CoQ10 (Figura 6.3). Esta proteína de la superfamilia de TGF- β actúa como supresor tumoral en células de cáncer de mama (Taylor, Loomans et al. 2015). Este patrón de disminución de factores pro-angiogénicos coincide el descenso de la angiogénesis *in vitro* observado en el apartado anterior.

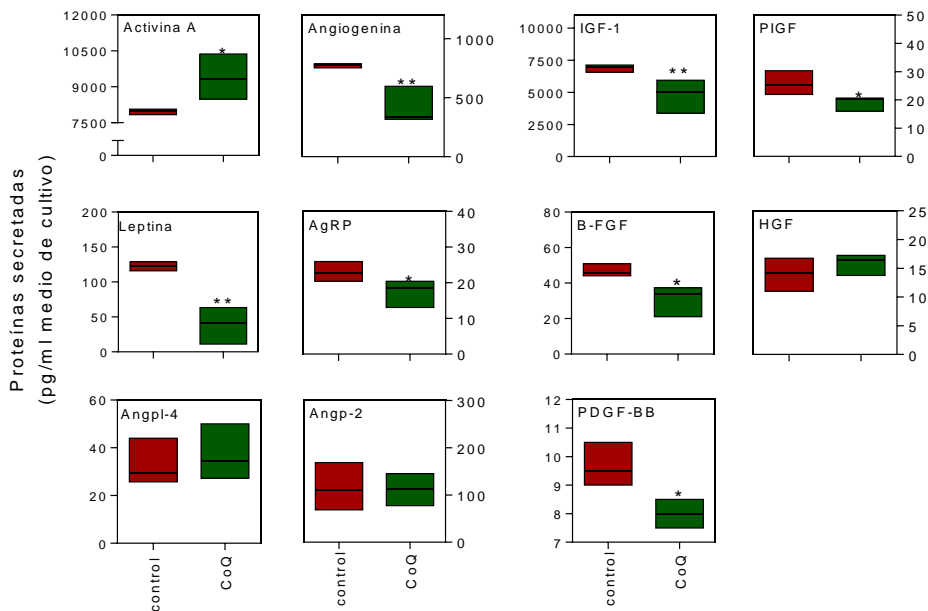


Figura 6.3. La secreción de factores angiogénicos se reduce por el tratamiento con CoQ10. Se utilizaron medios de cultivo de células U251 (tratadas con CoQ y vehículo) para analizar mediante *array* de proteínas (RayBiotech) los niveles de factores secretados. Los resultados se muestran como pg/mL de medio de cultivo. N=4. *p<0.01 **p<0.05.

Una regulación de factores relacionados con la angiogénesis va acompañada de la regulación de factores relacionados con procesos inflamatorios, por lo que también estudiamos la secreción de citoquinas y factores inflamatorios. Observamos que los medios condicionados de células tratadas con CoQ10 presentaban un incremento significativo en el nivel de la interleuquina-1 α (p<0.05), acompañado de un descenso de factores pro-inflamatorios clave como las

interleuquinas 2, 6 y 17, el interferón γ (IFN γ), el inhibidor de la metalopeptidasa 1 (TIMP-1), la proteína 10 inducida por el IFN γ (IP-10), la proteína de quimioatracción de monocitos 1 (MCP-1) y RANTES (Figura 6.4). No se observaron diferencias en los factores de necrosis tumoral α y β (TNF α y β), interleuquina 8 (IL-8), factor estimulante del crecimiento (GRO), factor inhibidor de leucemia (LIF) ni en el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Figura 6.4).

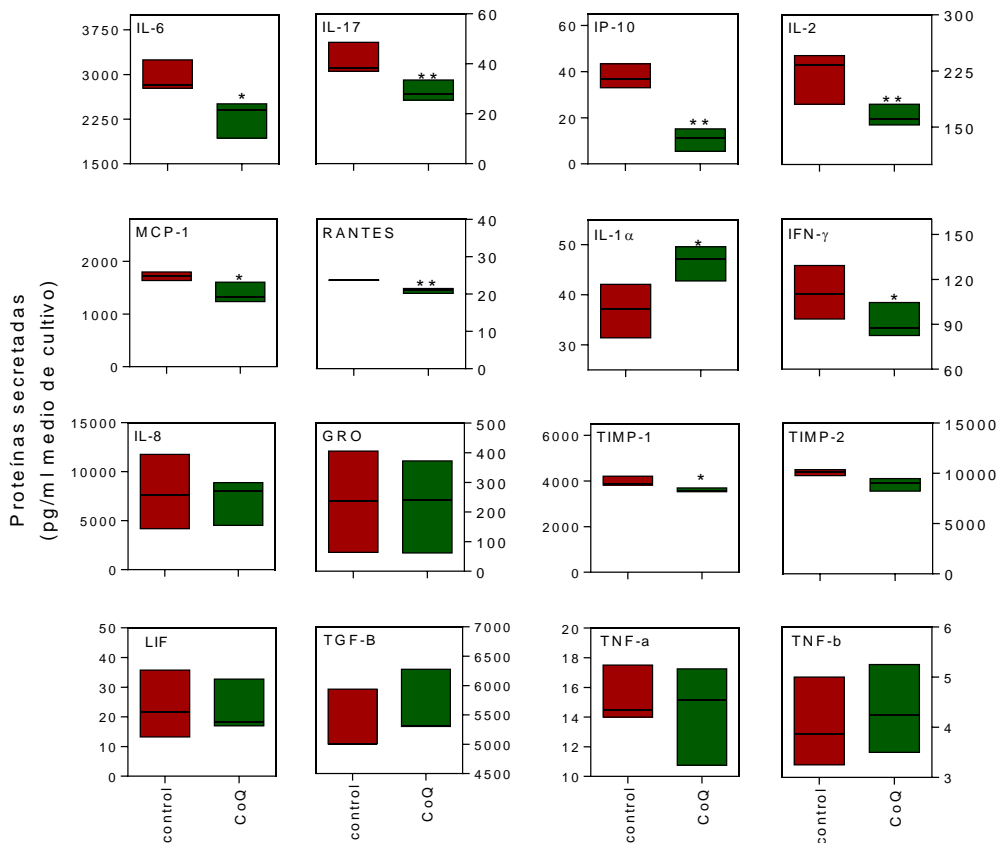


Figura 6.4. La secreción de factores inflamatorios y quimiotácticos se reduce por el tratamiento con CoQ10. Se utilizaron medios de cultivo de células U251 (tratadas con CoQ10 y control) para analizar mediante array de proteínas (RayBiotech) los factores secretados. Los resultados se muestran como pg/mL de medio de cultivo. N=4; *p<0.01**p<0.05.

La administración de CoQ10 disminuye la angiogénesis y la infiltración de células inflamatorias en tumores de GBM implantados de forma subcutánea

Como indican resultados mostrados anteriormente, se observó un descenso en el tamaño de tumores subcutáneos de GBM en ratones tratados con CoQ10 con respecto a ratones tratados con vehículo. Si bien este efecto puede ser debido a un remodelado metabólico y descenso de la proliferación celular, la imagen de los tumores denota un aspecto sanguinolento en los tumores de ratones tratados con

vehículo, indicativo de una vascularización incrementada. Este aspecto sugirió que la disminución del desarrollo tumoral podría estar relacionada con procesos de neovascularización (Figura 5.9 A).

Por lo tanto se analizó la vascularización utilizando CD-31 (PECAM) como marcador de vasculatura. Los resultados indicaron que la reducción en el tamaño tumoral va acompañada de un menor grado de vascularización. De hecho se observó un descenso significativo del 75% en el área ocupada por la vasculatura en tumores de ratones tratados con CoQ10 ($p < 0.01$) (Figura 6.5 A). Además se observó un cambio en la localización de la vasculatura, ya que esta ocupaba solo la periferia tumoral en los tumores de ratones tratados con CoQ10, mientras que en los tumores de ratones tratados con vehículo, ocupó todo el área tumoral (Figura 6.5 A). Se determinó el grado de madurez de los vasos mediante inmunofluorescencia analizando la colocalización entre PECAM y α -actina de músculo liso (SMA), un marcador de pericitos en vasos de pequeño calibre. Los resultados indicaron una colocalización de un 25% menor en tumores de ratones tratados con CoQ10 con respecto a ratones tratados con vehículo ($p < 0.05$), lo que sugiere, por tanto, un menor recubrimiento de pericitos, siendo los vasos más inmaduros en estos tumores (Figura 6.5 B).

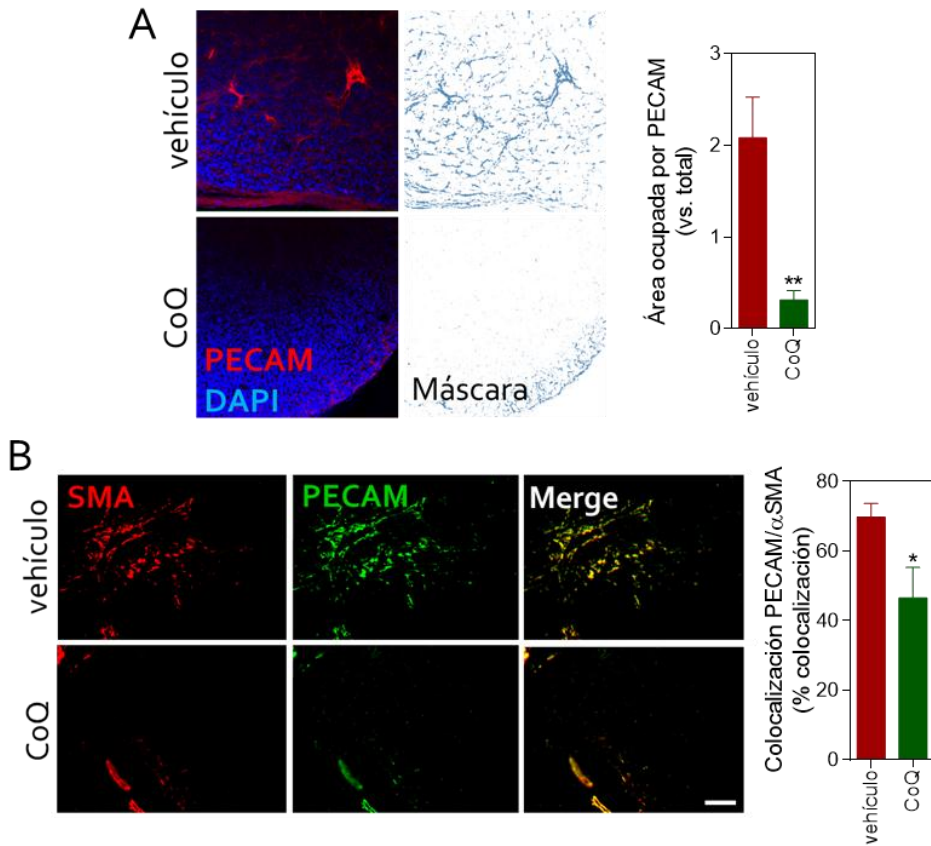


Figura 6.5. Efecto del CoQ10 sobre vasculatura en tumores de GBM xenoinplantados de forma subcutánea. Las células U251 se implantaron de forma subcutánea en ratones inmunodeficientes (nu/nu). Las células endoteliales se marcaron con PECAM (rojo) y con una contratinción con DAPI (azul) y se adquirieron imágenes de microscopía confocal (A). El área ocupada por vasos se determinó utilizando ImageJ. El estudio de madurez de vasos se hizo mediante una inmunohistoquímica frente a PECAM (verde) y SMA (rojo) (B), las imágenes se adquirieron con microscopio de epifluorescencia. Los resultados muestran el porcentaje de SMA en vasos marcados con PECAM. n=4 vehículo; 3 CoQ10. *p<0.05, **p<0.005.

Como aproximación para analizar el efecto del CoQ10, *in vivo*, sobre los procesos de migración e inflamación, se utilizó un modelo de *xenograft*. Se analizó el nivel de monocitos y de macrófagos en secciones de tumores xenoinplantados utilizando IHC frente al marcador MO/MAC. Se observó un descenso significativo de la infiltración de más del 30% en tumores de ratones tratados con CoQ10 (p<0.05) (Figura 6.6 A), y una mayor presencia de células infiltradas en la periferia tumoral, mientras que en tumores de ratones tratados con vehículo la localización fue por todo el tumor. Dada la localización de las células inflamatorias en las secciones de tumor, se analizó la posible correlación con regiones de hiperplasia

microvascular, mediante un estudio de colocalización que reveló un descenso de la misma del 50% en tumores de ratones tratados con CoQ10 frente a los tratados con vehículo ($p < 0.05$) (Figura 6.6 B).

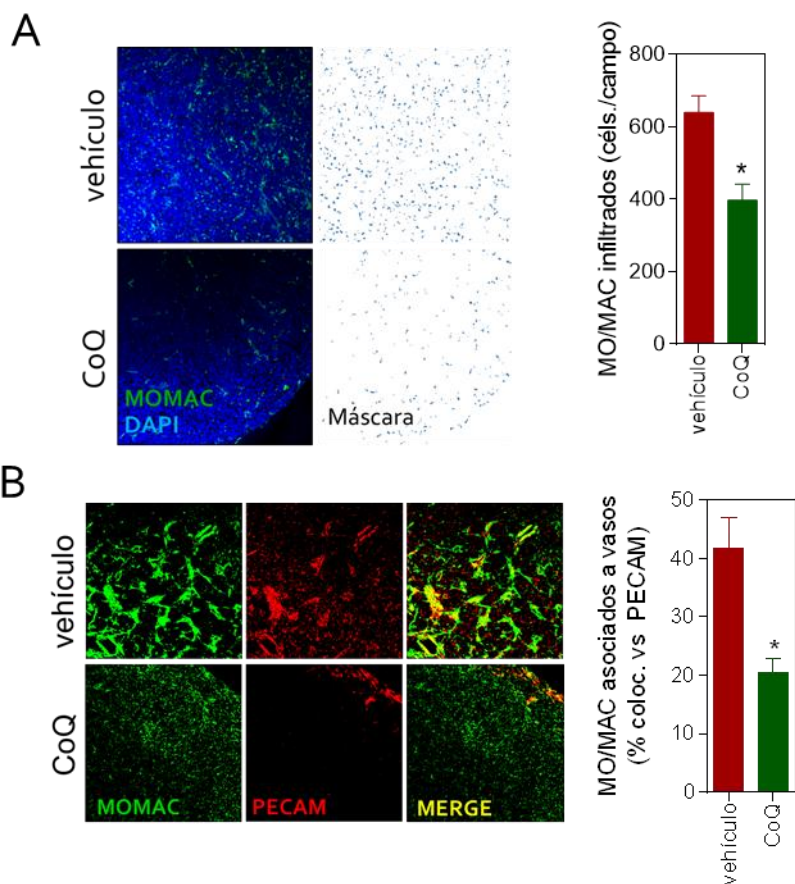


Figura 6.6. Efecto del CoQ10 sobre la infiltración de células inflamatorias en tumores de GBM implantados de forma subcutánea. Los monocitos y macrófagos cuantificaron mediante IHC frente MO/MAC (verde) y con una contratinción con DAPI y se adquirieron imágenes de microscopía confocal (A). Los resultados muestran el número de células marcadas con MO/MAC. El estudio de colocalización se realizó mediante máscaras de imágenes de IHC frente a MO/MAC (verde) y PECAM (rojo) y se analizó su porcentaje de colocalización (B). Los resultados muestran el porcentaje de MOMAC en vasos marcados con PECAM. $n=4$ vehículo; 3 CoQ10. $*p < 0.05$.

El tratamiento con CoQ10 reduce la infiltración de microglía en tumores de GBM implantados de forma ortotópica

En el cerebro, la microglía es uno de los principales tipos celulares con funciones inflamatorias. Por ello, se abordó la infiltración de estas células en los tumores

ortotópicos implantados en cerebros de ratones nu/nu y como el CoQ10 afectaba a este proceso.

Una vez sacrificados los animales, se analizó la infiltración de microglía mediante ICH, utilizando un anticuerpo anti-Iba1, inmunocolocalizando las células tumorales con un anticuerpo anti-vimentina, de forma similar a lo mostrado en apartados anteriores. Se analizó el porcentaje de células Iba-1 respecto al área tumoral y se comprobó que el tratamiento con CoQ10 redujo la infiltración de microglía significativamente en un 60% respecto al tratamiento con vehículo ($p < 0.01$) (Figura 6.7). No solo los tumores del grupo CoQ10 tenían un tamaño inferior a los del grupo vehículo, sino que además la infiltración de células se redujo drásticamente.

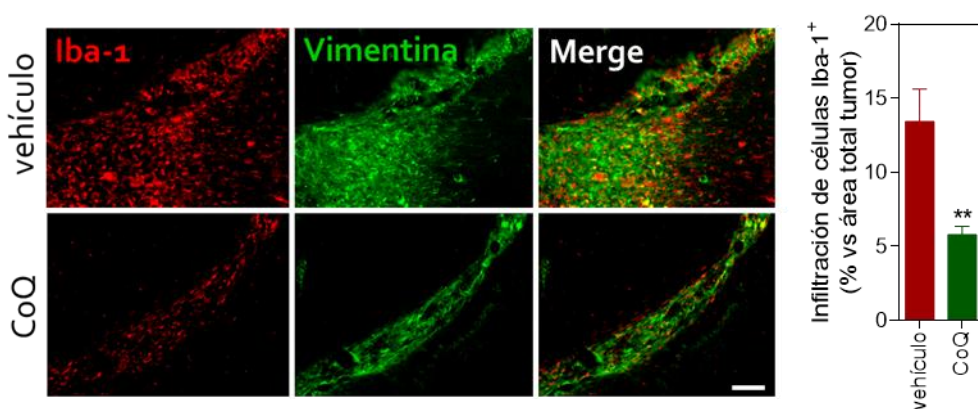


Figura 6.7. El CoQ10 reduce la infiltración de microglía *in vivo*. Los animales se dividieron en dos grupos, uno tratado con CoQ10 y otro vehículo. Los tratamientos comenzaron en la semana 1 y se mantuvieron hasta la 9, mediante inyección intraperitoneal de CoQ10 (100mg/Kg ratón) o vehículo. Se hizo inmunohistoquímica frente a vimentina (verde) y frente a Iba-1 (rojo). Se adquirieron imágenes de ambos canales sobre los que se calculó el % de área que ocupaban las células de microglía con respecto al área tumoral total. n=4 vehículo; 5 CoQ10. ** $p < 0.01$.

En resumen, hasta el momento se ha mostrado como el tratamiento con CoQ10 puede regular varios procesos clave para la progresión del GBM, como la angiogénesis, inflamación, proliferación, migración e invasión. Todos ellos son sellos de identidad característicos del GBM y que condicionan su malignidad.

Discusión



Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto cambiaron todas las preguntas

Mario Benedetti

Índice de figuras del apartado “Discusión”.

Figura 1. Alteración espacio-temporal de sistemas antioxidantes en ratones 3xTg-AD

Figura 2. Modelo molecular del CoQ10.

Figura 3. El CoQ10 modula el daño inducido por βA_{25-35} en HUVECS.

Figura 4. Desarrollo hipotético de la relación entre la patología vascular y las alteraciones neuropatológicas.

Figura 5. Efectos del ubiquinol sobre ratones 3xTg-AD.

Figura 6. Principales características del GBM.

Figura 7. Sensibilización de células de GBM a radiación.

Figura 8. Efecto del CoQ10 sobre distintos componentes de la respuesta quimioresistente

Figura 9. El CoQ10 sensibiliza a células U251 frente a TMZ

Figura 10. El CoQ10 modula procesos de motilidad e invasión en U251.

Figura 11. Efectos del tratamiento con CoQ10 sobre procesos de angiogénesis e inflamación en modelos de GBM *in vitro* e *in vivo*.

Enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo y patología vascular

Es creciente el interés que despierta el estudio de la relación entre el estrés oxidativo (EO) y la enfermedad de Alzheimer (EA), así como el de esta enfermedad con la patología vascular (PV). El principal objetivo del primer bloque de esta Tesis Doctoral es estudiar la relación entre estas dos condiciones y la EA. Para ello se ha tratado de responder a las siguientes cuestiones:

1. Estudiar la modulación espaciotemporal de los sistemas antioxidantes en cerebros de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 3xTgAD.
2. Estudiar *in vitro* el efecto del CoQ10 exógeno sobre la muerte celular inducida por el péptido β A en células endoteliales humanas, diseccionando los mecanismos celulares involucrados.
3. Estudiar el efecto del ubiquinol sobre la patología amiloidea y la patología vascular *in vivo* en el modelo de ratón 3xTgAD.

Estas cuestiones se discutirán en base a los resultados presentados en esta Tesis Doctoral.

Modulación espaciotemporal de los sistemas antioxidantes en cerebros de ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 3xTgAD

El papel del estrés oxidativo en la enfermedad de Alzheimer está muy bien documentado, siendo un factor común en todas las hipótesis sobre el origen de la enfermedad (Butterfield, Drake et al. 2001, Ischiropoulos and Beckman 2003). El EO puede actuar como mediador en la aparición de las principales alteraciones histopatológicas de la enfermedad: placas de β A y ovillos neurofibrilares. Así mismo, estas estructuras generan más EO. Diversos estudios han demostrado esta relación tanto en modelos animales (Hyun, Mughal et al. 2010) como en pacientes (Chang, Chang et al. 2014), apareciendo el EO en etapas iniciales y todavía asintomáticas de la enfermedad. Por lo tanto, es muy importante caracterizar las alteraciones asociadas al EO en estas etapas de la enfermedad, previas a la presencia de las estructuras histopatológicas, con el fin de dilucidar cómo pueden estar interviniendo en el inicio y progreso de la enfermedad.

Para estudiar el papel destacado del EO, se analizaron posibles alteraciones de la maquinaria antioxidante en fases tempranas de la patología en el modelo murino 3xTg-AD y en ratones no transgénicos (NTg) en hipocampo y neocórtex. Se estudió el desarrollo temporal del nivel de NQO1, SOD1 y SIRT1 a 2, 4 y 6 meses (Figura 1). Los resultados obtenidos muestran que el hipocampo es más sensible y selectivamente propenso a mostrar cambios en el nivel de enzimas relacionadas con la protección frente al daño oxidativo. De hecho a los 2 meses se observó un incremento en el nivel de NQO1 y SIRT1 en ratones 3xTg-AD con respecto a NTg

que se perdió a los 6 meses siendo inferior al nivel observado en NTg a esta edad (Capítulo I, Figura 1.1).

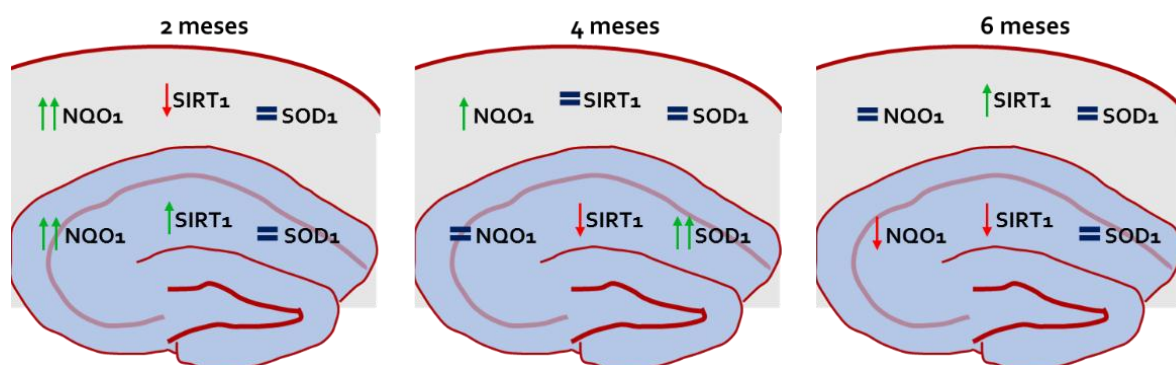


Figura 1. Alteración espacio-temporal de sistemas antioxidantes en ratones 3xTg-AD. Esquema que representa las alteraciones en el nivel de NQO1, SOD1 y SIRT1 en la corteza (arriba, gris) y en el hipocampo (abajo, azul). Se representa el nivel en ratones 3xTg-AD frente a NTg: aumento (↑), igual (=), descenso (↓).

La deficiencia en SOD1 acelera la oligomerización del β A y la pérdida de memoria en el modelo Tg2576 (Murakami, Murata et al. 2011). En nuestro estudio, se observó un incremento selectivo en sus niveles en hipocampo a 4 meses (Capítulo I, Figura 1.1), edad en la que se inicia el depósito intraneuronal de oligómeros de β A en el modelo 3xTg-AD (García-Mesa, López-Ramos et al. 2011). De hecho, el incremento específico a esta edad podría estar jugando un papel contrarrestando la patología amiloide emergente. En muestras de corteza del modelo 3xTg-AD se ha observado un descenso en el nivel de SOD1 a los 3 meses en ratones 3xTg-AD respecto a NTg, siendo similar en muestras de ratones de 15 meses (Mota, Costa et al. 2015). En nuestro caso no se observaron diferencias significativas en corteza a ninguna edad (Capítulo I, Figura 1.1).

Estudios previos han identificado activación a nivel neuronal de SIRT1 con función protectora frente a la neurodegeneración en el modelo Tg2576 (Cimini, Moreno et al. 2009, Julien, Tremblay et al. 2009) conteniendo la producción de β A. Por lo tanto, el incremento observado en corteza podría representar una estrategia protectora en una etapa de la enfermedad donde la síntesis de β A ya ha comenzado. De hecho, en los mismos ratones de nuestra colonia se observó un efecto beneficioso del ejercicio físico asociado a un incremento el nivel de SIRT1, como un medio posible para contrarrestar disfunciones derivadas de la EA (Revilla, Sunol et al. 2014). En este mismo estudio se observó cómo el nivel de SIRT1 aparecía reducidos en hipocampo de ratones 3xTg-AD de 7 meses (Revilla, Sunol et al. 2014). En nuestro estudio hemos observado este descenso desde los 4 meses de edad. En otras colonias de ratones 3xTg-AD, el nivel de SIRT1 no difiere a los 12, 16 y 20 meses de

edad comparando con NTg (Julien, Tremblay et al. 2009). Por consiguiente, el incremento de SIRT1 podría ejercer un efecto protector que se pierde conforme el daño aumenta.

El resultado más sorprendente que se observó en nuestro estudio fue el incremento en el nivel de NQO1, tanto en córtex como en hipocampo, a los 2 meses de edad (Capítulo 1, Figura 1.1). Esta enzima ha sido propuesta como un indicador redox en la EA (SantaCruz, Yazlovitskaya et al. 2004) y es una de las proteínas de la familia antioxidante que se expresa de forma más robusta en respuesta citoprotectiva frente al EO (Alcain and Villalba 2007). NQO1 cataliza la reducción de compuestos quinoides utilizando NADH o NADPH como co-factor, y está relacionado con la regeneración del α -tocoferol (Bello, Kagan et al. 2003), cuyo nivel bajo incrementa el fenotipo de EA en el modelo Tg2576 (Nishida, Yokota et al. 2006). Además, actúa directamente secuestrando el superóxido (Siegel, Gustafson et al. 2004), facilitando así la protección frente al progreso de la enfermedad. En cerebro de pacientes con EA, el marcaje de NQO1 se correlaciona estrechamente con la patología local a lo largo de diferentes regiones cerebrales, sugiriendo que el incremento de la actividad NQO1 podría ser neuroprotector (SantaCruz, Yazlovitskaya et al. 2004). Por otra parte, el 50% de los pacientes con EA presentan el polimorfismo C609T de NQO1 que produce deficiencias funcionales en esta enzima (Tsvetkov, Adamovich et al. 2011), además, recientemente se ha visto como este polimorfismo incrementa el riesgo de padecer EA en población china (Luo, Li et al. 2016). Es más, la NQO1 está regulada por el factor de transcripción Nrf2 (Alcain and Villalba 2007), cuya ruta (Nrf2-ARE) se ha considerado como una diana con posible interés terapéutico para la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Nishida, Yokota et al. 2006). En el modelo APP/PS1 se observó un incremento ligero en el nivel de NQO1 a los 3 meses de edad, que decayó a los 6 meses, de forma similar a nuestros resultados. La sobreexpresión de Nrf2 fue neuroprotectora frente al péptido β A, y este efecto solo se asoció con niveles de expresión elevados de NQO1 entre todos los genes dependientes de Nrf2-ARE (Kanninen, Malm et al. 2008). Por lo tanto, este estudio infiere que el descenso de la expresión de NQO1 dependiente de la edad, que se identificó coincidiendo con la inmunoreactividad del β A, podría proporcionar una protección antioxidante suficiente para el retraso de la muerte neuronal.

Además de las alteraciones a nivel tisular, el estudio se complementó con experimentos de comportamiento desarrollados por el laboratorio de la Dra. Lydia Giménez-Llort (Universidad Autónoma de Barcelona) (Torres-Lista, Parrado-Fernandez et al. 2014). Previamente al sacrificio de los ratones, se realizaron una serie de ensayos comportamentales, observando ciertas alteraciones a nivel cognitivo. Concretamente destaca la latencia del *rearing* (un comportamiento de exploración en el que el ratón se alza sobre sus patas traseras) en ratones 3xTg-AD

que aparece como un evento muy temprano. Seguido en el tiempo, se observó un perfil ansioso basado en alteraciones de los comportamientos de exploración. Los déficits cognitivos más destacados aparecen a los 6 meses, edad en la que se produce un incremento cortical de SIRT₁, pero también un descenso en el nivel de SIRT₁ y NQO₁ a nivel hipocámpico, lo cual sugiere un fracaso en la defensa antioxidante.

En resumen, los resultados destacan la relevancia temporal y regional de el nivel de enzimas antioxidantes en paralelo con los patrones comportamentales observados, mostrando una aproximación novedosa sobre los mecanismos asociados a esta enfermedad en la fase pre-clínica. Por lo tanto en esta fase podría aparecer un sistema de defensa antioxidante frente al daño inducido por el EO.

Estas alteraciones de la maquinaria antioxidante fracasan en el intento de detener el daño oxidativo, por lo que el uso de antioxidantes exógenos desde etapas tempranas, podría favorecer esta defensa, reduciendo o frenando la aparición de las estructuras histopatológicas.

Efecto del CoQ₁₀ exógeno sobre la muerte celular inducida por el péptido β A en células endoteliales humanas

El endotelio cerebral, al igual que las neuronas o la glía, es susceptible de sintetizar, almacenar y liberar ROS bajo ciertos estímulos (Zhu, Smith et al. 2007). En la actualidad está muy bien caracterizado que este incremento de ROS juega un papel fundamental en el desarrollo de la EA, desde etapas iniciales (Butterfield, Drake et al. 2001).

A nivel endotelial, este incremento en las ROS, se debe al depósito de β A y al efecto del β A soluble circulante (Zhu, Smith et al. 2007). Diferentes estudios han descrito una notable alteración mitocondrial y oxidativa en la vasculatura cerebral asociada a depósitos de β A (Aliev, Seyidova et al. 2002, Aliyev, Chen et al. 2005), desencadenando una patología vascular desde fases muy iniciales de la enfermedad (Park, Anrather et al. 2004).

Adicionalmente, el β A soluble afecta a las células endoteliales al incorporarse a las membranas y a la mitocondria, comprometiendo el tráfico y la viabilidad celular (Iadecola 2004). Este proceso produce un exceso de radicales superóxido que dismutan a H₂O₂, junto a una desregulación en la homeostasis del Ca²⁺, desencadenando la apoptosis y necrosis celular. Este daño afecta a la migración de células endoteliales, creando poros que comprometen la función de la microvasculatura (Iadecola 2004, Kandimalla, Scott et al. 2009, Duran-Prado, Frontinan et al. 2014). Todo ello sugiere que el uso de antioxidantes podría regular estos niveles de ROS.

En función de lo expuesto, nuestra hipótesis propone el uso de CoQ10 como una molécula de interés terapéutico para prevenir el daño endotelial en etapas iniciales de la EA. El CoQ10 es el único antioxidante lipídico sintetizado de forma endógena y aparece en todas las membranas celulares (Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010)(Villalba, Parrado et al. 2010). Juega un papel fundamental en el metabolismo celular, participando como transportador de electrones en la mitocondria y protegiendo a las membranas y las lipoproteínas de la peroxidación lipídica y oxidación proteica. Esta función antioxidante es desarrollada principalmente por la forma reducida, el ubiquinol (Villalba, Parrado et al. 2010).

El efecto citoprotector del CoQ10 se basa en el bloqueo de la actividad del β A en varios pasos, algunos de los cuales, implican la actividad de otras moléculas antioxidantes. Estudios previos ya han mostrado como algunos bloqueadores de radicales libres previenen parcialmente el daño inducido por el β A (Park, Anrather et al. 2004). De forma similar en nuestro estudio se ha visto como elevadas dosis de los antioxidantes tempol y α -tocoferol solo revierten parcialmente la apoptosis y necrosis inducidas por el β A (Capítulo II, Figura 2.5). La dosis óptima de CoQ10 observada en nuestro estudio es de 5 μ M. Esta dosis se encuentra dentro del rango alcanzado mediante suplementación oral en humanos (Villalba, Parrado et al. 2010).

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que el CoQ10 reduce y retrasa la incorporación y acumulación de β A en las células. De forma paralela se reduce la entrada de Ca^{2+} extracelular (Capítulo II, Figura 2.4 y 2.8). Estudios previos infirieron como el β A se incorpora a la membrana generando canales que producen permeabilidad a iones, mediando la entrada de Ca^{2+} al citosol (Bhatia, Lin et al. 2000, Kawahara 2010). Es de resaltar, que el efecto protector del CoQ10 no solo se debe a una interacción química con el β A, ya que la adición simultánea de ambos no generó protección en HUVECs (Resultados adicionales, [enlace](#)), por lo que el tratamiento debe realizarse con una pre-incubación de CoQ10. El tratamiento de las HUVECs con CoQ10 durante 12h incrementó el nivel intracelular de forma dosis-dependiente (Tsuneki, Sekizaki et al. 2007). El CoQ10 inicialmente se acumula en el compartimento endolisosomal, posteriormente se incorpora y asocia a la membrana mitocondrial, siendo necesario un tráfico vesicular eficiente para que se transporte a diferentes compartimentos celulares y su incorporación a las membranas celulares requiere 12 horas (Fernandez-Ayala, Brea-Calvo et al. 2005). Todo esto indica que su efecto inhibitorio sobre la entrada de β A en células endoteliales no está relacionado con la alteración de los mecanismos endocíticos. Es más, el fragmento βA_{25-35} y el β A son péptidos altamente hidrofóbicos, por lo

tanto su incorporación depende de la composición lipídica de la bicapa (Mason, Estermyer et al. 1996, Simakova and Arispe 2011). El CoQ10 se incorpora en todas las membranas celulares (Fernandez-Ayala, Brea-Calvo et al. 2005) y dispone su cola isoprenoide en la región hidrofóbica de la bicapa, de manera que las cabezas polares de los fosfolípidos están en contacto directo con la última región isoprenoide del CoQ10 (Genova and Lenaz 2011). En base a lo anterior, hipotetizamos que el CoQ10 puede bloquear por impedimento estérico la incorporación del β A a la membrana y la entrada de Ca^{2+} , actuando como una "armadura" celular y reduciendo la formación de canales (Figura 2).

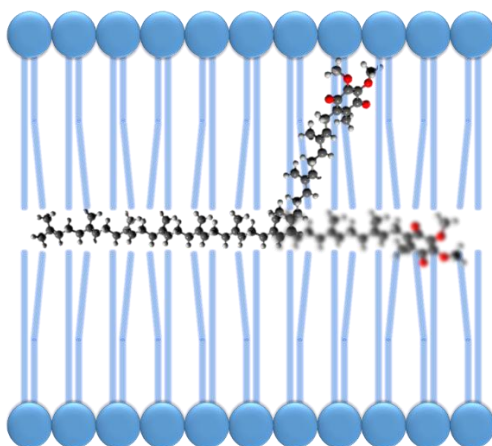


Figura 2. Modelo molecular del CoQ10. El CoQ10 podría intercalarse entre las dos monocapas de la bicapa lipídica con la cabeza polar oscilando entorno al tercer isopreno, en proximidad a las cabezas de los fosfolípidos. Modificado de (Genova and Lenaz 2011).

La inhibición de la entrada de Ca^{2+} en cultivos de células endoteliales tratados con dos bloqueantes de canales de calcio (*verapamil* y *pimocida*) y β A, solo previene parcialmente la toxicidad inducida por este, indicando que el β A también puede inducir la liberación de Ca^{2+} intracelular para incrementar sus niveles citosólicos (Suo, Fang et al. 1997). De todos los compartimentos intracelulares, la mitocondria es uno de los mayores reservorios de Ca^{2+} . De acuerdo con estos resultados, nuestro trabajo ha demostrado como el β A se transporta rápidamente a la mitocondria en HUVECs, alterando la homeostasis de Ca^{2+} , pero la preincubación de estas células con CoQ10 reduce la entrada de β A y la acumulación del mismo en la mitocondria, lo que bloquea la salida intracelular de Ca^{2+} inducido por β A, alcanzándose niveles de Ca^{2+} mitocondrial similares al control (Capítulo II, Figura 2.9).

Se ha demostrado, *in vitro* e *in vivo*, que el β A translocarse a mitocondrias neuronales (Hansson Petersen, Alikhani et al. 2008) siendo esta acumulación suficiente para inducir un incremento en el nivel de ROS y la disfunción mitocondrial, provocando la apertura del PTPm y la liberación de citocromo c,

causando en última instancia toxicidad y muerte celular (Belliere, Devun et al. 2012, Cha, Han et al. 2012). En este sentido, un sitio de unión al CoQ10 regula la apertura del PTPm (Fontaine, Ichas et al. 1998), y se ha demostrado en células epiteliales que el CoQ10 es efectivo inhibiendo la apertura del PTPm inducida por H₂O₂ (Naderi, Somayajulu-Nitu et al. 2006) o por β A en neuronas (Li, Zou et al. 2005, Belliere, Devun et al. 2012).

En línea con estos estudios, nuestros resultados muestran un efecto protector del CoQ10 frente al daño producido por el β A en HUVECs relacionado con estos mecanismos. El pretratamiento con CoQ10 reduce el tráfico de β A₂₅₋₃₅ y su acumulación en la mitocondria, impidiendo la apertura del PTPm y la liberación de citocromo c, acompañado de una reducción en el nivel de O₂⁻ y de H₂O₂ (Capítulo II, Figura 2.3 y 2.7). Adicionalmente, la reducción de dichas ROS induce un incremento en el nivel de NO (Capítulo II, Figura 2.6). Previamente, se ha descrito en neuronas como el tráfico de β A incrementa el nivel de ROS mitocondriales, los cuales reaccionan con el NO para producir peroxinitrito una RNS altamente reactiva. El NO inactiva a la SOD2 por nitrosilación y genera más ROS incrementando el daño en la mitocondria (Iadecola 2004, Anantharaman, Tangpong et al. 2006).

El incremento en el nivel de ROS, RNS y Ca²⁺ inducido por el β A en células endoteliales está directamente relacionado con un aumento en la necrosis y apoptosis. En condiciones *in vivo*, la muerte de células endoteliales supone una alteración vascular con un incremento en la permeabilidad y un compromiso en el intercambio de nutrientes y la llegada de oxígeno. Se ha descrito que el β A₂₅₋₃₅ altera la capacidad de migración de las células endoteliales en ensayos de reparación de herida, descendiendo su movilidad. También se observó un efecto similar en la capacidad de formar estructuras tubulares y como el tratamiento con CoQ10 lo revierte la adición de β A₂₅₋₃₅ a HUVECs produce un marcado descenso en la formación de lamelipodia que se revierte con el pretratamiento de CoQ10 (Capítulo II, Figura 2.2). Este proceso de formación de lamelipodia, se ha visto que es esencial para la reparación de daño en procesos patológicos (Wong and Gotlieb 1984).

En conjunto, estos resultados muestran el doble papel del CoQ10: puede proteger la microvasculatura de la muerte celular inducida por el β A₂₅₋₃₅ y mejorar la reparación de la función endotelial en condiciones patológicas asociadas a EA, reduciendo la pérdida de sangre e hipoxia y mejorando la oxigenación y el transporte de nutrientes (Figura 3).

Aunque la EA es, por definición, una demencia no vascular, la comorbilidad vascular está presente entre el 30 y 60% de los pacientes de EA (Grammas 2011), haciendo que compuestos relacionados con el EO vascular sean diana de futuras intervenciones terapéuticas. Un nivel elevado de ROS es común en la mayoría de las

enfermedades vasculares (Drummond, Selemidis et al. 2011). La suplementación oral con CoQ10 ha sido utilizada para mejorar la función endotelial en pacientes con diabetes tipo II y con enfermedades cardiovasculares (Lim, Lekshminarayanan et al. 2008, Hamilton, Chew et al. 2009, Dai, Luk et al. 2011, Gao, Mao et al. 2012). Además, un meta-análisis de controles aleatorizados de diferentes ensayos concluye que la suplementación con CoQ10 está asociada a una mejora significativa de la función endotelial (Gao, Mao et al. 2012).

Se ha propuesto que una concentración en plasma superior a 2,5 μM produce efectos positivos (Langsjoen 2000). En individuos sanos la concentración en plasma de CoQ10 es de 0,40 a 1,91 μM , y tras una suplementación diaria de entre 200-300 mg de CoQ10, la concentración en plasma se incrementa hasta niveles de entre 3-5 μM (Villalba, Parrado et al. 2010), siendo este el mismo rango utilizado en nuestros experimentos.

De acuerdo con los resultados presentados, la suplementación con CoQ10 podría tener un efecto terapéutico frente al daño endotelial inducido por el βA , *in vivo*. Además, por su condición de antioxidante, podría modular otros procesos patológicos asociados a la EA. Estos resultados, muestran la primera evidencia *in vitro* de que el CoQ10 inhibe la entrada y el tráfico mitocondrial de βA en células endoteliales humanas, disminuyendo también el daño oxidativo inducido y la muerte celular (Duran-Prado, Frontinan et al. 2014) (Figura 3).

Discusión

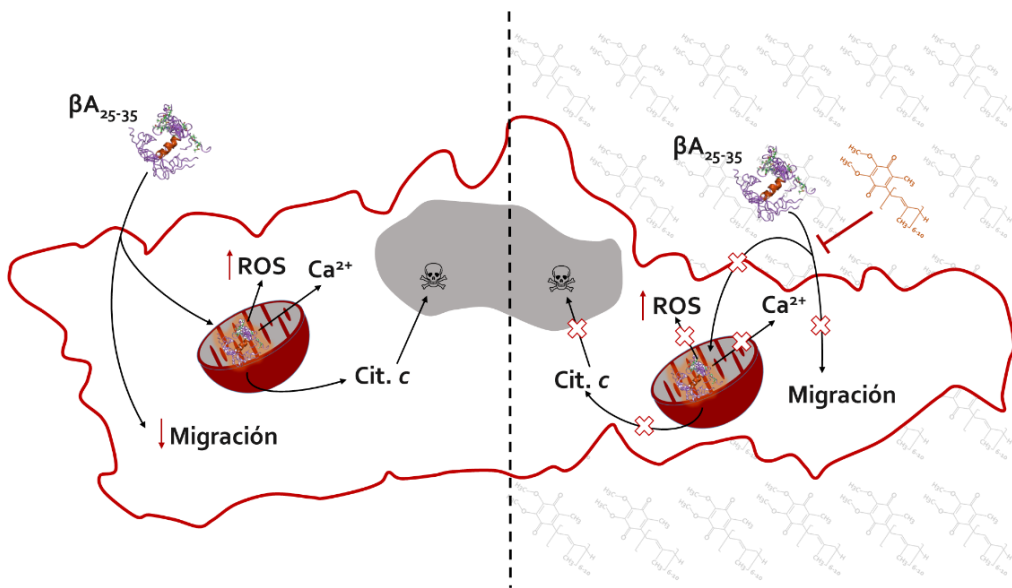


Figura 3. El CoQ10 modula el daño inducido por βA_{25-35} en HUVECs. Esquema que representa el efecto del βA_{25-35} sobre HUVECs y como se revierte con el tratamiento con CoQ10.

Efecto del ubiquinol sobre la patología amiloidea y la patología vascular en el modelo de ratón 3xTgAD

La EA representa entre el 65-70% de los casos de demencias diagnosticados en la población de mayor edad (Wilson, Weir et al. 2011). El principal factor de riesgo de la EA es el envejecimiento, pero emerge con una función clave en el inicio y desarrollo de este proceso neurodegenerativo la hipoperfusión cerebral crónica originada por la edad y condiciones vasculares, como la hipertensión aterosclerosis y diabetes tipo II (de la Torre 2012, van Norden, van Dijk et al. 2012, Kelleher and Soiza 2013), que incrementan el estrés oxidativo y dañan la función endotelial. Como el compromiso vascular cerebral puede preceder años a las manifestaciones clínicas, o incluso décadas, la modulación de estos procesos en las etapas prodrómicas, e incluso premórbidas puede ser una aproximación terapéutica de gran interés (Marchesi 2011).

Distintos estudios describieron que la suplementación con altas dosis de CoQ (1,200 mg/ kg/ día) durante 60 días, reducía parcialmente la sobreproducción de βA en la corteza cerebral de distintos modelos murinos de EA en edades avanzadas (18 meses) (Yang, Yang et al. 2008, Yang, Dai et al. 2010), sugiriendo un posible efecto beneficioso del CoQ para la EA en humanos. No obstante, los tratamientos actuales no son eficaces para la cura de la EA, sólo consiguen paliar temporalmente la sintomatología de la enfermedad. Posiblemente la causa de la falta de eficacia de los tratamientos en la EA radica en que la enfermedad es asintomática durante años, y los síntomas clínicos se observan sólo en las etapas avanzadas, después de que la enfermedad haya progresado en una secuencia predecible devastando fundamentalmente la áreas límbicas del cerebro, con la pérdida de neuronas y sus conexiones y en una progresiva reducción del volumen macroestructural de estas regiones cerebrales. Por ello, difícilmente habrá tratamientos eficaces contra la EA en estadios avanzados, pudiendo tener mucho más éxito un diagnóstico precoz y el tratamiento preventivo de la enfermedad (Braak, Griffing et al. 1999). Aunque una dosis elevada de CoQ (2.6 g/kg) fue eficaz en la reducción de la carga de βA en ratones, también reduce la agudeza auditiva, el aprendizaje y la memoria espacial cuando es suplementado de manera continuada desde los 4 meses hasta los 15 y 24 meses, mientras que una dieta suplementada con una dosis baja de CoQ (680 mg/kg) no presenta estos efectos adversos (Sumien, Heinrich et al. 2009).

Por esta razón el diseño experimental plantea la suplementación dietética con dosis bajas de ubiquinol desde etapas previas a la aparición de la estructuras histopatológicas (2,5 meses de edad) hasta los 12 meses (edad de sacrificio). En la presente Tesis Doctoral hemos establecido que la fase premórbida ya se observa a los dos meses de edad, siendo la latencia del *rearing* el primer indicador de cambio conductual en esta fase, y los niveles elevado en la expresión de NQO1 en neocotex

e hipocampo son los primeros indicadores de alteraciones en la expresión de enzimas antioxidantes en ratones 3xTg-AD (Torres-Lista, Parrado-Fernandez et al. 2014), por lo que decidimos iniciar la dieta con ubiquinol desde esas etapas tempranas.

Para estudiar el efecto del CoQ10 se ha suplementado la dieta con su forma reducida, ubiquinol (Ub), que ofrece una mejor biodisponibilidad que la ubiquinona (Mae 2001, Langsjoen and Langsjoen 2013). El incremento en los niveles de CoQ10 en el plasma detectado en los ratones con dieta suplementada con Ub, de nuestro estudio (Capítulo III, Figura 3.1), es mayor que el observado en estudios anteriores (Lonnrot, Holm et al. 1998). Junto al grupo de ratones 3xTg-AD con dieta suplementada con ubiquinol, se estableció un grupo 3xTg-AD con dieta suplementada con vehículo que contenía vitamina C (31 mg/Kg de pienso) (Vh), un grupo 3xTg-AD alimentado con dieta estándar (St) y un grupo de ratones no transgénicos alimentados con dieta estándar (NTg). La potente capacidad antioxidante del ubiquinol provoca que se oxide rápidamente en presencia de aire (Hosoe, Kitano et al. 2007). Para prevenir la oxidación del ubiquinol es necesaria la presencia en su formulación de un agente antioxidante en el vehículo, cuya función es mantener el Ub totalmente reducido. El Ub y el vehículo (Kaneka QH p30 powder), de nuestro estudio fue suministrado por [Kaneka Corp](#). En la composición del vehículo se encuentra ascorbato (vitamina C) como agente reductor. La concentración de ascorbato en la dieta Vh fue de es de 31 mg/kg de pienso.

Para estudiar el efecto del CoQ10 hemos suplementado la dieta con su forma reducida, ubiquinol (Ub), que ofrece una mejor biodisponibilidad que la ubiquinona (Mae 2001, Langsjoen and Langsjoen 2013). Al igual que en los estudios en humanos, el incremento en el nivel de CoQ10 en el plasma detectado en los ratones con dieta suplementada con Ub de nuestro estudio es mayor que el observado en estudios anteriores (Lonnrot, Holm et al. 1998). Junto al grupo de ratones 3xTg-AD con dieta suplementada con Ub (200 mg ubiquinol/Kg peso corporal/día), establecimos un grupo 3xTg-AD con dieta suplementada con vehículo que contenía vitamina C (31 mg/Kg de peso corporal/día) (Vh), un grupo 3xTg-AD alimentados con dieta estándar (St) y un grupo de ratones no transgénicos alimentados con dieta estándar (NTg). La potente capacidad antioxidante del ubiquinol provoca que se oxide rápidamente en presencia de aire (Hosoe, Kitano et al. 2007). Para prevenir la oxidación del ubiquinol es necesaria la presencia en la formulación del ubiquinol de un agente antioxidante en el vehículo, cuya función es mantener el Ub totalmente reducido. El Ub y el vehículo (Kaneka QH p30 powder) de nuestro estudio fue suministrado por [Kaneka Corp](#). En la composición del vehículo aparece la vitamina C como agente reductor.

El aumento del estrés oxidativo en el desarrollo y progresión de la EA se ha documentado en humanos tanto en el cerebro como en el plasma (Lovell and Markesbery 2007, Nunomura, Moreira et al. 2007, Sultana, Perluigi et al. 2009) (Nunomura, Perry et al. 2001) pero sólo se había descrito hasta ahora un incremento del EO en el parénquima cerebral del modelo 3xTg-AD de la EA (García-Mesa, Lopez-Ramos et al. 2011, Giuliani, Ottani et al. 2013, Giuliani, Bitto et al. 2014). En este trabajo se observa que se produce un incremento sólo en algunos parámetros de estrés oxidativo en el plasma de los animales 3xTg-AD en comparación a los NTg. El mayor incremento del estrés oxidativo se observó en la generación de ROS en los leucocitos de sangre periférica, que puede reflejar el incremento de estrés oxidativo del parénquima cerebral (Rammal et al 2008).

El menor daño oxidativo en el plasma del modelo murino de EA en comparación con el mayor incremento de EO encontrado en humanos puede deberse a que los ratones presentan una síntesis endógena de ácido ascórbico, cuya concentración desciende en el plasma y en CSF de los pacientes de EA a pesar de tener una dieta adecuada (Riviere, Birlouez-Aragon et al. 1998). En pacientes, el ácido ascórbico es el antioxidante con mayor capacidad en el líquido cefalorraquídeo (CSF) y el suplemento con ácido ascórbico incrementó su concentración en CSF un 28% en cinco voluntarios sanos, siendo la capacidad de captura de radicales peróxido del CSF dependiente de la concentración del ácido ascórbico (Lonnrot, Metsa-Ketela et al. 1996).

Sin embargo, el efecto exacto del ácido ascórbico sobre los modelos murinos de EA es difícil de interpretar porque los ratones producen de manera endógena el ácido ascórbico. Estudios previos han demostraron que la carga de placas amiloides no se modificaba por la suplementación de la dieta o la inyección sistémica de ácido ascórbico, pero si se produce una mejora cognitiva a corto plazo tanto en el modelo APP/PSEN1 como en los ratones NTg (Murakami, Murata et al. 2011). No obstante, el nivel de ácido ascórbico es importante en el desarrollo de la EA y sí descienden en el plasma por el cruzamiento de un modelo murino de EA con un KO para la síntesis de ácido ascórbico, además se acelera la patogénesis amiloide asociada a un incremento del EO, en particular durante estadios tempranos de desarrollo de la enfermedad (Dixit, Bernardo et al. 2015, Warner, Kang et al. 2015). En estas condiciones de deficiencia en la síntesis endógena del ácido ascórbico, la suplementación de la dieta con altas dosis de ascorbato (3,3 g/l), que mantenía niveles plasmáticos de ascorbato similares a los NTg, reducía la deposición de placas y se inducía una mejora cognitiva de los animales (Kook, Lee et al. 2014).

Por ello, los resultados obtenidos en este estudio con la dieta Vh nos han sorprendido porque no se ha descrito que los ratones 3xTg-AD presenten niveles de

ascorbato menores que los ratones NTg, pero nuestro estudio demuestra que la presencia de ascorbato en la dieta puede mejorar algunos de los parámetros de estrés oxidativo en plasma y neuropatológicos, como la carga de placas seniles en el hipocampo de los 3xTg-AD. No obstante, la dieta Ub fue significativamente más efectiva que la Vh para la mayoría de los parámetros analizados, pero la presencia de ácido ascórbico en la dieta Ub dificulta conocer el efecto específico que tiene el ubiquinol sobre el modelo 3xTg-AD. Estos resultados demuestran claramente que el uso de antioxidantes puede reducir alteraciones relacionadas con el EO en el modelo 3xTg-AD, y que la dieta Ub, que contenía ácido ascórbico y ubiquinol, fue la más eficaz en revertir el daño neuropatológico en los ratones 3xTg-AD.

Actualmente, numerosas evidencias confirman que el EO está presente en pacientes de Alzheimer. Un gran número de estudios ha reportado un incremento en el nivel de oxidación del DNA (Lovell and Markesbery 2007), RNA (Nunomura, Moreira et al. 2007), lípidos (Pratico 2010), y de proteínas (Sultana, Perluigi et al. 2009) en plasma de pacientes. También se han observado estas alteraciones en pacientes con demencia cognitiva leve (Baldeiras, Santana et al. 2010), demostrando que el EO es un evento inicial en la EA (Nunomura, Perry et al. 2001). En los ratones 3xTg-AD de 7 meses de edad se observa un incremento del estrés oxidativo de la corteza cerebral siendo los machos más propensos (García-Mesa, López-Ramos et al. 2011, Giuliani, Ottani et al. 2013, Giuliani, Bitto et al. 2014) y el estado oxidativo de las neuronas y la glía del cerebelo, el hipocampo y la corteza cerebral correlaciona con el nivel de EO en leucocitos periféricos en ratones con fenotipo ansioso (Rammal, Bouayed et al. 2008). Nuestro estudio demuestra que en este modelo también se produce un incremento del estrés oxidativo en plasma, pero sin encontrar diferencias entre sexos (Capítulo III, Figura 3.2 y 3.3). El estrés oxidativo juega un papel central en la patogenia de la EA originando la disfunción y muerte neuronal. En los pacientes de EA, los marcadores periféricos de estrés oxidativo están elevados, lo que indica que el daño no se limita al cerebro (Madedo and Elsayad 2013) y el nivel de los marcadores oxidativos está directamente relacionado con la severidad del deterioro cognitivo (Torres, Quaglio et al. 2011). Nuestros resultados demuestran que el incremento del estrés oxidativo se revierte parcialmente con la suplementación con dieta Vh y en mayor medida con Ub, y que esta reducción va acompañada de una mejora significativa en los parámetros histopatológicos estudiados, especialmente en la dieta Ub (Capítulo III, Figura 3.2 y 3.3).

Como se ha visto previamente, la EA se caracteriza por tener una fase presintomática que puede preceder en décadas a la aparición de los primeros síntomas clínicos. Antes de la aparición del daño neuronal se da una disfunción vascular (Iadecola 2004) (Figura 4). El daño inducido por el β A circulante está

directamente asociado con un incremento de ROS en células endoteliales, generando un aumento en el nivel hipoperfusión y dañando la barrera hematoencefálica (Butterfield, Drake et al. 2001, Park, Anrather et al. 2005, Morris, Carare et al. 2014).

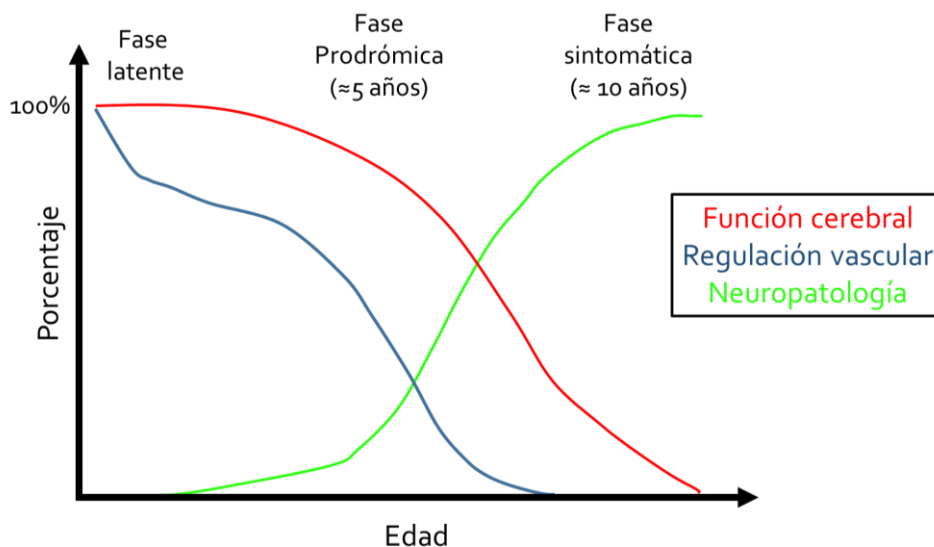


Figura 4. Desarrollo hipotético de la relación entre la patología vascular y las alteraciones neuropatológicas. La desregulación vascular aparece en fases asintomáticas de la enfermedad (fase latente). Durante la fase prodrómica, las funciones cognitivas y las alteraciones neuropatológicas empiezan a aparecer. Estas alteraciones cognitivas surgen por la disfunción neuronal y la desregulación vascular. A medida que la enfermedad progresa, los cambios neuropatológicos aparecen llevando al desarrollo total de la enfermedad. Modificado de (Iadecola 2004).

A nivel cerebral, el daño inducido por el β A circulante está directamente asociado con un incremento de ROS en células endoteliales, generando un aumento en el nivel hipoperfusión y dañando la barrera hematoencefálica (Park, Anrather et al. 2005). Diferentes casos de EA con historial clínico de derrame cerebral, han mostrado como la capa muscular de la vasculatura está, en muchas ocasiones, reemplazada totalmente por depósitos de β A, sugiriendo que la alteración vascular podría ser un factor iniciador de la enfermedad (Kawai, Kalaria et al. 1990). El β A se deposita como un anillo alrededor de los vasos y los hace más rígidos impidiendo su vasodilatación, y en consecuencia se reduce el flujo sanguíneo (Kimbrough, Robel et al. 2015). La acumulación de β A en la pared de los vasos cerebrales en la mayoría de los pacientes con EA puede ser debida a un fallo en el aclaramiento del β A con la edad (Morris, Carare et al. 2014). La concentración de β A en el parénquima cerebral de individuos sanos está rigurosamente regulada por un equilibrio entre su tasa de producción y su aclaramiento a través de la barrera hematoencefálica, por lo que su continuo transporte a través de la barrera hematoencefálica es esencial para prevenir su acumulación potencialmente neurotóxica en cerebro (Deane, Bell et al. 2009).

En nuestro estudio hemos observado un incremento en el grosor de la lámina basal en ratones 3xTg-AD, que confirma datos previos en la microvasculatura en corteza motora primaria y parietal (Mehta, Short et al. 2013) y en los plexos coroideos en este modelo (Gonzalez-Marrero, Gimenez-Llort et al. 2015) y que las dietas Vh y especialmente Ub reducían significativamente esta patología vascular, que podría tener influencia en el tratamiento farmacológico (Capítulo III, Figura 3.4). El incremento de la lámina basal es dependiente de la edad y el grosor que presenta este modelo a los 12-13 meses no afecta a la incorporación de memantina al parénquima cerebral, mientras que a los 17 y 19 meses esta incorporación descendía en un 43%, sugiriendo dificultades para difundir a través de la barrera hematoencefálica (Mehta, Short et al. 2013), aunque otros autores no encontraron cambios en la difusión del diazepam (Do, Alata et al. 2014). En pacientes con EA también se ha observado un incremento en el grosor de la lámina basal por una mayor deposición de colágeno IV (Kalaria and Pax 1995, Claudio 1996, Gonzalez-Marrero, Gimenez-Llort et al. 2015). Entre los pocos medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA, destaca la memantina, un antagonista del receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato), que ha mostrado cierta eficacia en el tratamiento de síntomas de pacientes con EA moderada y severa (Molinuevo, Llado et al. 2005) y la dieta Ub tomada desde etapas premórbidas puede ser una aproximación novedosa para mejorar la incorporación de fármacos al parénquima cerebral porque reduce significativamente el grosor de la lámina basal de los ratones 3xTg-AD de un 47% a sólo un 9%.

Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que las mujeres presentan un mayor riesgo, prevalencia e incidencia de la EA (Bachman, Wolf et al. 1992, Andersen, Launer et al. 1999, Ruitenberg, Ott et al. 2001). Así mismo, en el caso de modelos animales, también se ha caracterizado un patrón patológico mayor en hembras, con una aparición más temprana de las placas amiloideas. Dicho patrón se ha observado en el modelo Tg2576 (Callahan, Lipinski et al. 2001), APP/PS1 (Wang, Tanila et al. 2003) o en el 3xTg-AD (Carroll, Rosario et al. 2010) entre otros. En nuestro estudio se detectó una deposición de las placas en la región de CA1 más tardía en machos que en hembras, resultados similares a los obtenidos por Carroll y colaboradores en 2010 (Carroll, Rosario et al. 2010), quienes además, observaron un retraso en los déficits cognitivos. La deposición de placas y la hipoxia son los únicos parámetros donde hemos observado diferencias entre sexos en todo el estudio. Este dimorfismo sexual a nivel patológico puede estar relacionado con factores genéticos u hormonales y no tiene por qué afectar a todos los procesos patológicos (Ruitenberg, Ott et al. 2001). Es de resaltar que el engrosamiento de la lámina basal, similar en ambos sexos, parece ser independiente de la carga de β A observada en el parénquima cerebral.

Uno de los hallazgos más relevantes de nuestro estudio son el nivel de hipoxia que se ha observado en hembras y su correlación con las placas de β A. Aunque la relación entre patología vascular, hipoperfusión cerebral y EA está muy bien documentada es la primera vez que se describen regiones hipóxicas en el hipocampo de un modelo murino y se demuestra su colocalización con las regiones que presentan placas amiloideas. Se ha descrito que en ratones 3xTg-AD el volumen de la vasculatura cerebral es significativamente menor que en ratones NTg de la misma edad como consecuencia del engrosamiento de la lámina basal (Bourasset, Ouellet et al. 2009, Do, Alata et al. 2014). Nuestros datos demuestran una reducción del grosor de la lámina basal en las dietas Vh y Ub que contenían antioxidantes, y que a una mayor reducción del grosor le corresponde una menor extensión de las regiones hipóxicas. Estos datos son concordantes con la mayor reducción del estrés oxidativo en plasma en las dietas Vh y Ub, sugiriendo que el tratamiento con antioxidantes mejora la función endotelial y la perfusión cerebral.

Estudios en la última década sugieren que la hipoperfusión cerebral crónica podría promover la neurodegeneración a través de una menor producción de energía en las neuronas, producción de especies reactivas de oxígeno y citoquinas proinflamatorias (Kitagawa, Yagita et al. 2005, Farkas, Luiten et al. 2007, Bang, Jeon et al. 2013). Es interesante destacar que el área CA1 del hipocampo es la que presenta mayor presencia de placas seniles y, en consecuencia, mayor hipoxia. Las neuronas piramidales de CA1 son las más vulnerables al daño inducido por hipoxia mientras que las correspondiente a CA3 y al giro dentado son más resistentes (Kreisman, Soliman et al. 2000). Por otra parte, en la formación hipocámpica, niveles agudos de hipoxia generan un bloqueo irreversible de la transmisión sináptica (Kreisman, Soliman et al. 2000). Individuos con hipoperfusión crónica suelen tener déficits cognitivos en varios grados (Ruitenber, den Heijer et al. 2005). Previamente habíamos discutido el efecto protector, *in vitro*, del CoQ10 frente al daño producido por el β A en células endoteliales que mantiene el nivel de NO, un potente vasodilatador, que podría preservar la perfusión cerebral (Duran-Prado, Frontinan et al. 2014), Por ello, el descenso en el nivel de hipoxia observado en la dieta Ub podría estar mejorando la función hipocámpica en ratones 3xTg-AD (Capítulo III, Figura 3.6) que se reflejarían en la reducción de la neofobia y mejora del aprendizaje observados en los estudios conductuales preliminares presentados en este trabajo.

El hecho de que en machos no se observara hipoxia, pero sí placas (en menor número y tamaño que en hembras) nos permite hipotetizar que el nivel de hipoxia observados son una consecuencia del depósito de placas cuando alcanzan un valor umbral determinado, ya que no se han descrito diferencias en el flujo cerebral entre machos y hembras (Bourasset, Ouellet et al. 2009, Do, Alata et al. 2014) ni tampoco hay diferencias en el grosor de la lámina basal responsable del descenso del flujo

cerebral. La disfunción endotelial, mediada en parte por el estrés oxidativo, reduce el flujo cerebrovascular, llevando a una hipoperfusión crónica del parénquima cerebral. La hipoperfusión cerebral activa el factor de transcripción HIF-1 α que incrementa el nivel de BACE1 promoviendo la producción neuronal de β A (Correia and Moreira 2010, Kelleher and Soiza 2013). El β A producido por las neuronas genera a su vez ROS que afecta a la funcionalidad de las células endoteliales, reduciéndose aún más el flujo cerebral e incrementando el estrés oxidativo en el cerebro, por lo que se origina un círculo vicioso (Chami and Checler 2012). Estudios recientes han mostrado como la inducción de hipoxia eleva el nivel de β A y BACE1 en los modelos 3xTg-AD (Koike, Green et al. 2010). De hecho, las ROS también incrementan el nivel de BACE1 (Apelt, Bigl et al. 2004). En nuestro estudio se ha observado el aumento de el nivel de BACE1 en los ratones St respecto a los NTg, en CA1 hipocampal y este incremento se ve fuertemente contrarrestado por la dieta suplementada con Vh y sobre todo con Ub. El estrés celular, BACE1 y la producción de β A están interrelacionados en un círculo vicioso en la EA (Capítulo III, Figura 3.9).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la reducción del estrés oxidativo plasmático desde fases iniciales asintomáticas de la EA mediante un suplemento con antioxidantes, reduce el engrosamiento de la lámina basal de la microvasculatura, la hipoxia cerebral, la deposición de β A y mejora procesos de aprendizaje en los animales y podrían ser un tratamiento preventivo de la EA (Figura 5).

Discusión

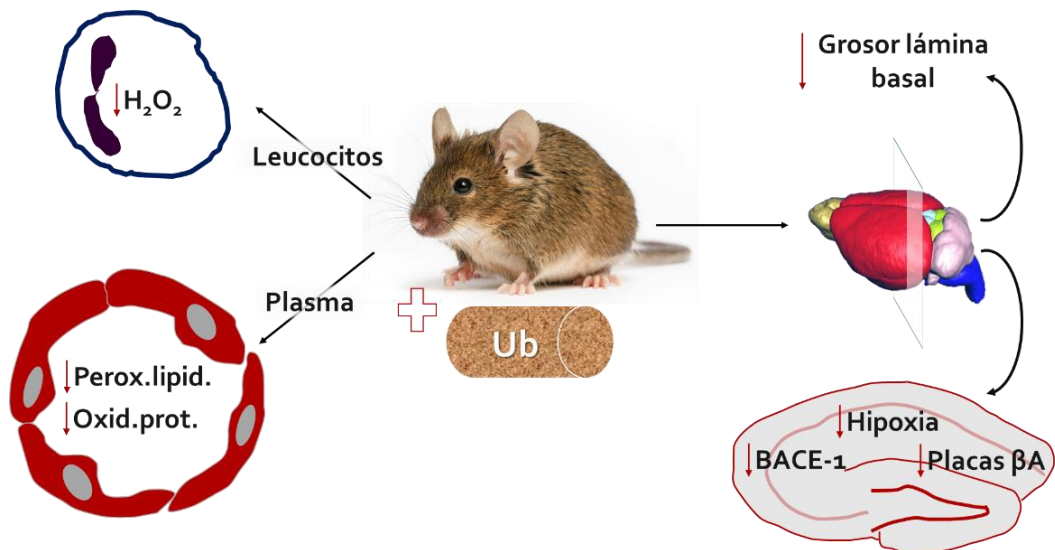


Figura 5. Efectos del ubiquinol sobre ratones 3xTg-AD. Esquema que representa el efecto de la dieta suplementada con ubiquinol en varios factores patológicos clave en el desarrollo de la EA en ratones 3xTg-AD.

El desafío actual al que se enfrenta la investigación de la EA se basa en identificar métodos de diagnóstico en etapas iniciales de la enfermedad y nuevas dianas para la búsqueda de fármacos que nos permitan prevenir esta desoladora enfermedad. La incorporación de antioxidantes como el CoQ10 a la dieta de poblaciones de riesgo puede ser de gran interés para retrasar el inicio de la enfermedad o incluso llegar a prevenirla.

El CoQ10 modula características fisiopatológicas del GBM

En el año 2000 *Hanahan y Weinberg* publicaron en la revista *Cell* una revisión en la que destacaban las principales marcas de identidad del cáncer (Hanahan and Weinberg 2000), situándolos como foco de investigación para comprender mejor esta enfermedad y para la búsqueda de dianas terapéuticas. Once años después, fueron actualizados (Hanahan and Weinberg 2011), indicando esquemáticamente muestra como el cáncer, con su complejidad y las características comunes y peculiares de cada tipo tumoral. El GBM comparte algunas de estas marcas de identidad generales del cáncer, aunque también presenta otras más específicas que lo convierten en uno de los tipos tumorales más malignos y, en la actualidad, de peor pronóstico.

El principal objetivo del segundo bloque de la presente Tesis Doctoral es el estudio del uso terapéutico del CoQ10 en modelos de GBM *in vitro* e *in vivo*. Para ello se han abordado las siguientes cuestiones, esquematizadas en la Figura 6:

1. Efecto del CoQ10 exógeno sobre el nivel de ROS, balance redox y respuesta radioadaptativa *in vitro*.
2. Efecto del CoQ10 sobre apoptosis, senescencia y autofagia inducidas por TMZ, *in vitro* e *in vivo*.
3. Efecto del CoQ10 sobre la motilidad celular, invasión y crecimiento *in vitro* e *in vivo*.
4. Contribución del CoQ10 en procesos de angiogénesis e inflamación asociados al GBM, *in vitro* e *in vivo*.

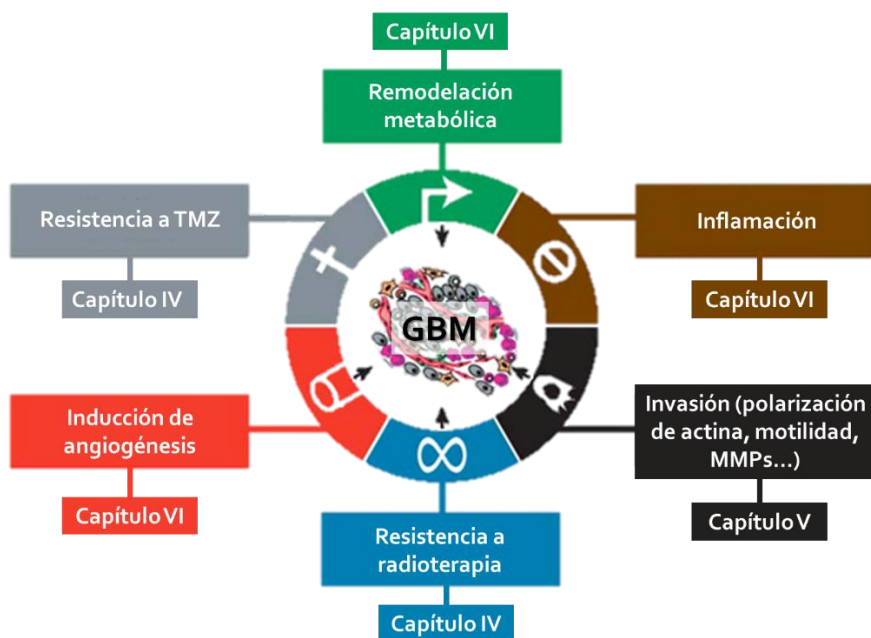


Figura 6. Principales características del GBM. Esquema que representa las diferentes marcas de identidad del GBM, indicando los capítulos donde se ha analizado el efecto del CoQ10 sobre ellos. Basado en el esquema de (Hanahan and Weinberg 2000).

Efecto del CoQ10 exógeno sobre el nivel de ROS, balance rédox, respuesta radioadaptativa y quimioresistencia

La radio y quimio resistencia son unos de los principales factores responsables del fracaso terapéutico en el GBM (Lee, Kim et al. 2004, Johannessen and Bjerkvig 2012, Deighton, Le Bihan et al. 2014). El origen de ambos factores es multifactorial, en el caso de la radioresistencia el metabolismo glicolítico y las alteraciones hacia condiciones antioxidantes juegan un papel muy importante (Lee, Kim et al. 2004, Deighton, Le Bihan et al. 2014). La resistencia a la quimioterapia está asociada a procesos de autofagia y senescencia, junto a factores como MGMT (Johannessen and Bjerkvig 2012).

De acuerdo con estas premisas, los resultados presentados en el capítulo IV de la presente Tesis Doctoral, describen un tratamiento combinado novedoso, *in vitro*, para el GBM, utilizando el antioxidante lipofílico CoQ10. Por una parte, con esta nueva pauta se consigue radiosensibilizar las células tumorales, disminuyendo las defensas antioxidantes incluyendo proteínas y otras moléculas pequeñas como el GSH. Además, el tratamiento con CoQ10 también sensibiliza a las células de GBM frente a la temozolomida (TMZ) incrementando la apoptosis y reduciendo la senescencia, autofagia, señal telomérica y niveles de MGMT. En su conjunto, el

tratamiento combinado con CoQ10, radioterapia y TMZ incrementa significativamente la muerte celular.

CoQ10 y sensibilización a radiación ionizante

Nuestros resultados muestran que la preincubación de células de GBM con CoQ10 disminuye un 50% el nivel de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial, y paralelamente, el nivel de H_2O_2 . El CoQ10 exógeno es acumulado inicialmente en el compartimento endo-lisosomal y después se incorpora rápidamente a las membranas asociadas a las mitocondrias y resto de membranas y a las mitocondrias (Fernandez-Ayala, Brea-Calvo et al. 2005). En los orgánulos, en condiciones normales, el CoQ10 participa en la fosforilación oxidativa, mientras que en condiciones patológicas, por ejemplo en células tumorales, disminuye los niveles elevados de $O_2^{\cdot-}$ generados por el complejo II mitocondrial (Murphy 2009). La dosis óptima observada en nuestro estudio es de 5 μ M, encontrándose dentro del rango alcanzado mediante suplementación oral en humanos (Villalba, Parrado et al. 2010).

Existen numerosas evidencias acerca de la toxicidad producida por niveles elevados de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en células sanas (Gorrini, Harris et al. 2013). Por otra parte, el nivel de estas ROS está muy incrementado en células tumorales por causa de una remodelación metabólica. Como consecuencia se sobreestiman los diversos sistemas antioxidantes que protegen a las células de daños pro-oxidantes, como la radiación (Gorrini, Harris et al. 2013). Los resultados presentados indican que el CoQ10 puede disminuir el nivel de ROS y desactivar, o al menos reducir muchos de estos sistemas antioxidantes. Por otra parte, las células cancerosas presentan una doble ventaja frente a las células sanas, ya que estas ROS incrementan la proliferación (Janssen-Heininger, Mossman et al. 2008) al igual que alteran un amplio abanico de procesos como la migración e invasión, angiogénesis, procesos inflamatorios, etc., que se discutirán posteriormente (Janssen-Heininger, Mossman et al. 2008, Chiu, Shen et al. 2010, Fiaschi and Chiarugi 2012).

Una de las principales moléculas antioxidantes en el GBM es el lactato. Este se produce a consecuencia de la remodelación metabólica conocida como efecto Warburg (Warburg 1956). El tratamiento con CoQ10 reduce el nivel intracelular de lactato en un 50% (Capítulo IV, Figura 4.5), por efecto sobre el metabolismo glicolítico. En este trabajo hemos observado como el tratamiento con CoQ10 altera esta remodelación reduciendo el nivel del ATP, de aminoácidos esenciales, de PFKP, reduciendo también la activación de quinasas y de factores de transcripción como HIF-1 α (Capítulos V, Figura 4.2-6) y NF- κ B (Capítulo VI, Figura 6.2). El lactato intracelular producido en la glicolisis, además, ejerce un papel como antioxidante, disminuyendo los radicales libres inducidos por la radiación (Groussard, Morel et al. 2000, Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011) y estabiliza HIF-1 α incluso en condiciones

de normoxia (Lu, Forbes et al. 2002). El descenso del lactato intracelular mediado por CoQ10 contribuye a los niveles elevados de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 producidos por radioterapia, provocando un mayor daño en el DNA y un incremento de la apoptosis (Capítulo IV, Figura 4.2).

El factor de transcripción FOXO regula el nivel de enzimas antioxidantes de fase II como la catalasa y la SOD2 (Nogueira, Park et al. 2008, Gorrini, Harris et al. 2013), estando ligado su incremento con un peor pronóstico en pacientes de GBM (Shi, Zhang et al. 2010). Nuestros resultados muestran como el tratamiento con CoQ10 inactiva FOXO-3A mediante fosforilación, acompañado de un descenso del 50% en la actividad catalasa y del 44% en el nivel de SOD2 en células U251. Por el contrario, no se alteraron otras enzimas antioxidantes de fase II como la SOD1 o NQO1 en células tratadas con CoQ10 (Capítulo IV, Figura 4.5). Hasta el momento, no hay evidencias previas que muestren que el tratamiento con CoQ10 reduzca la actividad catalasa o el nivel de SOD2 en GBM. Sin embargo, existe un modelo de cáncer de mama inducido por DMBA en el que el CoQ10 inhibe la actividad catalasa y el nivel de SOD2 (Perumal, Shanthi et al. 2005). En un modelo de diabetes en rata se obtuvieron resultados similares, esta enfermedad se caracteriza por unos niveles elevados de ROS (Coldiron, Sanders et al. 2002). En relación con el GBM, tanto la catalasa como la SOD2 están asociadas con radioresistencia (Lee, Kim et al. 2004) y la inhibición de estas enzimas sensibiliza células de glioma de rata frente al daño pro-oxidativo (Smith, Zhao et al. 2007). La reducción de la catalasa y SOD2 por CoQ10, junto la reducción del lactato intracelular, contribuye a la radiosensibilización y potenciación, a corto y largo plazo, de la apoptosis inducida por radiación (Figura 7).

El glutatión (GSH) es otra de las moléculas antioxidantes íntimamente relacionadas con la respuesta radioadaptativa (Lee, Kim et al. 2004, Ortega, Mena et al. 2011). El GSH es la molécula antioxidante no enzimática más abundante en las células y juega un papel fundamental en la supervivencia y en la homeostasis redox (Gorrini, Harris et al. 2013). Protege las células frente a la oxidación inducida por $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 y su incremento está relacionado con la radioresistencia de células tumorales (Ortega, Mena et al. 2011). De hecho, el nivel de GSH se correlaciona negativamente con la sensibilidad de tumores cerebrales a la radiación (Kudo, Kokunai et al. 1990). A pesar de que no existen evidencias previas sobre la regulación del GSH por parte del CoQ10 en cáncer, se ha observado como el antioxidante reduce el nivel de GSH hepático que aparece incrementado en un modelo de isquemia en rata (Ito, Miwa et al. 1999). En colaboración con la Dra. Milica Pêsic (Universidad de Belgrado), se ha determinado como el CoQ10 disminuye la forma oxidada de glutatión (GSSG), sin disminuir el GSH y por lo tanto desciende el cociente GSSG/GSH. Este efecto es debido, probablemente, a la inhibición del nivel de glutamato, glicina, serina y

glutamina (Capítulo IV, Figura 4.7) a causa de la remodelación metabólica inducida por el CoQ10. El glutatión, a su vez, está relacionado con el “efecto espectador” inducido por la temozolomida (TMZ) en GBM. Se trata de un fenómeno biológico por el cual las células que no están expuestas directamente a la TMZ mimetizan respuestas de las células tratadas (Gorman, Tosetto et al. 2009). Los mecanismos por los que ocurre este efecto no están del todo claro, pero se sabe que el nivel de ROS y de las enzimas antioxidantes juega un papel importante (Gorman, Tosetto et al. 2009).

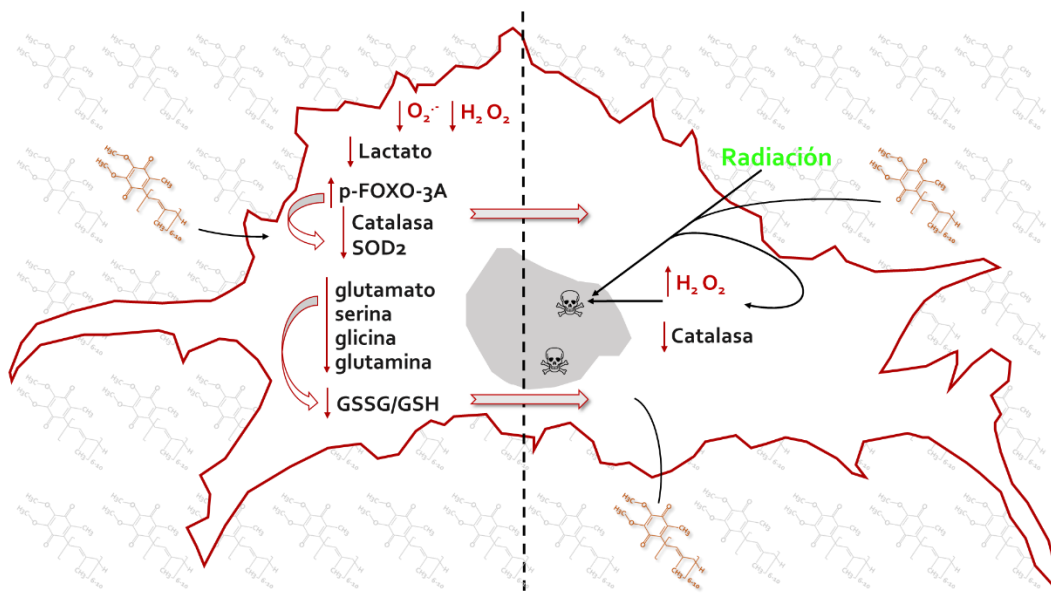


Figura 7. Sensibilización de células de GBM a radiación. Esquema que resume los resultados presentados en el capítulo IV de la presente Tesis Doctoral.

CoQ10 y sensibilización a TMZ

Hasta la fecha, la TMZ es el único quimioterápico que ha mostrado cierta eficacia en el tratamiento del GBM (Stupp and Newlands 2001). La FDA ha aprobado más de 160 medicamentos para tratar esta patología pero solo 3 se han llegado a utilizar de forma rutinaria: BCNU (*biodegradable carmustine wafers*), TMZ y más recientemente bevacizumab (Stupp and Newlands 2001, Cohen, Shen et al. 2009). El tratamiento con TMZ, un agente alquilante del DNA, incrementa la esperanza de vida de los pacientes entre 2 y 6 meses de media, lo que supone en muchos casos un incremento muy significativo en la supervivencia (Stupp and Newlands 2001). Sin embargo, las células de GBM desarrollan quimioresistencia por diferentes causas (Johannessen and Bjerkvig 2012).

La TMZ daña a las células produciendo O⁶-metilguanina, N⁷-metilguanina y N³-metiladenosina, generando roturas de doble cadena (DSBs) durante la replicación del DNA. La O⁶-metilguanina es la que produce una mayor citotoxicidad (Villalva, Cortes et al. 2012) desencadenando la apoptosis celular (Hirose, Berger et al. 2001, Hermisson, Klumpp et al. 2006) pero también autofagia (Kanzawa, Germano et al. 2004, Filippi-Chiela, Villodre et al. 2011), senescencia y catástrofe mitótica (Hirose, Berger et al. 2001). En la mayoría de las células la TMZ genera una detención del ciclo celular en la fase G₂/M, por la activación de las quinasas ATM y ATR (Newlands, Stevens et al. 1997), que lleva a la catástrofe mitótica, basada en la entrada de la células en mitosis con el DNA dañado, lo que lleva, en última instancia a la muerte celular (Castedo, Perfettini et al. 2004, Huang, Fletcher et al. 2008).

Estudios previos han demostrado como el antioxidante resveratrol sensibiliza al GBM al efecto de la TMZ induciendo catástrofe mitótica (Filippi-Chiela, Thome et al. 2013), lo que posiblemente ocurre por la regulación del nivel de ROS (Yuan, Xue et al. 2012). El pretratamiento con resveratrol y posterior tratamiento con TMZ incrementa la apoptosis reduciendo la autofagia mediada por ERK y ROS en células de GBM (Lin, Lee et al. 2012). En nuestro estudio se ha observado, *in vitro*, un fuerte descenso en los niveles de ROS tras el tratamiento con CoQ, lo que sugirió la posible potenciación del efecto del TMZ. De hecho, nuestros resultados indican cómo el CoQ₁₀ sensibiliza células de GBM al efecto citotóxico del TMZ, incrementando la apoptosis, y disminuyendo la senescencia y la autofagia, *in vitro* (Capítulo IV, Figura 4.8-9). Estos resultados se tradujeron en un efecto dramático, ya que los tumores de ratones tratados con CoQ₁₀ y TMZ se mantuvieron estáticos. Nuestros resultados suponen la primera evidencia sobre la sensibilización del CoQ₁₀ frente a TMZ.

Entre los factores que controlan la apoptosis inducida por TMZ destaca p53. Este supresor de tumores aparece mutado en un gran porcentaje de pacientes con GBM, que puede llegar a un 70% en el caso de GBM secundario (England, Huang et al. 2013). Su activación en respuesta a daño en el DNA y genotoxicidad desencadena apoptosis (England, Huang et al. 2013). Se ha descrito como la mutación de p53 correlaciona con una mayor resistencia a TMZ en pacientes de GBM, correlacionando, por tanto, con un peor pronóstico (Li, Jiang et al. 2008). La parada del ciclo celular en G₂/M y la posterior catástrofe mitótica inducida por la TMZ es dependiente de p53 (Hirose, Berger et al. 2001). Nuestros resultados indican un incremento significativo del nivel de p53 en células tratadas con CoQ₁₀+TMZ (Capítulo IV, Figura 4.9). De hecho, suponen la primera evidencia del efecto del CoQ₁₀ sobre la inducción de p53 en GBM. Estudios previos con el antioxidante resveratrol, han demostrado que este puede incrementar el nivel de p53 en células de GBM (Sato, Okada et al. 2013), de tumores pancreáticos (Zhou, Cheng et al. 2011)

y en células de mesotelioma (Lee, Park et al. 2014). Por otra parte, hay evidencias que relacionan p53 con la detención del ciclo celular mediante el acortamiento de telómeros. Este proceso puede generar daño en el DNA, que a su vez es reconocido por sistema dependiente de p53 (Harley, Futcher et al. 1990, Wynford-Thomas, Bond et al. 1995, Vaziri and Benchimol 1996). Se ha estudiado como el estrés oxidativo puede acortar los telómeros mediante la activación de p53 en células de GBM (Saretzki, Sitte et al. 1999). En función de estos antecedentes, se abordó el efecto del CoQ10 sobre el acortamiento de telómeros en células de GBM con y sin TMZ. Se observó un descenso acusado en la longitud telomérica en células tratadas con CoQ10. Este descenso podría deberse a la disminución de ROS y de p53 según evidencias indirectas indicadas previamente. Recientemente se ha descrito cómo el uso de inhibidores de telomerasa en modelos ortotópicos de GBM sensibiliza frente al daño inducido por la radioterapia (Ferrandon, Malleval et al. 2015). Este mecanismo podría regularse mediante terapia combinada con CoQ10, evitando los efectos tóxicos sistémicos de otros fármacos. Nuestros resultados la primera evidencia de regulación telomérica por parte del CoQ10 en cáncer.

Un 90% de los GBM recurrentes no muestran respuesta tras un segundo ciclo de TMZ, debido al desarrollo de quimioresistencia (Oliva, Nozell et al. 2010). Diferentes estudios han demostrado como la proteína MGMT repara los grupos O⁶-metilguanina producidos por TMZ gracias a su actividad metiltransferasa (Riemenschneider, Hegi et al. 2010, Villalva, Cortes et al. 2012). De hecho, la resistencia a TMZ está inversamente relacionada con el grado de metilación del promotor de MGMT y un nivel incrementado de la proteína (Villalva, Cortes et al. 2012). Los tumores de pacientes con el promotor de MGMT metilado responden de forma eficiente al TMZ (Agnihotri, Burrell et al. 2014). P53 es un regulador transcripcional de MGMT (Grombacher, Eichhorn et al. 1998). Según estas evidencias, MGMT se ha convertido en una proteína diana de diferentes aproximaciones terapéuticas para combatir la resistencia a TMZ (Fan, Liu et al. 2013), entre las que se encuentra el uso de antioxidantes. Huang y colaboradores mostraron en 2012 cómo el uso del antioxidante resveratrol reduce la resistencia a TMZ por la regulación de MGMT a través de la ruta de NF-κB en células T98G, incrementando el nivel de apoptosis (Huang, Lin et al. 2012). Cabe destacar el estudio en el que Switzeny y colaboradores observaron como una dieta rica en antioxidantes incrementa la metilación del promotor de MGMT en pacientes con diabetes. En base a estos resultados propusieron que el descenso en las ROS puede incrementar la metilación del promotor, aunque este hecho requiere de una mayor investigación (Switzeny, Mullner et al. 2012). Nuestros resultados indican cómo el tratamiento con CoQ10 no solo reduce el nivel de MGMT, posiblemente alterando el patrón de metilación de su promotor, sino que también disminuye la translocación de la proteína al núcleo (Capítulo IV, Figura 4.11). De hecho, estos

resultados abren la posibilidad a una nueva oportunidad terapéutica y sugieren el control del tráfico de MGMT al núcleo como mecanismo de regulación de la sensibilidad del GBM a TMZ.

Otra respuesta inducida por la TMZ es la senescencia (Gunther, Pawlak et al. 2003). Este proceso característico de respuesta a estrés o daño, se caracteriza por un cambio morfológico en las células que adquieren un tamaño mayor y por un incremento de la β -galactosidasa, consecuencia de la elevada actividad lisosomal (Schmitt 2007). Según se ha descrito previamente, la senescencia ocurre a consecuencia de la autofagia inducida por la TMZ, y permite la supervivencia celular y resistencia al tratamiento (Knizhnik, Roos et al. 2013). Si el estrés inducido por TMZ cesa, la autofagia se reduce y las células no entran en senescencia sino que mueren por apoptosis. De esta forma, la reducción de la autofagia y de la senescencia incrementa el efecto citotóxico de la TMZ es (Knizhnik, Roos et al. 2013). En nuestro estudio hemos visto como el tratamiento con CoQ10 reduce la senescencia en células de GBM con o sin cotratamiento con TMZ (Capítulo IV, Figura 4.12). Estos resultados sugirieron la posible modulación de la autofagia.

La autofagia es un mecanismo evolutivamente muy conservado (Mizushima and Komatsu 2011), que puede derivar en la supervivencia o la muerte celular (Tanida 2011). El proceso autofágico implica la formación de autofagosomas que llevan el material citoplasmático hasta los lisosomas para su degradación. En cáncer, permite a las células tumorales sobrevivir frente a condiciones de estrés metabólico e induce quimioresistencia (Kimmelman 2011, Wei, Zou et al. 2013). De esta forma, bloqueando la autofagia se puede potenciar la respuesta a la quimioterapia (Chen and Debnath 2010). En el GBM, la autofagia es un mecanismo de evasión de la apoptosis inducido por la TMZ. Los O^6 MeG provocados por la TMZ generan daño replicativo (DSBs) activando a ATM e induciendo autofagia (Knizhnik, Roos et al. 2013). La reducción de esta autofagia disminuye la senescencia, y se potencia la apoptosis. Nuestros datos demuestran que el tratamiento con CoQ10 reduce el nivel de autofagosomas marcados con LC3 y el cociente LC3II/I (Capítulo IV, Figura 4.14), mediante métodos de cuantificación de la autofagia aceptados actualmente (Daniel J Klionsky, Hagai Abeliovich et al. 2016). Por lo tanto el CoQ10 tendría un efecto sobre varios componentes del modelo hipotetizado por Knizhnik y colaboradores en 2013 relacionado con los diferentes mecanismos de quimioresistencia frente a TMZ (Figura 8).

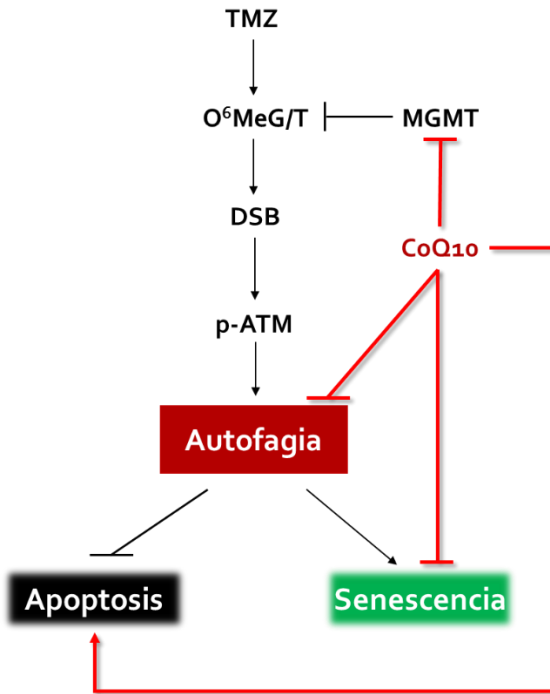


Figura 8. Efecto del CoQ10 sobre distintos componentes de la respuesta quimiorresistente a la TMZ. En este modelo modificado de Knizhnik et al., 2016, se muestra un resumen de los resultados obtenidos en nuestro estudio. El tratamiento con CoQ10 disminuye el nivel de MGMT y su localización nuclear en células de GBM. Además reduce procesos de autofagia y de senescencia, aumentando la

Nuestros resultados mostraron un incremento en la apoptosis inducida por la radiación en células pre-tratadas con CoQ10 y TMZ, frente al tratamiento estándar de radiación y TMZ. Según evidencias previas y los resultados mostrados previamente, atribuimos este efecto a la disminución en los niveles de glutatión por su papel sensibilizador frente a la TMZ (Kohsaka, Takahashi et al. 2013) o al efecto del acortamiento de telómeros sobre la sensibilización frente a radioterapia (Ferrandon, Malleval et al. 2015), si bien, el efecto pleiotrópico del CoQ dificulta apuntar a vías únicas y concretas en la mediación de este efecto

En resumen (Figura 9), el tratamiento con CoQ10 sensibiliza a células de GBM frente a radioterapia a través del incremento del nivel de p53, y del descenso del nivel y localización nuclear de MGMT, senescencia, longitud de telómeros y autofagia, estando todos estos procesos inter-relacionados e inter-regulados. Además, el tratamiento con CoQ10 sensibiliza a las células frente al tratamiento combinado con radiación ionizante y TMZ.

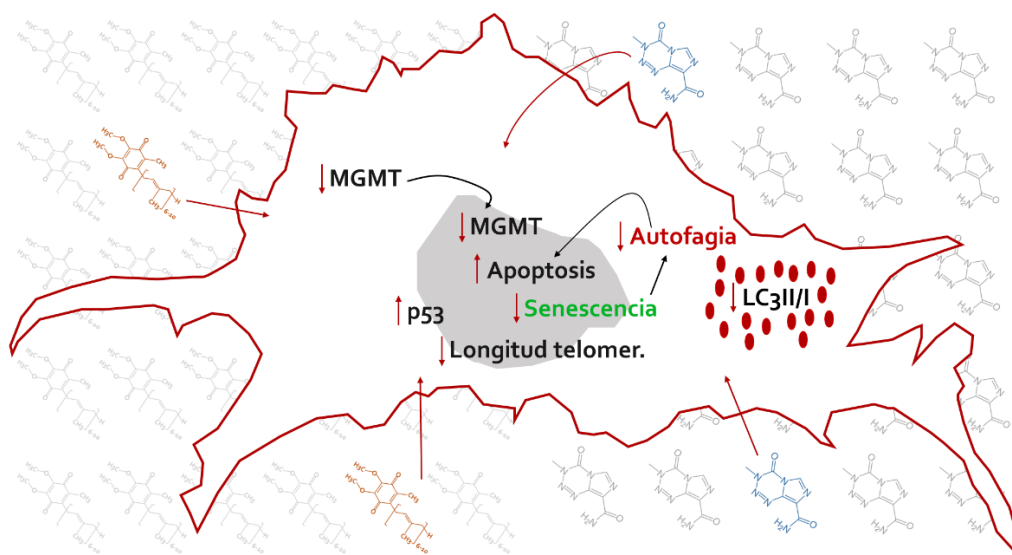


Figura 9. El CoQ10 sensibiliza a células de GBM frente a TMZ. Esquema que representa los resultados observados en el capítulo VII de la presente Tesis Doctoral.

Efecto del CoQ10 sobre el crecimiento, remodelación energética, motilidad e invasión tumoral

Las células de GBM se caracterizan por su elevada tasa de proliferación, motilidad y capacidad invasiva (Paw, Carpenter et al. 2015) que implica una gran remodelación metabólica e involucra factores como HIF-1 α (Shi, Zheng et al. 2015), NF- κ B (Basseres and Baldwin 2006) y la activación de las quinasas Akt, Erk y AMPK, también relacionados con la supervivencia y la evasión de la apoptosis (Wang, Zhan et al. 2014). La sobre-estimulación de estos factores y rutas tiene, en parte, su base en la mitocondria disfuncional (Levine and Puzio-Kuter 2010, Sabharwal and Schumacker 2014).

De acuerdo con estas premisas, nuestro estudio demuestra cómo el CoQ10 reduce la proliferación, motilidad e invasión de células de GBM, mediante el descenso en los niveles de HIF-1 α y NF- κ B y de la fosforilación de Akt, Erk y AMPK, incrementando el consumo de oxígeno ligado al complejo II de la CTE_m y, en última instancia, regulando negativamente el metabolismo glicolítico (Resultados, capítulo V).

Las mitocondrias desarrollan procesos esenciales como la generación de energía o la regulación de la proliferación celular y de la apoptosis (Ordys, Launay et al. 2010, Griguer and Oliva 2011). Su alteración juega un papel muy importante en la patogénesis del GBM (Ordys, Launay et al. 2010).

El GBM, como otros tipos tumorales, presenta una alteración metabólica que favorece la glicolisis aerobia (Furnari, Fenton et al. 2007), basada en la producción de lactato a partir de piruvato, comprometiendo la formación de Acetil-CoA y su incorporación al ciclo de Krebs (Vander Heiden 2011). Este estado celular favorece la estabilización de HIF-1 α , que regula genes relacionados con la respiración mitocondrial, afectando a la mitocondria para favorecer la glicolisis (Denko 2008). La alteración de estos genes está asociada con la inactivación de supresores tumorales como p53 (Matoba, Kang et al. 2006) y la activación de oncogenes como Ras (Yun, Rago et al. 2009) y puede generar un incremento en el nivel de hipoxia (Denko 2008), favoreciendo aún más la glicolisis. Por todo esto se considera que la actividad mitocondrial (Gottlieb and Tomlinson 2005) y la restauración de la fosforilación oxidativa podrían actuar como un supresor tumoral (Bonnet, Archer et al. 2007). HIF-1 α también actúa negativamente sobre el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, llevando en última instancia a un descenso en el consumo de oxígeno mitocondrial (Papandreou, Cairns et al. 2006, Denko 2008). En nuestro estudio se ha observado como el tratamiento con CoQ10 incrementa el consumo de oxígeno del complejo II de la cadena de transporte electrónico (Capítulo V, Figura 5.4). Este incremento está relacionado con un descenso inducido por el CoQ10 en el nivel de lactato y de ATP que sugiere un cambio metabólico, acompañado del descenso en el nivel de ROS y de HIF-1 α , sugiriendo una mejora en la función mitocondrial y una remodelación metabólica.

Las ROS modulan procesos clave en el GBM como la proliferación o la motilidad celular a través de rutas de señalización como la de Akt, Erk y AMPK. Algunas mutaciones en el DNAm_t generan un nivel elevado de ROS (Brandon, Baldi et al. 2006) que activan la cascada de PI3K/Akt, estimulando la transcripción de HIF-1 α (Koshikawa, Hayashi et al. 2009). El incremento en el nivel de ROS también favorece la fosforilación de Erk (Mehdi, Pandey et al. 2005), quinasa que también estimula la transcripción de HIF-1 α (Du, Xu et al. 2011). Por otra parte, la quinasa AMPK que actúa como regulador energético, es clave en el desarrollo del cáncer (Monteverde, Muthalagu et al. 2015). Aunque se activa por un incremento en el nivel de AMP, el aumento en el nivel de ROS mitocondriales asociado a hipoxia, también activa a esta quinasa (Emerling, Weinberg et al. 2009). De hecho se ha observado, *in vitro*, como un incremento en el nivel de H₂O₂ activa a AMPK (Choi, Kim et al. 2001). En el GBM, el incremento de las ROS está asociado a la activación de la AMPK, y esta juega un papel clave en la proliferación, remodelación energética, angiogénesis, etc. (Rios, Foretz et al. 2013). Por lo tanto, el descenso en la fosforilación de Akt, Erk y AMPK por parte del CoQ10 podría estar relacionado con el descenso previo de las ROS, influyendo en la estabilización de HIF-1 α , en la proliferación celular y en la remodelación metabólica.

La progresión del GBM lleva asociada una remodelación energética hacia glicolisis, en condiciones normóxicas (efecto Warburg), combinada con la glutaminólisis, dependiendo de HIF-1 α , AMPK, PFKP, etc. En estas condiciones, menos del 5% del piruvato se transporta a la mitocondria, transformándose en lactato más del 95% restante (Warburg 1956, Gillies, Robey et al. 2008). Mediante medidas de RMN se ha observado que las células de GBM, *in vitro*, convierten por estos procesos más del 90% de glucosa y más del 60% de glutamina en lactato y alanina, respectivamente (Wolf, Agnihotri et al. 2010). A pesar de que esta remodelación hacia un metabolismo glicolítico puede parecer ineficaz a nivel energético al generar sólo 2 moléculas de ATP por cada glucosa, este desbalance se compensa con un incremento del transporte de glucosa, debido a mutaciones hiperactivadoras de transportadores, como Glut-1 (Levine and Puzio-Kuter 2010). Por otra parte, mediante esta vía se sintetiza una gran cantidad de glucosa-6-fosfato que además de su papel en la glicolisis, forma parte de la ruta de las pentosas fosfato por la que se genera ribosa-5-fosfato. Esta se incorpora a la síntesis de ácidos nucleicos, y al NADPH que se incorpora a la síntesis de ácidos grasos, todos ellos metabolitos esenciales para la proliferación de las células tumorales (Kim 2013). Esta ruta también aparece incrementada en cáncer (Vander Heiden, Cantley et al. 2009) y en el GBM (Loreck, Galarraga et al. 1987). Nuestros resultados indican que el tratamiento de células de GBM con CoQ10 no incrementa el nivel de Glut-1, ni el nivel de glucosa intracelular, así como tampoco aumenta el nivel de aminoácidos, lo que sugiere que no se está sobrealimentando la ruta de las pentosas fosfato, ruta esencial para la remodelación metabólica tumoral (Vander Heiden, Cantley et al. 2009).

En condiciones metabólicas extremas, las células tumorales generan ATP por una ruta alternativa, convirtiendo dos ADP en una molécula de ATP y una de AMP (Hardie 2007). El incremento de AMP activa la AMPK, sensor del nivel de ATP celular, que actúa sobre numerosas dianas celulares relacionadas con la remodelación energética (Hardie 2007, Hardie, Ross et al. 2012), promoviendo la entrada de glucosa y retroalimentando la glicólisis (Hardie, Ross et al. 2012). Recientemente se ha demostrado cómo la AMPK, en respuesta a bajos niveles de ATP, activa la isoforma plaquetaria de la fosfofructoquinasa o PFKP en GBM (Domenech, Maestre et al. 2015). La PFKP está sobreexpresada y sobreactivada en una gran variedad de tumores, entre ellos el GBM, siendo su papel determinante en las etapas iniciales de la glicolisis (Deprez, Vertommen et al. 1997, Bando, Atsumi et al. 2005, Sanzey, Abdul Rahim et al. 2015). Durante el metabolismo glicolítico, la PFKP se induce como consecuencia de la activación de la traducción mitótica específica de su ARNm. Recientemente se ha estudiado como el descenso en el nivel de esta proteína y de AMPK está asociado con una mayor muerte celular en cáncer de mama (Domenech, Maestre et al. 2015). Por lo tanto, esta es otra vía de

activación de la glicolisis, en este caso mediada por AMPK (Domenech, Maestre et al. 2015). En el presente trabajo se muestra cómo el CoQ10 reduce, leve pero significativamente, la fosforilación de la AMPK, en la misma magnitud que el nivel de la isoforma P de la PFK, lo que sugiere que una disminución en la tasa glicolítica mediada por la inhibición de la PFKP, según evidencias previas en otras patologías tumorales (Domenech, Maestre et al. 2015).

Otro proceso involucrado en la remodelación energética de células tumorales es la glutaminólisis, donde a partir de glutamina se forma glutamato, que se transforma en α -cetoglutarato, que se incorpora al ciclo de Krebs (DeBerardinis, Mancuso et al. 2007). Estudios previos han demostrado como el uso de fenilacetato, un compuesto que reduce el nivel de glutamina, disminuye la proliferación de células de GBM (Samid, Ram et al. 1994). Ya que nuestros resultados indican que el tratamiento con CoQ10 reduce el nivel de glutamina, pero también el de ácidos grasos y de ATP (Capítulo V, Figura 5.3), se puede inferir que podría estar reduciendo el metabolismo de la glutamina como fuente energética alternativa. Además, hay que destacar el descenso observado en el nivel de UDP en células tratadas con CoQ10, lo que podría indicar que también se está alterando la glicogénesis. Se ha observado un efecto similar por parte del CoQ10 en estudios con células madre mesenquimales (Zhang, Yan et al. 2015), constituyendo nuestros resultados la primera evidencia del efecto regulador del CoQ10 de estas rutas en GBM y en cáncer.

Finalmente, uno de los principales responsables de esta remodelación metabólica en el GBM es HIF-1 α . Este factor de transcripción incrementa la expresión de numerosos genes relacionados con la glicolisis, entre ellos la lactato deshidrogenasa, enzima responsable de la conversión de piruvato en lactato (Denko 2008). En nuestro estudio hemos observado como el tratamiento con CoQ10 reduce el nivel de HIF-1 α y de lactato por lo que este tratamiento puede estar regulando la glicolisis vía HIF-1 α . En conjunto, hemos observado como el tratamiento con CoQ10 revierte parcialmente la remodelación metabólica característica del GBM, lo que debería afectar directamente a procesos de proliferación y de motilidad e invasión.

HIF-1 α es uno de los reguladores clave del desarrollo tumoral en el GBM y en otros tipos de cáncer, ya que actúa sobre una gran variedad de genes desencadenando procesos relacionados con la proliferación, supervivencia, angiogénesis, motilidad y la remodelación metabólica mencionada anteriormente (Dewhirst, Cao et al. 2008, Meijer, Kaanders et al. 2012). Aunque su nivel se incrementa en condiciones de hipoxia, se ha demostrado que el incremento de las ROS y RNS (Fiaschi and Chiarugi 2012, Sabharwal and Schumacker 2014) y la sobreactivación de la ruta PI3K/AKT/mTOR también estabilizan el nivel de HIF-1 α en condiciones de normoxia (Dewhirst, Cao et al. 2008, Rademakers, Span et al. 2008, Semenza 2010).

Uno de los reguladores de HIF-1 α es la ruta de activación de Akt que, además, juega un papel clave en la proliferación tumoral del GBM (Rajasekhar, Viale et al. 2003). De hecho, se ha observado como aparece hiperfosforilada en el 70% de muestras tumorales de GBM (Holland, Celestino et al. 2000, Rajasekhar, Viale et al. 2003), lo que otorga a la ruta de Akt un papel relevante en la búsqueda de dianas terapéuticas (Gharbi, Zvelebil et al. 2007). Como se ha mencionado, esta quinasa se activa por un incremento de ROS. En nuestro estudio hemos observado como el CoQ10 reduce la fosforilación de Akt, lo cual podría estar relacionado con el descenso en el nivel de ROS y a su vez podría ser responsable parcialmente del efecto del CoQ10 sobre HIF-1 α . Existen evidencias que indican que la fosforilación de Akt, el nivel de HIF-1 α y la consecuente proliferación, pueden controlarse con moléculas antioxidantes. Por ejemplo, el resveratrol puede reducir, *in vitro*, el nivel de HIF-1 α en diferentes tipos de células tumorales (Lee, Choi et al. 2015, Li, Cao et al. 2015). Recientemente se ha demostrado como el andrografólido, un compuesto con funciones antioxidantes extraído de una planta aromática china, reduce la proliferación de células de GBM inhibiendo la ruta de PI3K/Akt (Li, Zhang et al. 2012). Los resultados presentados en este trabajo son la primera evidencia del efecto del CoQ10 sobre la proliferación en células de GBM. Sí se ha demostrado como el co-tratamiento de modelos de cáncer de mama con tamoxifeno y CoQ10 inducía una menor proliferación celular que el tratamiento con tamoxifeno (Perumal, Shanthi et al. 2005, Perumal, Shanthi et al. 2005). Sin embargo hasta la fecha no se ha descrito su mecanismo de acción.

Se ha estudiado recientemente el papel de la quinasa AMPK en el incremento de la proliferación en GBM. A pesar de que su relación con cáncer requiere una mayor investigación, si se conoce su relación en el GBM, donde ejerce una función eminentemente proliferativa (Rios, Foretz et al. 2013). Este efecto se ha demostrado en experimentos con ratas (Jang, Calaoagan et al. 2011) ratones y muestras de pacientes de GBM (Rios, Foretz et al. 2013). Las ROS son uno de los principales activadores de AMPK, junto con el incremento del nivel de AMP, en particular del cociente AMP/ATP (Monteverde, Muthalagu et al. 2015). Por lo tanto el descenso en la proliferación provocado por el CoQ10 podría estar mediado en el descenso de AMPK asociado al descenso de las ROS.

La ruta de activación de ERK también juega un papel clave en la proliferación en GBM (Feldkamp, Lala et al. 1999), siendo una ruta de interés terapéutico para frenar el crecimiento tumoral (Li, Li et al. 2016). La activación de esta quinasa, además, puede mediar la respuesta proliferativa asociada a canales dependientes de potasio (Huang, Li et al. 2009). En nuestro estudio se ha comprobado como el CoQ10 reduce la fosforilación de Erk, siendo la primera evidencia de este efecto en cáncer. En estudios previos se ha comprobado un efecto similar en células endoteliales (Choi, Park et al. 2011).

Otro de los factores reguladores de la proliferación tumoral es NF- κ B (Naugler and Karin 2008). Este factor de transcripción aparece activado de forma constitutiva en una gran variedad de tipos de cáncer (Baldwin 2001), entre ellos el GBM (Nogueira, Ruiz-Ontanon et al. 2011). Incrementa proteínas entre las que destacan la ciclina D1, ciclina E, CDK2, c-Myc, Rb y HIF-1 α (Pahl 1999, Basseres and Baldwin 2006). Además estimula las células iniciadoras de tumores en GBM (Nogueira, Ruiz-Ontanon et al. 2011). En nuestro estudio hemos observado un descenso en el nivel de NF- κ B en células tratadas con CoQ10, junto con el descenso en la fosforilación de las quinasas Akt, Erk y AMPK y de HIF-1 α , que reducen la proliferación de células de GBM. La gran mayoría de estos factores, a su vez, están relacionados con la motilidad e invasión celular.

Los procesos de motilidad direccional e invasión requieren una remodelación y polarización del citoesqueleto de actina y la formación de estructuras dinámicas como los *lamelipodia*, *invadopodia*, fibras de estrés, etc. (Machesky 2008, Li, Xu et al. 2014, Djuzenova, Fiedler et al. 2015, Mallawaarachy, Buckland et al. 2015), además de la interacción con los componentes de la matriz extracelular (ECM) (Paw, Carpenter et al. 2015). Diferentes estudios han demostrado como la modulación de la motilidad e invasión celular en GBM está rigurosamente regulada por la remodelación energética, por los niveles de ROS, la sobreactivación de las rutas de Akt, AMPK y Erk, hipoxia y factores como HIF-1 α y NF- κ B (Brenneisen, Briviba et al. 1997, Chiu, Shen et al. 2010, Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011, Rios, Foretz et al. 2013, Shen, Kwan et al. 2013, Wang, Zhan et al. 2014, Paw, Carpenter et al. 2015).

La remodelación del citoesqueleto y la formación de estructuras especializadas como los *invadopodia*, requiere controlar procesos como la polimerización de actina, donde intervienen diferentes factores cuyo control podría ser una aproximación terapéutica de interés. Uno de los principales factores son las ROS, que favorecen procesos de invasión y metástasis en cáncer (Diaz, Shani et al. 2009), de hecho se han detectado niveles elevados de ROS en *invadopodia* (Diaz, Shani et al. 2009, Grek and Tew 2010). Se ha observado como la inhibición de ROS a su vez inhibe la fosforilación de las proteínas Tks4 y Tks5, ambas localizadas en los *invadopodia* y necesarias para la formación de estos (Diaz, Shani et al. 2009). La polimerización de actina también se favorece por un nivel incrementado de ROS (Schroder 2014). De hecho un estudio en células mieloides relacionó el descenso en la polimerización de actina con el descenso de ROS (Reddy, Fernandes et al. 2011). Otro mecanismo por el que el incremento en el nivel de ROS puede activar la migración e invasión celular, es la inducción de la cascada de MAPK, entre las que se encuentra ERK, p38 o JNK (Hwang, Jeong et al. 2004, Lee and Kim 2009, Chiu, Shen et al. 2010) y de las MMPs (Svineng, Ravuri et al. 2008). En nuestro estudio hemos observado como el tratamiento con CoQ10 desciende el nivel de ROS que

podría mediar en el descenso observado en la migración de células de GBM observada.

Los invadopodia son protrusiones ricas en actina que median la proteólisis de componentes de la ECM como la fibronectina, laminina y colágeno, para lo cual secretan proteasas como las MMPs (Chen 1989, Kelly, Yan et al. 1998). La ruta de PI3K/Akt favorece la remodelación de la actina y la formación de estas protrusiones de membrana, a través de las proteínas Rac (Scita, Tenca et al. 2000). Akt aparece localizada en regiones ricas en actina, favoreciendo la actividad de diferentes proteínas como la MMP-9 o NF- κ B (Kim, Kim et al. 2001). Su inhibición produce un descenso en la invasión en GBM, *in vitro* (Pu, Kang et al. 2004) e *in vivo* (Pu, Kang et al. 2006). La inhibición de MMP 2 y 9 tiene un efecto similar (Pu, Kang et al. 2006).

El incremento de la hipoxia y de HIF-1 α también está relacionado con la motilidad e invasión tumoral, por medio de la activación genes que codifican proteínas entre las que destacan la α -integrina, vimentina, MMPs, CD99, prolina-4-hidroxilasa, etc. (Harris 2002, Jensen 2009). Diferentes estudios han demostrado como el silenciamiento de HIF-1 α por RNA de interferencia reduce significativamente la migración en las líneas celulares U251, U87, U373 y LN18 de GBM (Fujiwara, Nakagawa et al. 2007, Shen, Kwan et al. 2013). En nuestro estudio hemos observado como el tratamiento con CoQ10 reduce la capacidad de migrar de células de GBM, reduciéndose la formación de estructuras de actina relacionadas con motilidad. Este efecto se debe al descenso inducido por el CoQ10 sobre la fosforilación de las quinasas Akt, Erk, sobre las ROS y sobre HIF-1 α .

Además de la remodelación del citoesqueleto, la invasión tumoral implica a las integrinas, proteínas de unión a la matriz, y la secreción de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular y favorecen la infiltración de las células de GBM en el parénquima cerebral (Weaver 2006). De nuevo el lactato juega un papel clave, su incremento está ligado a alteraciones en los patrones de motilidad e invasión celular, actuando sobre diversas integrinas y activando el factor NF- κ B (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011). Además, el incremento de lactato extracelular acidifica el medio activando las diferentes MMPs, y las catepsinas B, D y L, que también tienen actividad proteolítica (Tedone, Correale et al. 1997, Szpadarska and Frankfater 2001, Mohamed and Sloane 2006, Kato, Ozawa et al. 2007). El nivel de lactato está directamente relacionado con un incremento en la actividad de HIF-1 α (Hirschhaeuser, Sattler et al. 2011), que a su vez activa la expresión de diversas MMPs (Krishnamachary, Berg-Dixon et al. 2003, Ali, Reis et al. 2009), por lo que reducir el nivel de lactato podría ser una estrategia terapéutica eficaz para controlar la invasión tumoral.

Por otra parte, la regulación de las MMPs es crucial. Estas enzimas aparecen sobreexpresadas en células de GBM y su activación es uno de los principales procesos que subyacen a la invasión celular (Paw, Carpenter et al. 2015). Además del lactato y HIF-1 α en su regulación interviene la ruta Wingless/Int1 (Wnt) a través de la GSK3 β y β -catenina, que a su vez son activadas por Akt y NF- κ B (Paw, Carpenter et al. 2015) y también pueden estar activadas por un incremento en el nivel de H₂O₂ (Brenneisen, Briviba et al. 1997). Un incremento en la fosforilación de Akt activa las MMP2 y 9, sobre todo en las células que se encuentran en la periferia tumoral, en contacto con el parénquima cerebral (Kubiatowski, Jang et al. 2001), además favorece la translocación al núcleo de la β -catenina (Koul, Parthasarathy et al. 2001), favoreciendo procesos invasivos. En nuestro estudio hemos observado como el tratamiento con CoQ10 reduce la actividad de las MMPs y la degradación de sustrato, lo que podría estar relacionado con el descenso inducido por el CoQ10 sobre la fosforilación de AKT y el nivel de NF- κ B y también sobre las ROS y HIF-1 α . Estos resultados, *in vitro*, se tradujeron como un descenso en la infiltración intracerebral en modelos *in vivo*.

Las alteraciones asociadas a la invasión y migración tienen diferentes manifestaciones en los tumores humanos, entre las que destacan las pseudoempalizadas, unas regiones con una elevada hipoxia caracterizadas por un núcleo necrótico rodeado por células que migran desde dicho núcleo en busca de oxígeno y nutrientes (Rong, Durden et al. 2006). Estas células se caracterizan por una elevada expresión de HIF-1 α , MMP2 y uPAR (Rong, Durden et al. 2006). En el estudio presentado se ha visto como en tumores de ratones tratados con vehículo aparecen unas estructuras similares con marcaje positivo frente a hipoxia que no aparecen en ratones tratados con CoQ10.

Hasta la fecha no hay evidencias previas del uso del CoQ10 en el tratamiento del GBM. Sin embargo, estudios previos en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 demostraron como el tratamiento con dosis de CoQ10 similares a las utilizadas en nuestros estudios reduce la actividad MMP-2, disminuyendo, también, su capacidad invasiva (Bahar, Khaghani et al. 2010). Estudios con otros antioxidantes han demostrado el efecto de estos sobre procesos de motilidad e invasión. Ensayos con melatonina, han demostrado como esta puede reducir la migración e invasión en células U251 a través del descenso de la hipoxia y de HIF-1 α (Zhang, Liu et al. 2013). La α -mangostina, reduce la invasión en células de cáncer de páncreas por la regulación del nivel de ROS y de HIF-1 α (Lei, Huo et al. 2014). El resveratrol, reduce la capacidad de invasión y de metástasis en células de cáncer de páncreas a través de la modulación de la ruta de PI-3K/Akt/NF- κ B (Li, Ma et al. 2013), de forma similar a resultados obtenidos en cáncer de mama (Vergara, Valente et al. 2011) o con curcumina en cáncer de boca y cuello (Liao, Xia et al. 2011). Otros estudios con

resveratrol han demostrado como este modula procesos de motilidad, invasión y metástasis en cáncer de pulmón (Savio, Ferraro et al. 2016) mediante la reducción de los niveles de ROS y de HIF-1 α (Li, Cao et al. 2015). Recientemente, se ha demostrado que el efecto del resveratrol sobre la invasión de células iniciadoras de GBM, depende de la inhibición de la la ruta PI3K/AKT/NF- κ B (Jiao, Li et al. 2015), en línea con los resultados obtenidos en este estudio, con CoQ10. También se ha estudiado como diferentes flavonoides pueden reducir, *in vitro*, la migración e invasión en la línea celular de GBM U87 (Chiu, Shen et al. 2010).

Por lo tanto, en el caso del CoQ10 nuestros resultados son la primera evidencia de su efecto modulador sobre la proliferación, remodelación metabólica, migración e invasión en GBM, a través del descenso de las ROS, de la fosforilación de quinasas, del nivel de lactato y metabolitos clave, y de los factores HIF-1 α y NF- κ B (Figura 10).

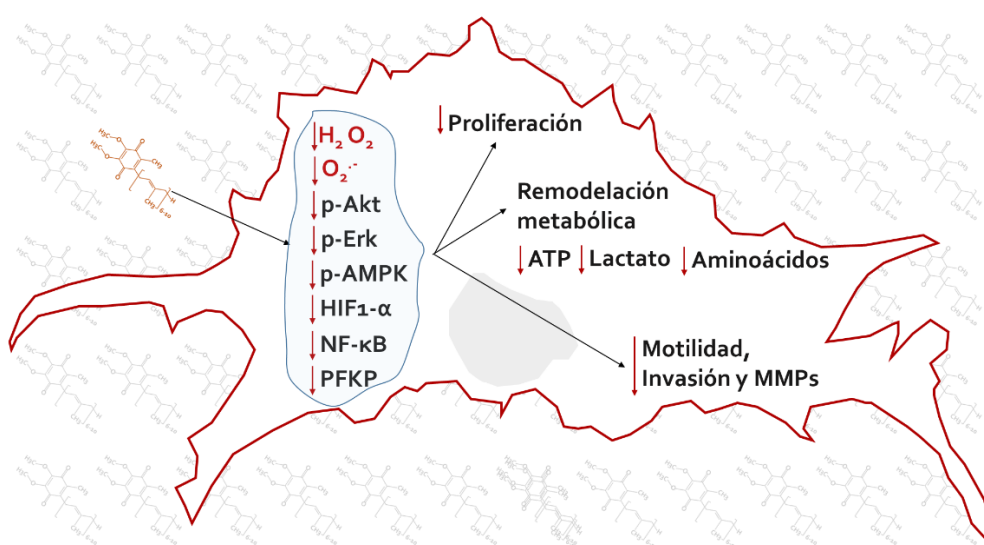


Figura 10. El CoQ10 modula procesos de motilidad e invasión en U251. Esquema que representa los resultados *in vitro* obtenidos en el capítulo V de resultados de la presente Tesis Doctoral.

El CoQ afecta a los procesos de angiogénesis y a la infiltración de células inflamatorias en modelos de GBM

La progresión del GBM no sólo depende de las características intrínsecas de las células tumorales, sino también de las distintas poblaciones celulares del nicho tumoral. Entre ellas destacan las células vasculares, endoteliales y pericitos, y las inflamatorias, monocitos, macrófagos y microglía (Charles, Holland et al. 2012, Sowers 2014). Estas poblaciones marcan procesos angiogénicos e inflamatorios, ambos estrechamente interrelacionados. El GBM es el más vascularizado de todos los tumores sólidos (Larger 2012), presentando una vasculatura aberrante tanto en función como en estructura (Hardee and Zagzag 2012). Por otra parte, diversos

estudios han demostrado que el porcentaje de microglía/macrófagos infiltrados en GBM puede ser desde un 8% hasta un 78% (Morantz, Wood et al. 1979, Morantz, Wood et al. 1979, Lorget 2012) estando su densidad correlacionada positivamente con el grado de hiperplasia microvascular (Nishie, Ono et al. 1999). En conjunto, ambos procesos juegan un papel clave en el progreso tumoral, repercutiendo sobre la proliferación celular y la invasión (Markovic, Glass et al. 2005, Lorget 2012).

CoQ10 y angiogénesis

Modular la respuesta angiogénica ha sido y será uno de los grandes desafíos de la investigación en GBM. Hasta ahora solo se han obtenido ciertos progresos con el uso de *bevacizumab*, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF utilizado en clínica para el tratamiento de diferentes tipos tumorales. A pesar de mostrar eficacia, la mayoría de los pacientes acaban desarrollando resistencia (Lorget 2012, Lu and Bergers 2013, Curry, Dahiya et al. 2015). Nuestros resultados indican que la administración de CoQ10 reduce el efecto angiogénico en modelos de GBM *in vitro* e *in vivo*, actuando a distintos niveles: reduce la proliferación y migración endotelial, la formación de tubos celulares y la madurez vascular, fundamentalmente por la reducción de la secreción de factores angiogénicos.

HIF-1 α regula la secreción de moléculas pro-angiogénicas, disparando la hiperplasia microvascular aberrante durante las secuencias hipóxicas originadas por los ciclos de crecimiento tumoral (Dewhirst, Cao et al. 2008, Hardee and Zagzag 2012). La hipoxia y HIF-1 α son principales responsables de la neoangiogénesis (Dewhirst, Cao et al. 2008). Nuestros resultados indican como el tratamiento de células de GBM con CoQ10 reduce el nivel de HIF-1 α , lo que sugiere la posible regulación de la respuesta angiogénica. De acuerdo con esta premisa, hemos comprobado como los medios condicionados de células U251 pre-tratadas con CoQ10 inducen una menor formación de tubos celulares (Resultados, Figura 6.1), evidenciando la alteración del secretoma de células U251 tratadas.

En concreto, se observó una reducción en el nivel de angiogenina, una molécula peptídica que está asociada al GBM e induce la formación de neovasos (Sheng and Xu 2015). Es más, recientemente se ha demostrado que, además, es un regulador positivo de la proliferación del GBM, actuando mediante la activación de NF- κ B (Xia, Fu et al. 2015). Nuestros resultados suponen la primera evidencia de la regulación de la secreción de este factor por parte del CoQ10.

El tratamiento con CoQ10 también redujo el nivel de IGF-1 secretado, el cuál es un regulador positivo de HIF-1 α y promueve, de forma indirecta la angiogénesis (Sinha, Koul et al. 2011). Por otra parte, este factor retroalimenta de forma autocrina y paracrina la proliferación del GBM (Ambrose, Resnicoff et al. 1994). Estudios previos han demostrado como polifenoles de la soja y el tomate reducen el nivel de IGF-1 y la proliferación en modelos de cáncer de próstata (Wang, DeGroff et al. 2003).

Nuestros resultados son la primera evidencia del efecto del CoQ10 sobre la secreción de IGF-1 en cáncer.

Otro factor angiogénico importante en la neovascularización del GBM es la leptina (Ferla, Bonomi et al. 2011). Diferentes estudios muestran como el nivel incrementado de leptina favorece la angiogénesis (Ferla, Bonomi et al. 2011) y la resistencia a TMZ en GBM (Han, Wang et al. 2013). Al igual que la angiogenina y el IGF-1, la leptina también constituye un bucle regulador positivo sobre la proliferación del GBM, actuando de forma autocrina y paracrina, activando la ruta JAK/STAT (Han, Wang et al. 2012). En nuestro estudio también se observó como el tratamiento con CoQ10 reduce su nivel en células de GBM. Estudios previos han demostrado como el uso de curcumina y sibilinina reducen el nivel de leptina en células de cáncer de mama (Nejati-Koshki, Akbarzadeh et al. 2014, Nejati-Koshki, Akbarzadeh et al. 2014). También se ha estudiado como el resveratrol reduce el nivel de leptina en células de cáncer de colon (Fouad, Agha et al. 2013). Nuestro estudio supone la primera evidencia del control de la secreción de leptina por parte del CoQ10 en GBM.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) también aparece incrementado en glioblastoma, y actúa sobre procesos de proliferación, supervivencia tumoral y angiogénesis estimulando la proliferación de células de músculo liso (Folkens, Shaked et al. 2009, Popescu, Alexandru et al. 2015). Se une a su receptor (PDGFR) activando las rutas de Akt y Erk (Nazarenko, Hede et al. 2012). Durante la angiogénesis y vasculogénesis, favorece la formación, estabilización y maduración de nuevos vasos, promoviendo el recubrimiento de la vasculatura (Andrae, Gallini et al. 2008). Además, este factor actúa de forma autocrina sobre células de GBM favoreciendo la proliferación (Popescu, Alexandru et al. 2015). Nuestros resultados muestran como el CoQ10 puede reducir la secreción de este factor, lo que sugiere la formación de vasos más inmaduros en modelos *in vivo*.

Otro de los factores cuya secreción se redujo por CoQ10 es el b-FGF, que no sólo es un factor angiogénico sino que además está relacionado con la resistencia al tratamiento antiangiogénico con el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab (Okamoto, Nitta et al. 2016). El efecto del CoQ10 sobre la secreción y la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* en modelos de células endoteliales de ratón ha sido caracterizado previamente (Choi, Park et al. 2011). Choi y colaboradores observaron que el CoQ10, mediante la disminución del nivel de bFGF, reducía la capacidad de formar tubos, la migración y la invasión de las células endoteliales, todo ello regulado por un descenso en la activación de Erk (Choi, Park et al. 2011). En nuestro estudio, el tratamiento con CoQ10 también reduce la activación de Erk, por lo que podría estar relacionado con la regulación de b-FGF y sería la primera evidencia del control de este factor por parte del CoQ10 en GBM. Estos datos sugieren que el CoQ10 no solo actuaría reduciendo la angiogénesis sino que podría sensibilizar a células de GBM frente al tratamiento con bevacizumab.

Estudios previos han demostrado como moléculas relacionadas con la invasión también son responsables de la resistencia al tratamiento con bevacizumab, entre las que destacan las MMP2 y 9 y TIMP-1 (Lucio-Eterovic, Piao et al. 2009). En nuestro estudio hemos observado como el tratamiento con CoQ10 reduce la actividad de las MMP2 y 9 y además reduce la secreción del inhibidor tisular de metaloproteasas 1 (TIMP-1), por lo que junto al efecto del CoQ10 sobre la secreción de b-FGF, el tratamiento con este antioxidante podría sensibilizar a las células de GBM frente al bevacizumab.

El único factor sobre el que el CoQ10 indujo un incremento en su secreción fue la activina A, un miembro de la familia de TGF- β . Aunque su actividad en células tumorales está en fase de estudio, se ha comprobado su función antiangiogénica (Loomans and Andl 2014). El tratamiento de células endoteliales con activina A reduce la formación de tubos y la proliferación *in vitro* (McCarthy and Bicknell 1993, Kaneda, Arao et al. 2011). Además actúa como inhibidor de la proliferación en cáncer de próstata (Ottley and Gold 2012). Este factor, apenas se ha estudiado en GBM, pero el incremento inducido por parte del CoQ10, podría ser responsable parcial del efecto observado sobre la angiogénesis *in vitro*, según las evidencias previas en los modelos citados anteriormente.

La vasculatura tumoral es aberrante en cuanto a que es inmadura y con una cobertura de pericitos reducida (Bergers and Song 2005). Recientemente diferentes hipótesis apoyan que, además de sus funciones conocidas, los pericitos podrían ser clave en procesos de formación de nuevos vasos mediante procesos como la vasculogénesis (Caspani, Crossley et al. 2014). Por otra parte, los pericitos juegan un papel clave en la resistencia a bevacizumab y otras terapias citotóxicas y citostáticas (Okamoto, Nitta et al. 2016). En nuestro estudio, hemos observado como el tratamiento con CoQ10 reduce la secreción de PDGF, un factor que estimula el recubrimiento de los vasos con pericitos, estos resultados estarían relacionados con el descenso del número de pericitos observado *in vivo*, acompañado de una menor densidad vascular en tumores de ratones tratados con CoQ10.

CoQ10 e inflamación

Las células de GBM se relacionan con el medio a través de procesos de inflamación (Sowers 2014) en los que interviene HIF-1 α (Dewhirst, Cao et al. 2008). Dado el efecto del CoQ10 sobre HIF-1 α , se analizó el efecto sobre la secreción de factores inflamatorios (Capítulo VI, Figura 6.3). Estos resultados indicaron, en medios condicionados de células tratadas con CoQ10, un descenso en el nivel de la interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 2 (IL-2), interleuquina 17 (IL-17), TIMP-1 y el factor quimioattractor de macrófagos (MCP-1). Además se observó como el tratamiento con CoQ10 reduce el nivel de NF- κ B. Estos resultados se tradujeron como una menor infiltración de células inflamatorias en modelos *in vivo*.

Uno de los factores cuya secreción redujo el CoQ10 en células de GBM fue la IL-6. Se trata de una citoquina pro-inflamatoria que está asociada con la elevada agresividad del GBM (Van Meir, Sawamura et al. 1990, McFarland, Hong et al. 2013). Se ha descrito como en GBM, el factor de transcripción NF- κ B activa a la IL-6 que a su vez activa la ruta de STAT3, actuando sobre genes relacionados con la respuesta inflamatoria como VEGF, SOCS3, c-Myc o la propia IL-6 (Yu, Pardoll et al. 2009, McFarland, Hong et al. 2013). Además se ha documentado su efecto sobre la angiogénesis e invasión en células de GBM (Liu, Li et al. 2010). En nuestro estudio, el descenso de IL-6 podría deberse al descenso en el nivel de NF- κ B, ambos en relación con la disminución en la angiogénesis e invasión observados. Nuestros resultados son la primera evidencia hasta la fecha que muestra como el CoQ10 puede reducir la secreción de IL-6 en cáncer.

El tratamiento con CoQ10 también redujo la secreción del factor quimioattractor de macrófagos (MCP-1), una de las principales citoquinas atractoras de monocitos y macrófagos (Deshmane, Kremlev et al. 2009, da Fonseca and Badie 2013) que además aparece sobreexpresado en GBM (Desbaillets, Tada et al. 1994). Entre las distintas moléculas que lo regulan, se ha descrito como el ATP incrementa su nivel en modelos de glioma en ratas (Jantaratnotai, Choi et al. 2009). Nuestro estudio supone la primera evidencia de control de este factor por parte del CoQ10, el descenso en el nivel de ATP mediado por el CoQ10 podría estar relacionado con este efecto.

Otro factor cuya secreción se redujo por el CoQ10 es la IL-2. Además de su función inflamatoria reclutando linfocitos, puede inducir proliferación en células de GBM *in vitro* (Capelli, Civallo et al. 1999). Nuestros resultados son la primera evidencia de su regulación por parte del CoQ10. El tratamiento con CoQ10 también redujo la secreción de la IL-17, otra citoquina proinflamatoria. Diferentes estudios han demostrado su efecto activador del crecimiento y la proliferación tumoral (Iida, Iwahashi et al. 2011). También activa a NF- κ B en diferentes tipos de cáncer (Straus 2013, Huang, Yang et al. 2014), entre ellos el GBM (Kehlen, Thiele et al. 1999). Nuestros resultados suponen la primera evidencia de la regulación de IL-17 por parte del CoQ10, cuyo descenso podría estar relacionado con el efecto observado sobre NF- κ B.

Como se ha indicado previamente, se observó un descenso en la secreción de TIMP-1 en células tratadas con CoQ10. Entre sus funciones destacan la inducción de proliferación y de angiogénesis a través de las rutas de Erk y Akt (Hornebeck, Lambert et al. 2005, Friedmann-Morvinski, Narasimamurthy et al. 2016). Su expresión se correlaciona con una mala prognosis en varios tipos de cáncer, entre ellos el GBM, donde aparece sobreexpresada en más del 60% de muestras de pacientes. Además se ha comprobado como pacientes con una baja expresión de TIMP-1 presentan una mejor prognosis (Friedmann-Morvinski, Narasimamurthy et al. 2016). Como se ha comentado, es responsable parcial de la resistencia a

bevacizumab en GBM (Lucio-Eterovic, Piao et al. 2009) y es una de las principales dianas de NF- κ B. Su silenciamiento produce un descenso en la proliferación de células T98 (Friedmann-Morvinski, Narasimamurthy et al. 2016). El descenso en la secreción de TIMP-1 en células de tratadas con CoQ10 podría estar relacionado con el descenso en la fosforilación de las quinasas Erk y Akt, y con el descenso en el nivel de NF- κ B.

Nuestros resultados indican que el tratamiento con CoQ10 reduce el nivel efectivo de NF- κ B. Este factor de transcripción está directamente relacionado con procesos de angiogénesis, reprogramación metabólica, apoptosis, supervivencia celular, respuesta inmune e inflamación (McFarland, Hong et al. 2013, Xia, Shen et al. 2014, Friedmann-Morvinski, Narasimamurthy et al. 2016). Promueve la secreción de las interleuquinas 1, 2, 6, del TNF- α , TIMP-1 y MCP-1 entre otros, que estimulan la infiltración de monocitos y macrófagos (Hardee and Zagzag 2012). En su ruta canónica, los homodímeros y heterodímeros de NF- κ B se encuentran retenidos en el citoplasma por la interacción con la proteína inhibidora I κ B. Al activarse la ruta, se ubiquitina permitiendo que NF- κ B se transloque al núcleo y ejerza su papel como regulador génico (Friedmann-Morvinski, Narasimamurthy et al. 2016). Recientemente se ha descrito como aparece sobreexpresado en las células del subtipo mesenquimal, consideradas las de peor prognosis y se regula por ROS (Bhat, Balasubramaniyan et al. 2013). Por lo tanto, la modulación de NF- κ B también tiene gran interés terapéutico, aunque los principales inhibidores de este factor presentan una gran citotoxicidad (Bottero, Withoff et al. 2006). El uso del antioxidante resveratrol ha mostrado resultados esperanzadores, ya que disminuye el nivel de NF- κ B p65 y su translocación a núcleo en células iniciadoras de GBM, *in vitro* (Jiao, Li et al. 2015). Nuestros resultados (Resultados, Figura 6.4) muestran como el tratamiento con CoQ10 desciende la translocación de NF- κ B al núcleo. Por tanto el descenso en la secreción de factores como MCP-1, TIMP-1, IL2 o IL6 puede deberse al descenso en el nivel y la localización subcelular de NF- κ B.

En base a los resultados obtenidos *in vitro*, se estudió la inflamación en modelos *in vivo*. En el modelo de xenoinplante se observó una menor infiltración de monocitos y macrófagos en tumores de ratones tratados con CoQ10, además de una menor asociación entre monocitos y macrófagos y vasculatura (Resultados, Figura 6.8). Estos resultados suponen un hallazgo importante, ya que los macrófagos contribuyen a la progresión tumoral mediante la secreción de factores de crecimiento y de metaloproteasas, favoreciendo procesos invasivos (da Fonseca and Badie 2013). Los macrófagos, a su vez, liberan factores angiogénicos promoviendo la angiogénesis (Fiaschi and Chiarugi 2012), por lo que no solo se regula la respuesta inflamatoria sino también la angiogénica. A nivel cerebral la inflamación supone un incremento en la infiltración de microglía. La microglía representa entre un 13 y un 34% del total de células viables en diferentes gliomas, jugando un papel clave en el desarrollo tumoral (Badie and Schartner 2001). En GBM la microglía promueve la invasión de células tumorales a través de la secreción del

factor TGF- β , IL-10 y de metaloproteasas (Wesolowska, Kwiatkowska et al. 2008, Ye, Xu et al. 2012, Coniglio and Segall 2013). En nuestro estudio se observó una gran infiltración de microglía en ratones del modelo ortotópico que se vio reducida significativamente en ratones tratados con CoQ10 (Resultados, Figura 6.9). Por lo que el efecto observado *in vitro* se traslada a modelos *in vivo* generando una menor infiltración de células inflamatorias de origen murino entre las células de GBM humano inyectadas, tanto de forma subcutánea como intracraneal.

Por lo tanto el tratamiento con CoQ10 en células de GBM reduce la secreción de factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios, entre los que destacan PDGF, b-FGF, TIMP-1, etc. Induciendo una menor angiogénesis *in vitro*. Además, hemos comprobado como el tratamiento con CoQ10 también reduce el nivel de NF- κ B (Figura 11). Estos resultados *in vitro* se traducen con una menor infiltración de células inflamatorias y una menor angiogénesis en modelo *in vivo*.

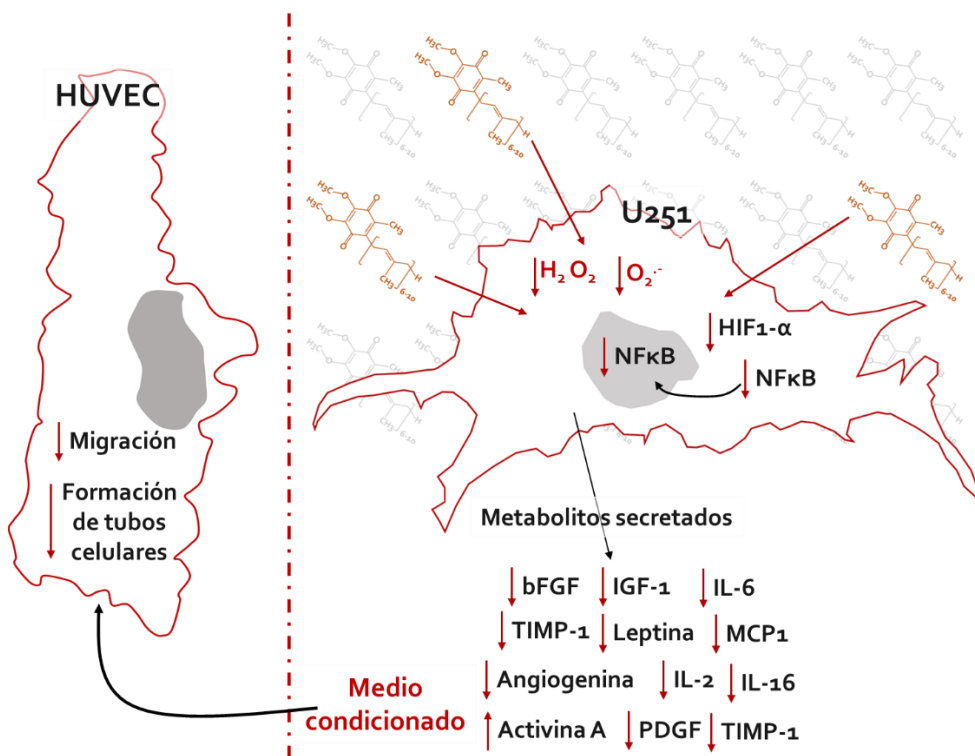


Figura 11. Efectos del tratamiento con CoQ10 sobre procesos de angiogénesis e inflamación en modelos de GBM *in vitro* e *in vivo*. Esquema que representa los principales resultados obtenidos en el capítulo VI de la presente Tesis Doctoral.

Discusión

Conclusiones

The image features a complex, dark, branching network of lines that resembles a neural network or a dense thicket of bare tree branches. The lines are thin and intricate, with many small, star-like junctions. The background is a light beige or tan color with a subtle, textured pattern, possibly representing aged paper or a wall. The overall composition is abstract and visually busy.

Más que el amor, que el dinero, que la fe,
que la fama, que la justicia, dime la verdad

Into the wild

1. Niveles elevados de NQO1 en hipocampo y neocorteza es un marcador de la fase premórbida en ratones 3xTg-AD.
2. El CoQ10 protege a las células endoteliales, *in vitro*, al inhibir la entrada del péptido β A en la mitocondria, disminuyendo la disfunción vascular.
3. La dieta suplementada con Ubiquinol y vitamina C reduce la hipoxia, la carga de β -amiloide y el grosor de la lámina basal en ratones 3xTg-AD. Esta reducción en el grosor de la lámina basal podría facilitar el tratamiento con memantina.
4. Por primera vez se ha caracterizado una correlación entre el depósito de placas de β -amiloide y la hipoxia en hipocampo de ratones 3xTg-AD.
5. El tratamiento con CoQ10 en GBM, *in vitro*, disminuye la capacidad antioxidante total celular e incrementa la sensibilidad de las células de GBM frente a la radiación.
6. Por primera vez se ha observado como el control de las ROS con CoQ10 regula el nivel de MGMT y su translocación al núcleo en células de GBM, sensibilizándolas a TMZ mediante la potenciación de la apoptosis y reducción de la autofagia y consiguiente senescencia.
7. El efecto inhibitorio del CoQ10 sobre la proliferación, motilidad e invasión del GBM es pleiotrópico y multifactorial, e implica la remodelación metabólica y cambios en la señalización.
8. El nivel de HIF-1 α puede reducirse con un tratamiento con CoQ10 en células cultivadas *in vitro* en condiciones de normoxia, que podría ser una causa parcial del efecto antiangiogénico en modelos animales.
9. El CoQ10 administrado de forma intraperitoneal resulta efectivo, frenando la proliferación e invasión en modelos ortotópicos de GBM.
10. El efecto antiangiogénico y antiinflamatorio del CoQ10 depende de la regulación del secretoma de las células de GBM, resultando en una reducción de ambos procesos y en la ralentización de la progresión tumoral.

11. El CoQ10 emerge como una molécula de gran interés terapéutico, ya que ejerce un efecto pleiotrópico sobre los principales sellos de identidad del GBM y no muestra efectos secundarios adversos a las dosis utilizadas en los experimentos incluidos en la presente Tesis Doctoral.

Anexos



Stay hungry, stay foolish

Steve Jobs

Anexo I. Información adicional de Materiales y Métodos

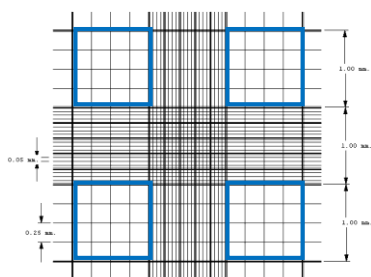
Anexo 1.1. Cultivos celulares

Mantenimiento de líneas celulares

1. Las diferentes líneas celulares se incuban en sus correspondientes medios de cultivo a 37° con un 5% de CO₂ (Ver Figura 1 “Material y métodos”).
2. Para el mantenimiento, lavar las células con solución de Hanks estéril ([Sigma-Aldrich](#)).
3. Despegar las células incubando con tripsina* al 1% durante 5 min a 37°. Detener la actividad de la tripsina con medio de cultivo suplementado con FBS o con FBS directamente.
4. Centrifugar las células a 300 g durante 4 minutos.
5. Hacer un recuento celular en la cámara de *Neubauer*, determinar la viabilidad celular con azul Trypan ([Sigma-Aldrich](#)) y el número total de células.
6. Cultivar un número determinado de células en función de la superficie correspondiente.

Recuento y determinación de viabilidad en la cámara de Neubauer ([Marienfeld](#))

1. Se mezclan 10µL de muestra con 10µL de azul Trypan ([Sigma-Aldrich](#)).
2. Se toman 10µL de la mezcla y se carga la cámara.
3. Se cuentan las células que hay en los cuatro cuadrantes marcados en la figura A1. Aquellas células que estén solo la mitad dentro del cuadrante se contabilizan solo en la parte de arriba o de abajo y en la de la derecha o izquierda.
4. A continuación se aplica la dilución correspondiente.



$$N^{\circ}cél/ml = \frac{N * d * n * 10.000}{NC}$$

N= nº de células en los diferentes cuadrantes
d=2 si se utiliza azul Trypan, sino d=1
n= volumen total en ml de la dilución de células
NC= número de cuadrantes contados

Figura A1. Esquema cuantificación cámara de Neubauer. Para la cuantificación de la viabilidad y número de células con la cámara se requiere contar al menos 3 de los cuatro cuadrantes y aplicar la ecuación de la derecha.

Plásticos, densidades y medios de cultivo

Nombre	Área (cm ²)	Siembra (mill.cél.)	Confluencia (mill. cél.)	V.medio (ml)	V. lavado (ml)	V. trips (ml)
Botella T-150	150	2	12	25	8	6
Botella T-75	75	1	6	10	5	3
Botella T-25	25	0,5	2	5	3	1
Placa 6p	10	0,15	0,6	2	1	0,5
Placa 12p	4	0,06	0,15	1	1	0,5
Placa 24p	2	0,03	0,06	0,5	0,5	0,25
Placa 96p	0,34	0,006	0,03	0,2	0,1	0,06

Tabla A.1. Nº de células para cultivos en las diferentes superficies. Los valores que aparecen corresponden a células U251, estos valores varían en función del tamaño de cada tipo celular.

Congelado de líneas celulares

1. Tomar células a una densidad de 1 millón/mL.
2. Resuspender en FBS con 10% de di-metil-sulfóxido (DMSO) que actuará como agente crioprotector.
3. Enfriar a 4° durante 1 hora.
4. Congelar a -20° durante 24 horas.
5. Congelar a -80° un máximo 6. Se puede pasar a una gradilla con Isopropanol para que la congelación sea gradual.
6. Para mantener las líneas celulares congeladas durante más de 6 meses es recomendable utilizar nitrógeno líquido.

Descongelado de líneas celulares

1. Tomar una alícuota congelada y ponerla en un recipiente con hielo mientras se prepara todo el material
2. Descongelar en un baño a 37° en agitación.
3. Rociar con etanol el tubo y transferir a un tubo de centrifuga.
4. Centrifugar a 1200 rpm durante 4 minutos.
5. Descartar el sobrenadante y sembrar las células en una botella adecuada.
6. Cuando las células estén pegadas a la superficie retirar el medio y añadir medio nuevo.
7. De esta forma se garantiza que no queden restos de DMSO.

Anexo 1.2. Soluciones y reactivos

Buffer Fosfato (PB)

Compuesto	0,2M	0,1M
Na ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich)	21,8g	10,9g
NaCl (Fisher Scientific)	6,4g	3,2g
H ₂ Od	1000mL	1000mL

Tabla A.2. Preparación del PB. Una vez preparado, ajustar el pH en función de las condiciones experimentales.

Buffer Fosfato Salino (PBS)

Solución	Solutos	Conc.	1L	0,5L	0,1L
A	NaCl (Fisher Scientific)	3X	22,79g	11,39g	2,28g
		10X	75,96g	38g	7,59g
	Na ₂ HPO ₄ (Sigma-Aldrich)	3X	5,34g	2,67g	0,53g
		10X	17,8g	8,9g	1,78g
B	ClNa (Fisher Scientific)	3X	22,79g	11,39g	2,28g
		10X	75,96g	38g	7,59g
	NaH ₂ PO ₄ (Sigma-Aldrich)	3X	4,14g	2,12g	0,414g
		10X	13,8g	6,9g	1,38g

Tabla A.3. Preparación de PBS. Añadir 100mL de "B" y 500mL de "A". Ajustar el pH a 7,4, aunque puede variar en función de las condiciones experimentales.

Paraformaldehído (PFA) al 4% en PB

1. Trabajar en campana de extracción de gases.
2. Calentar 50mL de agua destilada.
3. Añadir 4g de paraformaldehído ([Sigma-Aldrich](#)).
4. Disolver y calentar hasta 60°.
5. Dejar enfriar.
6. Añadir una gota de NaOH 1 M ([Sigma-Aldrich](#)) (aclara la solución).
7. Enrasar hasta 50mL con H₂Od.
8. Añadir 50mL de PB 0,2M pH 7,2.

Anexo 1.2.1 Soluciones Western Blot

Extracción de proteínas

- Extracción con solución RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*):
 1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos.

2. Pretratar y tratar según corresponda.
 3. Lavar con PBS pH 7,4 frío.
 4. Añadir 200µl de solución RIPA con 1 µL/mL de inhibidor de proteasas.
 5. Raspar la superficie del pocillo con un *scraper* para levantar todas las células y pasarlas a un tubo *ependorf* de 1,5 ml (en hielo).
 6. Mantener en agitación y en hielo 30 minutos.
 7. Si las muestras presentan muchos ácidos nucleicos, se debe sonicar (Si es tubo a tubo 5-10 segundos. Si es en un baño-sonicador, sonicar 1 minuto).
 8. Centrifugar a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°.
 9. Separar el sobrenadante y congelar a -80°. Antes de congelar separar 5µl para la cuantificación de proteínas por BCA o Bradford.
 10. Normalización de la concentración de proteínas en cada muestra (mg/ml).
 11. Tomar 100 µg total de proteína para cada *Western blot*.
- Extracción con solución SDS-DTT
 1. Cultivar las células en una placa de 6 pocillos
 2. Pretratar y tratar según corresponda
 3. Lavar las células con PBS (a temperatura ambiente, lavado rápido).
 4. Añadir 200µl de solución SDS-DTT* a 65° C con 1 µL/mL de inhibidor de proteasas (Hacerlo sobre hielo para que la placa no se altere por la elevada temperatura del SDS-DTT).
 5. Raspar la superficie del pocillo con un rascador (*scraper*) para levantar todas las células y pasarlas a un tubo *ependorf* de 1,5 ml (en hielo).
 6. Sonicar. Si es tubo a tubo 5-10 segundos. Si es en un baño-sonicador, sonicar 1 minuto.
 7. Calentar 2 min a 95° C. Poner peso sobre los tubos.
 8. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga a temperatura ambiente.
 9. Separar el sobrenadante y congelar a -80°.
 - Homogenizado de tejidos y extracción de proteínas
 1. Homogenizar el tejido en hielo con 150 µL de solución de lisis (SDS 2%, 20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 5mM CaCl₂).
 2. Añadir cóctel de inhibidores de proteasas.
 3. Centrifugar el lisado (14.000 rpm) a 4°C durante 15 minutos.
 4. Volver a homogeneizar.
 5. Centrifugar el lisado (máx. rpm) a 4°C durante 5 minutos.
 6. Sonicar 30 segundos a 4°C
 7. Cuantificar la proteína por el método de BCA.

8. Normalización de la concentración de proteínas en cada muestra (mg/ml).
9. Tomar 100 µg total de proteína para cada western blot.

Preparación del gel separador y empaquetador

- Solución del separador 2x (para Volumen final (Vf) de H₂Od 500 ml):
 - Tris-HCl (pH 8,8) Trizma 1,5 M (90,85 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
 - SDS 0,1% (0,5 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- Solución del empaquetador 2x (para Vf de H₂Od 500 ml):
 - Tris-HCl (pH 6,5) Trizma 0,5 M (32,29 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
 - SDS 0,1% (0,5 g) ([Sigma-Aldrich](#)).

Gel separador						
% Acril.	Sep. Buffer 2x	Acril 40% (Amresco)	H ₂ Od	APS 10% (Sigma-Ald)	TEMED (GE Health)	Gel
5	3,75 ml	0,939 ml	2,770 ml	3,75 µl	3,75 µl	Fino
5	5 ml	1,252 ml	3,693 ml	50 µl	5 µl	Grueso
7,5	3,75 ml	1,406 ml	2.306 ml	37,7 µl	3,75 µl	Fino
7,5	5 ml	1,875 ml	3,075 ml	50 µl	5 µl	Grueso
10	3,75 ml	1,875 ml	1,835 ml	37,7 µl	3,75 µl	Fino
10	5 ml	2,497 ml	2,448 ml	50 µl	5 µl	Grueso
12,5	3,75 ml	2,343 ml	1,361 ml	37,7 µl	3,75 µl	Fino
12,5	5 ml	3,124 ml	1,822 ml	50 µl	5 µl	Grueso
15	3,75 ml	2,812 ml	0,938 ml	37,7 µl	3,75 µl	Fino
15	5 ml	3,75 ml	1,250 ml	50 µl	5 µl	Grueso
Gel empaquetador						
4	2,5 ml	0,500 ml	1,97 ml	25 µl	5 µl	

Tabla A.4. Preparación de geles. La composición del gel separador varía en función del tamaño de las proteínas que se quieran analizar.

Running buffer (10x)

- 500 mL H₂Od
- Tris-HCl (pH 8,8) Trizma 0,25 M (15,15 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- SDS 10% (5 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- Glicina 1,92 M (72 g) ([Sigma-Aldrich](#)).

TBS/ TTBS/ TTBSL

- Tris-HCl (pH 8,8) Trizma 2 M (12 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- NaCl 0,6 M (18,6 g) (TBS) ([Fisher Scientific](#)).
- Tween 20 (10 ml) (TTBS) ([Sigma-Aldrich](#)).

Transfer buffer (10%)

- 400 mL H₂O
- Tris-HCl (pH 8,8) Trizma 0,5 M (30 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- SDS 0,2% (1 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- Glicina 1,92 M (72 g) ([Sigma-Aldrich](#)).
- Metanol 20% (100 ml) ([Sigma-Aldrich](#)).

Composición de solución SDS-DTT

- 6,25 mM Tris HCl ([Sigma-Aldrich](#)), pH 7,6.
- 2% SDS (sodium dodecyl sulfato) ([Bio-Rad](#)).
- 20% glicerol ([Sigma-Aldrich](#)).
- 100 mM DTT (Ditiotreitol) ([Sigma-Aldrich](#)).

Composición de solución RIPA

- 150 mM cloruro sódico ([Fisher Scientific](#)).
- 1.0% Triton X-100 ([Fisher Scientific](#)).
- 0.5% Deoxicolato sódico ([Sigma-Aldrich](#)).
- 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfato) ([Bio-Rad](#)).
- 50 mM Tris ([Sigma-Aldrich](#)) pH 8.0.

Composición de inhibidores de proteasas ([Roche](#))

- Leupeptin 5 µg/ml.
- Pepfabloc 0,5 mg/ml.
- Pepstatin 5 µg/ml.
- Aprotinin 0,5 µg/ml.

Anexo 1.3. Modelos animales

Sacrificio de animales: Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Comunidad Económica Europea sobre el bienestar de los animales de experimentación (directiva 86/96 o 86/69/ECC) y del Comité Ético de Experimentación animal de la Universidad de Castilla la Mancha (PI-2006/15).

1. Inyección de una dosis combinada de de clorhidrato de ketamina (1,5 mL/kg, 75 mg/kg [Ketolar, Parke-Davis](#)) y xilazina (0,5 ml/kg; 10 mg/kg [Xilagesic, Calier](#)) por vía intraperitoneal. Bajo anestesia.
2. Perfundir con solución salina para lavar (0,9% NaCl en H₂O destilada).
3. Perfundir con paraformaldehído al 4%* en PB 0,1 M pH 7,2.
4. Extracción de los órganos y tejidos de interés.

Procesamiento de tejidos

1. Postfijar las muestras en PFA ([Sigma-Aldrich](#)) al 4% en PB*. Dejar 24h u overnight.
2. Retirar PFA y añadir a las muestras la solución crioprotectora para tejido de ratón (sacarosa al 30% en PB pH 7,2). Almacenar a -20° hasta que se vayan a preparar las muestras para cortar.
3. Corte de muestras en micrótopo de congelación:
 - a. Encender el micrótopo y poner la temperatura mínima.
 - b. Aplicar sobre el soporte de corte unas gotas de sacarosa al 30% en PB para hacer la base sobre la se coloca la muestra
 - c. Cubrir los bordes del soporte con papel
 - d. Poner la temperatura de corte y realizar los cortes
 - e. Almacenar cada corte en líquido de conservación
 - f. Al terminar limpiar bien la cuchilla
 - g. Aumentar la temperatura y eliminar rápidamente los restos de sacarosa que quedan sobre el soporte.
4. Recoger las muestras conforme se van cortando en solución conservadora para muestras de ratón (Glicerol ([Sigma-Aldrich](#)) al 20% Etilenglicol ([Sigma-Aldrich](#)) al 30% en PB pH 7,2).
5. Almacenar las muestras a -20°.

Cuadro de peso del modelo ortotópico

Seguimiento del peso de los ratones del modelo ortotópico de GBM

Ratón/Semana	1	2	3	4	5	6	7
Control 1	24	27,3	30,4	31,4	30,7	31,3	31,5
Control 2	24	27	30,7	30,1	30,4	31,2	30,5
Control 3	24	28,4	31,4	32,4	32,6	32,7	32,7
Control 4	25	29	31,4	31,2	31,1	31,3	31,8
Control 5	25	29,8	36	35,2	34,7	36,5	36,1
Media CoQ10	24,4	28,3	31,98	32,06	31,9	32,6	32,52
CoQ 1	24	29,4	32,5	34,3	34,1	34	34,2
CoQ 2	25	31,2	34,5	34,8	35	36,6	36
CoQ 3	25	30,9	35	34,5	33,9	34,8	35
CoQ 4	24	29,5	31,2	31,2	31,1	31,1	30,9
CoQ 5	24	28,5	30	30	30	31,8	31,2
Media Control	24,4	29,9	32,64	32,96	32,82	33,66	33,46

Tabla A.5. Los ratones se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Medicina de Ciudad Real durante 7 semanas. La inyección ortotópica se llevó a cabo durante la segunda semana. Peso expresado en gramos.

Cuadro de pesos del modelo xenoinplante

Seguimiento del peso de los ratones del modelo xenoinplante de GBM							
Ratón/Semana	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7
Control 1	28,00	30,00					
Control 2	30,00	30,40	32,50	33,00	33,80	35,00	34,00
Control 3	30,00	31,30	29,80	32,30	33,80	35,00	33,00
Control 4	30,00		31,80	32,70	31,10	31,30	31,90
CoQ 1	28,30	28,50	29,10	31,60	29,20	30,30	30,50
CoQ 2	30,00	31,50	31,20	31,80	31,20	29,90	32,80
CoQ 3	28,00	29,10	29,40	31,40	30,90	32,70	32,20
CoQ 4	28,80	29,50	30,10	30,60	31,20	30,60	31,60
TMZ 1	29,00	31,70	29,00	29,90	29,10	29,70	30,00
TMZ 2	33,00	32,50	33,30	31,20	34,20	33,40	34,00
TMZ 3	33,00	31,50	30,10	32,10	33,90	33,40	34,00
TMZ 4	29,70	31,00	30,10	31,20	32,00	31,70	32,00
CoQ + TMZ 1	26,00	29,90	29,10	29,80	31,00	30,70	30,70
CoQ + TMZ 2	30,00	29,90	31,00	31,00	31,60	31,60	32,60
CoQ + TMZ 3	30,00	31,10	31,20	31,80	32,90	31,60	32,60
CoQ10 + TMZ 4	30,50	31,40	30,70	29,20	29,20	30,10	30,40

Tabla A.6. Para el experimento de xenografts se utilizaron 4 grupos de ratones nu/nu. La inyección se llevó a cabo en la primera semana y el sacrificio en la sexta semana. Los ratones recibieron la dosis de CoQ10 dos veces por semana vía intraperitoneal.

**Anexo 1.5. Otros
Extracción de lípidos (HPLC)**

1. Tomar 90 µl de muestra y añadir 10 µl de SDS al 10% ([Bio-Rad](#)).
2. Vortex 10 segundos.
3. Añadir 200 µl de Etanol-Isopropanol (95:5).
4. Vortex 10 segundos.
5. Añadir 500 µl de hexano ([Sigma-Aldrich](#)).
6. Vortex 10 segundos.
7. Centrifugar en la micrófuga 5 minutos a máxima velocidad.
8. Recoger la fase superior (fase hexano) con cuidado de no recoger nada de la fase acuosa.
9. Repetir pasos 5, 6, 7 y 8.
10. Secar en speed-back (20 minutos aprox).
11. Almacenar a -80°.

Lisis celular

1. Preparar buffer de lisis. Se utilizará Tritón x-100 al 0,5% en solución NET (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA).
2. Añadir kit de inhibidores de proteasas (1µL/mL) (trabajar siempre en frío).
3. Levantar las células a las que se les haya dado el tratamiento previo correspondiente con tripsina. Centrifugar 5' a 104x10 g.
4. Retirar sobrenadante (todo) y dejar sólo el pellet (en este punto algunos protocolos recomiendan retirar casi todo el sobrenadante y con 500 µL resuspender, y centrifugar en una microcentrífuga a máxima velocidad).
5. Añadir buffer de lisis, se recomienda 20 µL por millón de células aproximadamente. Dejar en buffer de lisis 15 minutos en hielo para que se produzca la lisis completa.
6. Sonicar. Si es tubo a tubo con 5-10 segundos es suficiente. Si es en un baño-sonicador, poner al menos 1 minuto.
7. Calentar 2 min a 95° C. Poner peso sobre los tubos.
8. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad, en microcentrífuga.
9. Recoger el sobrenadante poner en tubo limpio y congelar a -80° C hasta su uso. Apartar una pequeña cantidad de volumen (5 o 10 µL) para hacer la cuantificación de proteína por el método BCA.

Gelatinización de portas

1. Lavar los portaobjetos con etanol.
2. Lavar con agua destilada.
3. Secar a 60°.
4. Preparar solución de gelatinización:
 - a. Calentar agua destilada.
 - b. Añadir 0,25% de gelatina ([Sigma-Aldrich](#)).
 - c. Añadir 0,025% de sulfato cromopotásico ([Sigma-Aldrich](#)).
5. Dejar enfriar y filtrar.
6. Sumergir los cestillos en la solución durante 20 segundos.
7. Dejar en estufa *overnight*.

Anexo II. Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

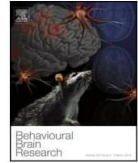
Behavioural Brain Research 271 (2014) 140–146



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr



Short Communication

Neophobia, NQO1 and SIRT1 as premorbid and prodromal indicators of AD in 3xTg-AD mice



Virginia Torres-Lista^{a,b,1}, Cristina Parrado-Fernández^{c,d,1}, Ismael Alvarez-Montón^{a,b}, Javier Frontiñán-Rubio^c, Mario Durán-Prado^{c,d}, Juan Ramón Peinado^{c,d}, Björn Johansson^e, Francisco Javier Alcaín^{c,d,*}, Lydia Giménez-Llort^{a,b,**}

^a Department of Psychiatry and Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^b Institut de Neurociència, Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^c Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine of Ciudad Real, University of Castilla La Mancha, Ciudad Real, Spain

^d Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla la Mancha, Spain

^e Department of Neuroscience, Karolinska Institutet, KS CMM L8:01, SE-171 76 Stockholm, Sweden

HIGHLIGHTS

- Latency of rearing was the first behavioral indicator of premorbid AD (Pm-AD).
- Prodromal AD was clearly defined by cognitive deficits at 6 months of age.
- High levels of cortical and hippocampal NQO1 were a redox indicator of Pm-AD.
- SOD1 was changed only in hippocampus at 4 months of age, before prodromal AD.
- SIRT1 levels had opposite regional and temporal premorbid/prodromal patterns.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 March 2014

Received in revised form 25 April 2014

Accepted 30 April 2014

Available online 13 May 2014

Keywords:

Alzheimer's disease

AD-P

AD-C

Behavior

Antioxidant enzymes

3xTg-AD mouse

ABSTRACT

Increased oxidative stress seems to be a key factor underlying natural processes of aging, but also to occur prior to neuropathological hallmarks of neurodegenerative diseases. The present work studied the temporal variation of three key antioxidant enzymes in cortex and hippocampus during the development of behavioral and cognitive symptoms in 3xTg-AD mice, and as compared to age-matched controls. At 2 months of age, when no intraneuronal A β immunoreactivity has been reported, increased neophobia shown as a delayed and reduced rearing, evidenced the onset of BPSD-like symptoms at premorbid stages of disease. In these animals, NQO1 was found increased in both the hippocampus (800%) and cortex (400%) and progressively diminished at older ages. SOD1 was increased in the hippocampus at 4 months of age, when neuronal A β accumulation has been established. These hippocampal increases of antioxidants before the prodromal emergence of cognitive symptoms support their role as defense mechanisms. SIRT1 levels showed opposite age-dependent changes in cortex (increase) and hippocampus (decrease) relative to controls. Prodromal cognitive deficits emerged at 6 months of age, concomitantly to cortical overexpression of SIRT1 but down-regulation of NQO1 and SIRT1 in the hippocampus, suggesting inadequate antioxidative protection to prevent or delay the subjacent neuronal damage. The present data further support the link between oxidative status and the anxious profile. Their crosstalk may underline AD-pathological mechanisms that may lead to deranged physiology and selective neuronal degeneration. It also points out increased neophobia and high expression of NQO1 among the first indicators of disease in the 3xTg-AD mice.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

Recently, by consensus, clinical researchers stressed the relevance of studying the long preclinical phase of Alzheimer's disease (AD-P) where pathophysiological process seems to occur almost a decade prior to clinically obvious symptoms (AD-C) [1]. In this context, biological markers (*i.e.*, specifics for AD neuropathology, non-specific markers of neuronal degeneration, markers of oxidative stress and markers of neural inflammation) [2] as well as behavioral ones [3] able to identify those asymptomatic individuals with AD pathological change are foreseen eventually guiding therapy prior to the onset of symptoms at prodromal stages [1]. An early intervention which is crucial to delay and, hopefully, prevent emergence of the clinical syndrome, and therefore, to reduce the global burden that, promoted by the aging population, is projected to happen in the coming decades [4]. In this growing concern, the present study in the 3xTg-AD mice model harboring the familial AD mutations PS1/M146V, APPSwe and tauP301L [5] was aimed at identifying early behavioral and oxidative stress indicators at ages mimicking these premorbid (Pm-AD) and prodromal (Pr-AD) stages of disease, *i.e.*, 2-, 4- and 6-months-old mice, as compared to age-matched non-transgenic (NTg) counterparts [6]. Fifty-three male mice from the Spanish colonies of homozygous 3xTg-AD and NTg mice [7] were used. Genotypes were confirmed by RT-PCR analysis. Animals were maintained under standard laboratory conditions (food and water *ad libitum*, 22 ± 2 °C, a 12 h light:dark cycle, 50–60% humidity). The study was performed in accordance with Spanish legislation on 'Protection of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes', 86/609/EEC Council on this subject.

The temporal profiles of 'Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia' (BPSD)-like behaviors, learning and memory were evaluated. Neophobia to a new home-cage was evaluated by visited corners and rearings in the 30 s corner test. Anxiety-like behaviors and exploratory activity were assessed for 5 min in the open-field test as previously described [8]. Repeated test, 24 h later, was used to evaluate memory of these experiences. Thereafter, spatial learning and memory was studied using a 'reversed' version of the '2-days water maze' [9] with two levels of difficulty: first, a cue learning of a visible platform followed, 24 h later, by a place learning using a hidden platform in a reversed position (both, four 90 s trials, every 20 min). Escape latencies and the distance covered were measured and the swimming speed calculated as previously described [8]. The distance covered searching the platform in the previous location was used to evaluate the accuracy of memory and cognition.

After completion of all behavioral tests, animals were sacrificed under anesthesia. Cerebral cortex and hippocampus were dissected and immediately stored at –80 °C for further evaluation of the levels of antioxidant enzymes, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), superoxide dismutase 1 (SOD1) and Sirtuin 1 (SIRT1) by western blot and equal amounts of protein were separated using 10% acrylamide gel, and the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoreactivity against NQO1, SIRT1, SOD1 or β -actin (Abcam, 1:1000 dilution) was followed by secondary antibodies (Dako 1:5000 dilution) and detected by Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore). The relative density of the immunoreactive bands was calculated from the optical density (OD) of the selected area using ImageJ version 1.46 software (NIH).

Pm-AD and Pr-AD behavioral markers for AD in 3xTg-AD mice at 2, 4 and 6 months of age were temporally defined by the presence of cognitive deficits at 6 months of age and are summarized in Table 1. Different sensitivity and temporal course of behavioral alterations were found. The repeated corner test pointed out the delayed onset of vertical exploratory behavior as the first behavioral indicator of increased neophobia in 3xTg-AD mice, emerging at 2 months of age. Besides, the number of rearings was reduced from 2 months of age albeit statistical significance was reached at

4 and 6 months. In contrast, horizontal activity was found unaltered until the 4 months, the age when immunoreactivity to intraneuronal A β starts to be detected [10]. The re-exposure to the short test enhanced the genotype differences in neophobia as shown by the prominent reduction of activity at 4 and 6 months, similarly to the enhancement we described at 6 months in the 2-days fear-conditioned test [11]. Therefore, the present results suggest neophobia as a good behavioral marker already at AD-P, and therefore, amyloidogenic processes in the basolateral amygdala likely to be among the disease mechanisms involved in these BPSD-like symptoms at this premorbid-like stage.

Consistently with this, in the open-field test (Table 1) the BPSD-like profile of 3xTg-AD mice emerged at 2 months of age with altered thigmotaxis (tendency to remain close the walls of open-field), concomitant reduction of horizontal and vertical activities and increased emotionality. This BPSD-like profile worsened with age and was hardly ameliorated with the repetition of the test. The factor age *per se* increased the initial freezing behavior, delayed the appearance of self-grooming behavior and reduced the levels of horizontal and vertical activity. Interestingly, the time course and the low levels of activity in 2- and 4-month-old 3xTg-AD mice closely resembled the normal low patterns occurring at older ages in the NTg mice (6 months) which are in agreement with the advanced neuroimmunobiological age we have described in 3xTg-AD mice [6]. Here, in the repeated test, the recognition of the previous experimental conditions resulted in a reduction of anxiety and the corresponding burst of initial locomotor performance, followed by low levels of exploratory activity. 3xTg-AD mice failed to show such a behavioral pattern but exhibited sustained anxiety in this second test (insets in Fig. 1). In agreement, the cognitive performances of young 3xTg-AD in the water maze were parallel to those of age-matched NTg-mice (Fig. 2) and the cognitive impairment emerged at 6 months of age. Thus, their first performance in the maze suggested some difficulties to understand the meaning/purpose of the visible platform since, and on average, they covered twice the distance of NTg mice to jump on it. Navigation speed was also significantly increased at this age. In the reversal test, the deficits were apparent as 3xTg-AD mice did not search the platform in the previous location as done by NTg mice or younger animals of the same genotype. Instead, a shorter but random navigation allowed 3xTg-AD mice to find, by chance, the reversed location.

At the neuronal level, the concurrence of BPSD-like symptoms and cognitive deficits agrees with cortical and hippocampal affection we found in the human AD brain [11]. In this regard, we described that 3xTg-AD mice at 7 months of age but not at 4 months presented increased brain cortex oxidative stress with glutathione cycle impairment (increased cortical LPO and GSSG, reduction of GPx levels) and decreased enzymatic antioxidant cytosolic CuZn-SOD and mitochondrial Mn-SOD activities with males being more prone to oxidative stress [10]. Other authors also have reported evidence of oxidative and nitrosative stress in the cerebral cortex of 3xTg-AD mice at 6–7 months of age [12–14]. In the present work we studied the regional and temporal variation of three main antioxidant enzymes: NQO1, SOD1 and SIRT1 (Fig. 3). The results provide evidence that, as compared to cerebral cortex, the hippocampus of 3xTg-AD mice was more sensitive (relative levels) and selectively prone (age) to show changes in the levels of enzymes involved in the protection against oxidative stress. Thus, NQO1, which is proposed as a redox indicator in AD [15], was found selectively increased at 2 months of age with a terrific 800%. The results also show that hippocampal SOD1, whose deficiency accelerates A β oligomerization and memory loss in Tg2576 mice [16], was selectively increased in a 300% in 4 months-old 3xTg-AD mice, when we have reported the first accumulation of intraneuronal A β oligomers [10]. Therefore, the specific hippocampal increase of SOD1 found at this age may

OPEN FIELD TEST

Statistics

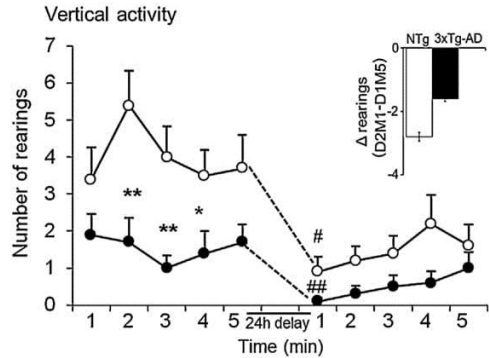
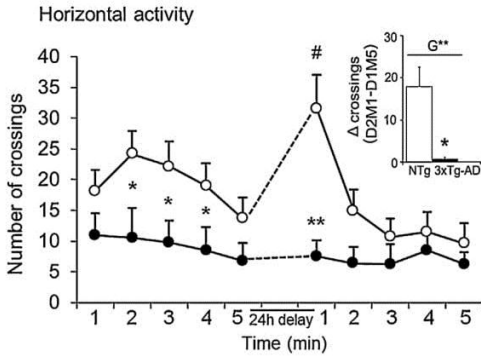
Horizontal Activity

Total= G**A* T**					Total= G**A* T***				
G*	G**	G*	G*A*	A*	G***	n.s.	n.s.	G*A*	n.s.
1min	2min	3min	4min	5min	1min	2min	3min	4min	5min
Day 1					Day 2				

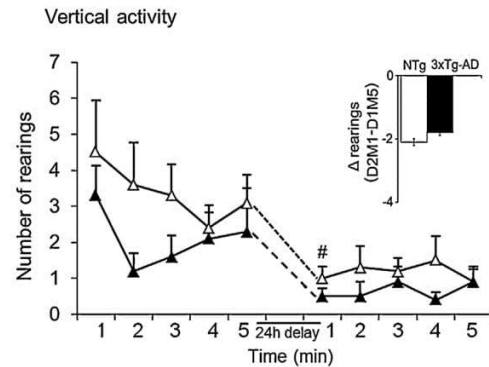
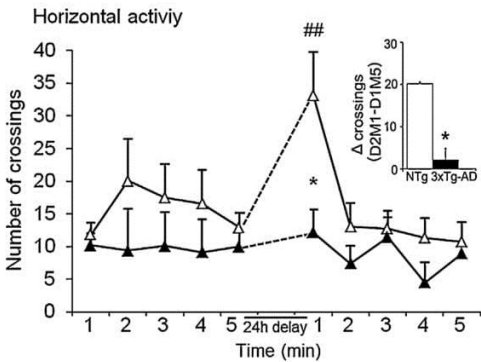
Vertical Activity

Total= G**A* T*					Total= G*				
n.s.	G**A*	G**	n.s.	A*	n.s.	n.s.	n.s.	G*A*	n.s.
1min	2min	3min	4min	5min	1min	2min	3min	4min	5min
Day 1					Day 2				

A. 2-month-old



B. 4-month-old



C. 6-month-old

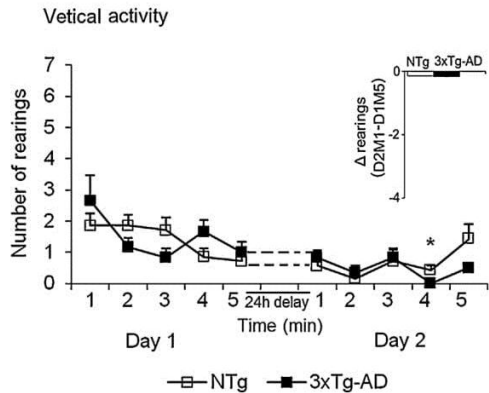
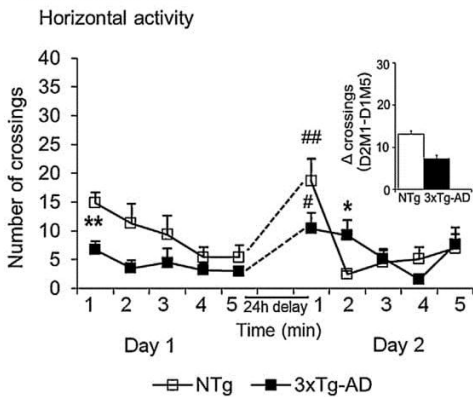


Fig. 1. Premorbid and prodromal behavioral markers for AD in 3xTg-AD mice in the time course of the open-field test. $n = 8-10$ per group. Mean \pm SEM, (A) 2-month-old mice, (B) 4-month-old mice and (C) 6-month-old mice. Insets: Δ crossings (D2M1-D1M5): difference between the crossings performed in the first minute of the test in day 2 (D2M1) and those in the last minute of day 1 (D1M5). Δ rearings (D2M1-D1M5): as in the case of crossings. Two-way ANOVA followed by *post hoc* test comparisons analyzed the effects of genotype (G), age (A) and time course (T) factors. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$. Student's *t*-test, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs. NTg mice.

Table 1
Premorbid and prodromal behavioral markers for AD in 3xTg-AD mice. *n* = 8–10 per group. Mean ± SEM.

	NTg mice			3xTg-AD mice			Statistics
	2-month-old	4-month-old	6-month-old	2-month-old	4-month-old	6-month-old	
	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 8	
Body weight (g)							
Day 1	24.3 ± 0.8 ^a	22.3 ± 0.2	27.0 ± 0.4 ^{b,c}	22.4 ± 0.9 ^a	27.6 ± 0.9 [†]	35.3 ± 0.9 ^{†,b,c}	G ^{***} A ^{***}
Day 2	23.8 ± 0.6 ^a	22.2 ± 0.3	26.9 ± 0.4 ^{b,c}	22.6 ± 0.9 ^a	27.8 ± 0.8 [†]	35.5 ± 0.9 ^{†,b,c}	G ^{***} A ^{***}
Day 4	22.8 ± 1.1	21.6 ± 0.6	26.7 ± 0.5 ^{b,c}	21.4 ± 3.5 ^a	26.9 ± 0.7 [†]	35.2 ± 1.0 ^{†,b,c}	G ^{***} A ^{***} T [*]
Day 1 – Corner test							
Latency of rearing (s)	6.5 ± 1.5	7.9 ± 2.1	11.3 ± 2.7	14.1 ± 2.8 [†]	12.1 ± 3.0	14.7 ± 2.9	G [*]
Total number of rearing	6 ± 1.1	5.5 ± 1.0	3.4 ± 0.6	4.1 ± 0.9	4.7 ± 1.1	3.5 ± 1.0	<i>n.s.</i>
Total number of corners	9.1 ± 1.2	11.3 ± 1.2	9.6 ± 0.8	8.8 ± 1.5	8.6 ± 1.4	7.3 ± 0.8	<i>n.s.</i>
Day 1 – Open field test							
<i>Latency of an event (s)</i>							
Initial movement	2.1 ± 0.4	1.5 ± 0.2	4.1 ± 1.2 ^{b,c}	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.2	3.5 ± 0.5 ^{b,c}	A ^{**}
Exit of the center	8.5 ± 2.7	7.9 ± 1.2	8.7 ± 1.8	18.3 ± 7.7	8.0 ± 1.7	15.6 ± 2.8 ^b	<i>n.s.</i>
Entrance to periphery	21.8 ± 3.2	27.6 ± 5.9	15.1 ± 2.0	41.5 ± 16.3	28.5 ± 7.6	52.3 ± 20.1 [†]	G [*]
Vertical activity	49.7 ± 27.8	32.2 ± 3.0	37.5 ± 7.5	88.5 ± 28.2	33.1 ± 14.8	71.0 ± 27.3	<i>n.s.</i>
Self-grooming	191.6 ± 24.9	164.7 ± 19.6	224.5 ± 21.2 ^{b,c}	194.7 ± 25.2	189.7 ± 23.5	253.1 ± 15.5 ^b	A [*]
<i>Time course</i>							
Crossings	See Fig. 1						T ^{**}
Rearings	See Fig. 1						T [*]
<i>Total number of an event</i>							
Crossings	97.3 ± 13.6	78.9 ± 19.0	46.2 ± 13.7	46.6 ± 15.8 [†]	48.8 ± 15.4	20.8 ± 9.0	G ^{**} A [*]
Rearings	20.0 ± 3.2	16.9 ± 4.1	7.0 ± 1.4 ^{b,c}	7.7 ± 2.2 [†]	10.5 ± 2.5	7.3 ± 1.7	G ^{**} A [*]
Self-grooming	1.9 ± 0.4	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.2	1.1 ± 1.1	0.6 ± 0.2	<i>n.s.</i>
Defecation boli	1.4 ± 0.5	1.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3	3.1 ± 0.4 [†]	2.0 ± 0.5	2.0 ± 0.5	G [*]
Urination	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	<i>n.s.</i>
Day 2 – Corner test							
Latency of rearing (s)	15.3 ± 4.0	12.3 ± 3.2	8.3 ± 2.9	11 ± 2.9 ^a	23.6 ± 2.9	16 ± 3.3 [†]	<i>n.s.</i>
Total number of rearing	2.7 ± 0.9	4.1 ± 1.0	3.1 ± 0.9	2.1 ± 0.8	0.8 ± 0.4 ^{††}	1.2 ± 0.3 ^{††}	G ^{**}
Total number of corners	4.7 ± 1.2	8 ± 1.6	8.1 ± 0.9 ^c	5.2 ± 1.4	3.1 ± 0.7 ^{**}	4.3 ± 0.8 ^{**}	G ^{**}
Day 2 – Open field test							
<i>Latency of an event (s)</i>							
Initial movement	8.9 ± 7.6	4.0 ± 1.6	4.1 ± 2.1	3.1 ± 0.8	2.9 ± 0.9	6.0 ± 1.9	<i>n.s.</i>
Exit of the center	29.7 ± 27.8	7.3 ± 2.4	7.2 ± 3.4	7.0 ± 1.9	6.4 ± 2.1	8.0 ± 2.5	<i>n.s.</i>
Entrance to periphery	32.4 ± 29.7	43.5 ± 23.2	35.0 ± 23.8	39.3 ± 22.8	57.2 ± 35.0	28.5 ± 13.1	<i>n.s.</i>
Vertical activity	105.1 ± 30.3	88.8 ± 30.2	116.7 ± 35.2	192.3 ± 31.7	131.0 ± 36.1	114.6 ± 42.2	<i>n.s.</i>
Self-grooming	157.2 ± 26.7	206.0 ± 31.7	187.7 ± 32.7	235.1 ± 24.2 ^a	144.1 ± 30.0	218.8 ± 20.8	<i>n.s.</i>
<i>Time course</i>							
Crossings	See Fig. 1						T ^{***}
Rearings	See Fig. 1						<i>n.s.</i>
<i>Total number of an event</i>							
Crossings	78.4 ± 10.9	80.9 ± 14.1	37.7 ± 5.8 ^{b,c}	35.0 ± 6.6 [†]	44.3 ± 11.6	33.8 ± 8.3	G ^{**} A [*]
Rearings	7.3 ± 2.1	5.9 ± 1.3	3.2 ± 7.4	2.5 ± 0.6 [†]	3.2 ± 1.2	2.5 ± 0.8	G [*]
Self-grooming	1.7 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.9 ± 0.7	1.0 ± 0.3	<i>n.s.</i>
Defecation boli	1.5 ± 0.4	2.2 ± 0.4	1.2 ± 0.1	3.4 ± 0.4 ^{†,a}	1.5 ± 0.5	2.3 ± 0.5	G [*]
Urination	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1 ^a	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.2 ^b	<i>n.s.</i>
Days 3 and 4 – 2-days water maze							
<i>Latency (s)</i>							
CUE (day 1)	41.6 ± 5.8 ^a	19.2 ± 2.8	34.6 ± 4.4 ^{b,c}	34.0 ± 5.9	29.8 ± 3.2 [†]	29.5 ± 5.9	A [*]
PT (day 2)	40.1 ± 7.5 ^a	17.0 ± 2.3	44.0 ± 6.4 ^b	34.0 ± 5.9	19.4 ± 3.8 ^a	18.5 ± 3.2 ^c	<i>n.s.</i>
<i>Distance covered (cm)</i>	See Fig. 2						<i>n.s.</i>
<i>Mean speed (cm/s)</i>	See Fig. 2						A [*]

Two-way ANOVA followed by *post hoc* test comparisons analyzed the effects of genotype (G), age (A) factors and when appropriate also the time course (T) as a within subjects factor, ****P* < 0.001, ***P* < 0.01 and **P* < 0.05. Student's *t*-test was used to compare two independent groups, ***P* < 0.01 and **P* < 0.05 vs. NTg mice, ^a*P* < 0.05, 2-month-old vs. 4-month-old; ^b*P* < 0.05, 6-month-old vs. 4-month-old; ^c*P* < 0.05, 6-month-old vs. 2-month-old.

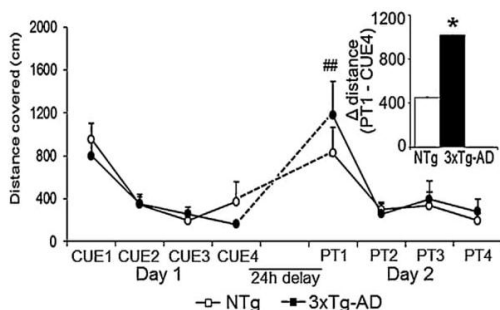
play a protective role to counteract the emerging amyloid pathology. Regarding SIRT1, a consistent progressive reduction with age was observed, which indicates that the hippocampal downregulation we recently found at 7 months of age [17] is already established at 4 months.

In the cortex, the temporal patterns of the enzymatic activities were convergent or divergent with those found in the hippocampus. An increase of the expression levels of NQO1 was found at 2 months of age mirroring that in the hippocampus, but only of a 400%. In contrast, the temporal pattern of SIRT1 expression was

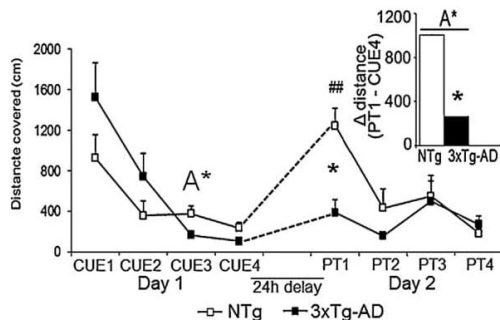
opposed to the progressive loss shown in the hippocampus, suggesting a compensatory role. Thus, at 2 months of age, there was a significantly decrease to half relative to the NTg mice levels but progressively increased to reach statistical significance at 6 months of age. Interestingly, neuronal SIRT1 activation has been reported to protect against neurodegeneration in Tg2576 mice [18,19] and to suppress Aβ production [20]. Therefore, the increase could represent a protective strategy in a stage of the disease when Aβ production is started. In fact, SIRT1 expression levels are found also increased when 3xTg-AD from our colony are benefited by

2-DAY WATER MAZE

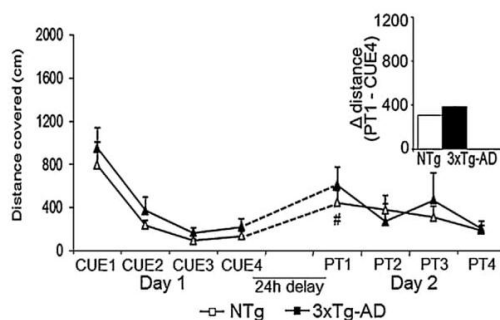
A. Distance covered, 2-month-old



C. Distance covered, 6-month-old



B. Distance covered, 4-month-old



D. Mean speed, 2-4 and 6-month-old

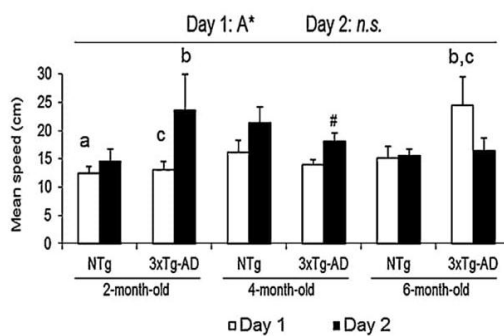


Fig. 2. Premorbid and prodromal behavioral markers of AD in 3xTg-AD in the reversed 2-days water maze. $n = 8-10$ per group. Mean \pm SEM. Distances covered by (A) 2-month-old mice, (B) 4-month-old mice, (C) 6-month-old mice, and (D) Mean navigation speed of 2, 4 and 6 month-old animals in the first and second day of the maze. Insets: Δ distance (PT1-CUE4): difference between the distance covered in the first trial of the place task (PT1) and that in the last trial of the cue task (CUE4). Two-way ANOVA followed by *post hoc* test comparisons analyzed the effects of genotype (G), age (A) factors. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$. Student's *t*-test was used to compare two independent groups ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ vs. NTg mice, * $P < 0.05$, 2-month-old vs. 4-month-old; ^b $P < 0.05$, 6-month-old vs. 4-month-old; ^c $P < 0.05$, 6-month-old vs. 2-month-old.

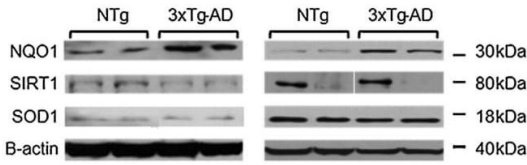
physical exercise, as a means of counteracting AD-related dysfunctions [17]. In other colonies of 3xTg-AD mice, SIRT1 did not differ at 12, 16 and 20 months of age [18]. Regional differences of free radical defense enzymes have been also reported in Tg2576 at 3 months of age [19], as well as in human brain during aging [21] suggesting regional metabolic differences. As we previously reported [8], no changes were found for SOD1 levels at any age studied, suggesting that cortical SOD1 may not be involved in the early development of the neuropathological and the behavioral profile in 3xTg-AD mice.

The results point out the relevant temporal and regional expression levels of antioxidant enzymes in parallel to the behavioral patterns exhibited, revealing insights into mechanisms at pre-clinical and prodromal stages of disease. The most surprising result was the increase of NQO1 in both the cortex and hippocampus, already at 2 months of age. NQO1 is one of the most consistently and robustly inducible genes among the members of the family of cytoprotective proteins against oxidative stress [22]. NQO1 catalyzes the reduction of quinoid compounds utilizing NADH or NADPH as co-factor, and we have shown that is involved in α -tocopherol regeneration [23] whose low levels exacerbate the phenotype of AD in Tg2576 mice [24]. Furthermore, NQO1 directly scavenges superoxide [25] facilitating the protection against the disease progression. In the brain of AD patients, NQO1 immunostaining closely correlated with the extent of local AD pathology across the various

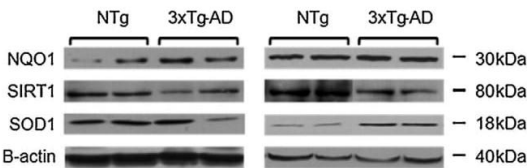
brain regions examined, suggesting that increased NQO1 activity may be neuroprotective [15]. On the other hand, 50% of the AD patients showed the NQO1 C609T polymorphism which made the brain to be functionally deficient in this enzyme [26]. Furthermore, NQO1 is regulated by the nuclear transcription factor Nrf2 [22] with Nrf2-ARE pathway being considered a valuable therapeutic target for AD and other neurodegenerative diseases [24]. In APP/PS1 mice, NQO1 in cortex was slightly higher than controls at 3 months of age, but declined at 6 months, similarly to the present results. The over-expression of Nrf2 was neuroprotective against A β peptide, and this effect was only associated to high level expression of NQO1 among all Nrf2-ARE dependent genes [27]. Therefore, the age-decline of the NQO1 expression we have found at the time of A β immunoreactivity could provide inadequate antioxidative protection for the prevention or delay of the neuronal death.

In conclusion, we defined the ages for Pm-AD and Pr-AD in the 3xTg-AD mice and the immediate copying with stress strategies as premorbid BPSD-like symptoms at 2 months of age, when no apparent amyloid neuropathological correlates have been yet established. The latency of rearing was the earliest behavioral indicator of premorbid AD, followed by an anxious profile characterized by time delay and reduced number of exploratory behaviors. Consistent cortical and hippocampal premorbid induction of NQO1

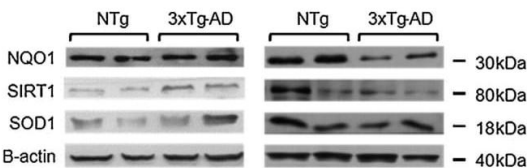
A. 2 month-old



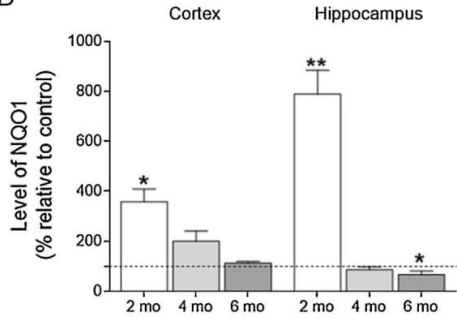
B. 4 month-old



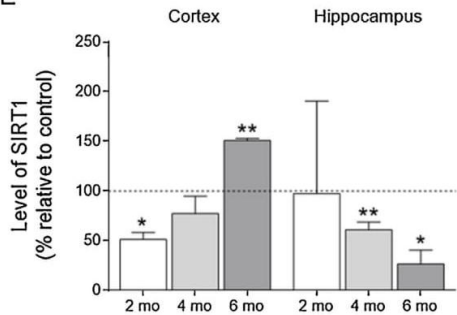
C. 6 month-old



D



E



F

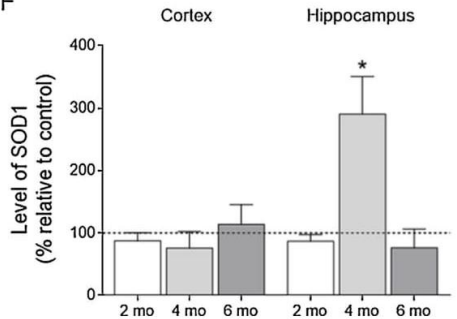


Fig. 3. NQO1, SIRT1 and SOD1 expression levels in 3xTg-AD and NTg mice. Levels of 3xTg-AD are expressed as a percentage compared to age-matched NTg mice. Representative western blotting and densitometric analysis of the proteins were quantified in arbitrary units in the cortex and hippocampus at preprodromal and prodromal stages of AD. *n* = 4 per group. Mean \pm SEM. Actin was used as the internal control. Student *t*-test. ***P* < 0.01 and **P* < 0.05 vs. NTg mice.

levels could confer a defense mechanism aimed to delay the AD-like pathology. The prodromal cognitive deficits emerging at 6 months of age, concomitantly to cortical increased level of SIRT1 but down-regulation of NQO1 and SIRT1 in the hippocampus, suggest inadequate antioxidative protection to prevent or delay the subjacent neuronal damage. The data support a causal relationship between oxidative and emotional stress in AD. These indicators may be among those useful tools for evaluating preprodromal and prodromal stages of AD in relation to preventive and/or therapeutic strategies. They may also have a role in the evaluation of the potential risk factors for the disease.

Acknowledgments

We thank Prof. Frank M. LaFerla, Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders, University of California Irvine,

CA, USA for kindly providing the progenitors of the Spanish colonies. Financial support: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), PI10-00283 to L.G.-L., Universidad de Castilla-La Mancha grant GE20112221 to F.J.A. The authors declare no competing or financial interest.

References

- [1] Sperling RA, Karlawish J, Johnson KA. Preclinical Alzheimer disease – the challenges ahead. *Nat Rev Neurol* 2013;9(January):54–8. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.241>.
- [2] Bailey P. Biological markers of Alzheimer's disease. *Can J Neurol Sci* 2007;34(Suppl. 1):S72–6.
- [3] Lladó A, Sánchez-Valle R. Focusing on atypical symptoms for improved diagnosis of early-onset Alzheimer's disease. *Future Neurol* 2011;6:575–8.
- [4] Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 2007;3:186–91.

- [5] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular AB and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003;39:409–21.
- [6] Giménez-Llort L, Torres-Lista V, De la Fuente M. Crosstalk between the nervous and the immune system during the prodromal stages of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2014. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612820666140130205500>, in press and Epub ahead of print.
- [7] Giménez-Llort L, Blázquez G, Cañete T, Rosa R, Vivo M, Oddo S, et al. Modeling neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease dementia in 3xTg-AD mice. In: Iqbal K, Winblad B, Avila J, editors. *Alzheimer's disease: new advances*. Englewood, NJ, USA: Medimond; 2006. p. 513–6.
- [8] Giménez-Llort L, García Y, Buccieri K, Revilla S, Sunol C, Cristófol R, et al. Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *Int J Alzheimers Dis* 2010;128354.
- [9] Gulinello M, Gertner M, Mendoza G, Schoenfeld BP, Oddo S, LaFerla FM, et al. Validation of a 2-day water maze protocol in mice. *Behav Brain Res* 2009;196:220–7.
- [10] García-Mesa Y, Lopez-Ramos JC, Gimenez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, et al. Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis* 2011;24(3):421–54.
- [11] España J, Giménez-Llort L, Valero J, Miñano A, Rábano A, Rodríguez-Álvarez J, et al. Intraneuronal b-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in Alzheimer's disease transgenic mice. *Biol Psychiatry* 2010;67:513–21.
- [12] Giuliani D, Ottani A, Zaffe D, Galantucci M, Strinati F, Lodi R, et al. Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 2013;104:82–91.
- [13] Giuliani D, Bitto A, Galantucci M, Zaffe D, Ottani A, Irrera N, et al. Melanocortins protect against progression of Alzheimer's disease in triple-transgenic mice by targeting multiple pathophysiological pathways. *Neurobiol Aging* 2014;35:537–47.
- [14] Resende R, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Free Rad Biol Med* 2008;44:2051–7.
- [15] SantaCruz KS, Yazlovitskaya E, Collins J, Johnson J, DeCarli C. Regional NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004;25:63–9.
- [16] Murakami K, Murata N, Noda Y, Tahara S, Kaneko T, Kinoshita N, et al. SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid β protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2011;286:44557–68.
- [17] Revilla S, Suñol C, García-Mesa Y, Giménez-Llort L, Sanfeliu C, Cristófol R. Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology* 2014;81:55–63.
- [18] Julien C, Tremblay C, Émond V, Lebbadi M, Salem M, Bennett DA, et al. SIRT1 decrease parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:48–58.
- [19] Cimini A, Moreno S, D'Amelio M, Cristiano L, D'Angelo B, Falone S, et al. Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes. *J Alzheimers Dis* 2009;18:935–52.
- [20] Marques SCF, Lemos R, Ferreiro E, Martins EM, De Medoça A, Santana I, et al. Epigenetic regulation of BACE 1 in Alzheimer's disease patients and in transgenic mice. *Neuroscience* 2012;220:256–66.
- [21] Venkateshappa C, Harish G, Mahadevan A, Srinivas Bharath MM, Shankar SK. Elevated oxidative stress and decreased antioxidant function in the human hippocampus and frontal cortex with increasing age: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2012;37:1601–14.
- [22] Alcain FJ, Villalba JM. NQO1 antitumor directed drugs. *Expert Opin Ther Patents* 2007;17:1–17.
- [23] Bello RI, Kagan VE, Tyurin V, Navarro F, Alcain FJ, Villalba JM. Regeneration of lipophilic antioxidants by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Protoplasma* 2003;221:129–35.
- [24] Nishida Y, Yokota T, Takahashi T, Uchihara T, Jishage K-i, Mizusawa H. Deletion of vitamin E enhances phenotype of Alzheimer disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:530–6.
- [25] Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 2004;65:1238–47.
- [26] Tsvetkov P, Adamovich Y, Elliott E, Shaul Y. E3 ligase STUB1/CHIP regulates NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) accumulation in aged brain, a process impaired in certain Alzheimer disease patients. *J Biol Chem* 2011;286:8839–45.
- [27] Kanninen K, Malm TM, Jyrkkänen H-K, Goldsteins G, Keksa-Goldsteine V, Tanila H, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid. *Mol Cel Neurosci* 2008;39:302–13.



Versión on-line del artículo

Coenzyme Q₁₀ Protects Human Endothelial Cells from β -Amyloid Uptake and Oxidative Stress-Induced Injury

Mario Durán-Prado^{1,2*}, Javier Frontiñán^{1,2}, Raquel Santiago-Mora¹, Juan Ramón Peinado^{1,2}, Cristina Parrado-Fernández^{1,2}, María Victoria Gómez-Almagro^{3,4}, María Moreno³, José Alberto López-Domínguez⁵, José Manuel Villalba⁵, Francisco J. Alcaín^{1,2*}

1 Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain, **2** Oxidative Stress and Neurodegeneration Group, Regional Centre for Biomedical Research, Ciudad Real, Spain, **3** Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemical Sciences and Technologies and Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain, **4** Fundación Parque Científico y Tecnológico de Albacete, Albacete, Spain, **5** Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Agrifood Campus of International Excellence ceiA3, Córdoba, Spain

Abstract

Neuropathological symptoms of Alzheimer's disease appear in advanced stages, once neuronal damage arises. Nevertheless, recent studies demonstrate that in early asymptomatic stages, β -amyloid peptide damages the cerebral microvasculature through mechanisms that involve an increase in reactive oxygen species and calcium, which induces necrosis and apoptosis of endothelial cells, leading to cerebrovascular dysfunction. The goal of our work is to study the potential preventive effect of the lipophilic antioxidant coenzyme Q (CoQ) against β -amyloid-induced damage on human endothelial cells. We analyzed the protective effect of CoQ against A β -induced injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) using fluorescence and confocal microscopy, biochemical techniques and RMN-based metabolomics. Our results show that CoQ pretreatment of HUVECs delayed A β incorporation into the plasma membrane and mitochondria. Moreover, CoQ reduced the influx of extracellular Ca²⁺, and Ca²⁺ release from mitochondria due to opening the mitochondrial transition pore after β -amyloid administration, in addition to decreasing O₂⁻ and H₂O₂ levels. Pretreatment with CoQ also prevented β -amyloid-induced HUVECs necrosis and apoptosis, restored their ability to proliferate, migrate and form tube-like structures *in vitro*, which is mirrored by a restoration of the cell metabolic profile to control levels. CoQ protected endothelial cells from A β -induced injury at physiological concentrations in human plasma after oral CoQ supplementation and thus could be a promising molecule to protect endothelial cells against amyloid angiopathy.

Citation: Durán-Prado M, Frontiñán J, Santiago-Mora R, Peinado JR, Parrado-Fernández C, et al. (2014) Coenzyme Q₁₀ Protects Human Endothelial Cells from β -Amyloid Uptake and Oxidative Stress-Induced Injury. PLoS ONE 9(10): e109223. doi:10.1371/journal.pone.0109223

Editor: Srinivasa M. Srinivasula, IISER-TVM, India

Received: March 19, 2014; **Accepted:** August 31, 2014; **Published:** October 1, 2014

Copyright: © 2014 Durán-Prado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: The authors' work is supported by Grants: Universidad de Castilla-La Mancha GE20112221. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mario.duran@uclm.es (MDP); franciscoj.alcain@uclm.es (FJA)

Introduction

Alzheimer disease (AD) is a chronic neurodegenerative pathology characterized by the proteolytic processing of the amyloid precursor protein to form amyloid peptide (A β), which aggregates into extracellular amyloid plaques to cause neurotoxicity and the progressive cognitive decline typical of the disease in a process known as the "amyloid cascade" [1]. However, evidence indicates that circulating soluble A β exerts biological effects in AD patients prior to neuronal injury, much earlier than the onset of cognitive deficits. Indeed, soluble circulating A β damages endothelial cells in asymptomatic Alzheimer's stages preceding A β deposition [2]. In this sense, circulating A β affects the blood brain barrier to compromise its permeability and integrity [3] while also impairing blood supply by damaging small blood vessels, weakening oxygen exchange and nutrient delivery [4].

The concept of endothelial injury preceding neuronal damage is reinforced, first, by the fact that endothelial cells are the first line of contact with circulating A β , second, by the observation that oxidative stress in cerebral blood vessels occurs when there is no

evidence of A β deposition in cerebral parenchyma and blood vessels, and third, by the observation that endothelial cells are more sensitive to A β and its active fragment A β _{25–35} than neurons or smooth muscle cells [2,5–7]. Indeed, both A β and A β _{25–35}, exert a prominent pro-apoptotic and necrotic effect on endothelial cells by mechanisms that involve an increase in free cytosolic calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and reactive oxygen species such as O₂⁻ and H₂O₂ [5,8–11]. Although the exact mechanism of A β -mediated [Ca²⁺]_i entry into endothelial cells is not completely understood, there is evidence in neurons pointing to the formation of pores that cause instability at the plasma membrane and produce ion leakiness, thus mediating a robust calcium influx into the cell [12–14]. Furthermore, A β increases the level of free oxygen radicals that react with nitric oxide (NO) and produces oxidative/nitrosative stress that alters vascular function [15]. Increased O₂⁻ and H₂O₂ produced by dismutation of these radicals also induces the opening of the permeability transition pore (mPTP), a mitochondrial membrane channel involved in cell death, thus damaging mitochondria and inducing necrosis and apoptosis [16–18]. This damage is further reinforced by trafficking

and accumulation of the A β peptide into mitochondrial cristae [19].

Recently, a meta-analysis of randomized controlled trials in cardiovascular diseases, which are risk factors for AD in the elderly [20], provided evidence for effective treatment with the lipophilic antioxidant coenzyme Q₁₀ (CoQ) to improve endothelial cell function [21–23]. Moreover, CoQ also prevented oxidative stress and calcium-mediated necrosis and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) exposed to damaging and pro-oxidizing stimuli such as high glucose concentration, oxidized LDL or angiotensin II [24–27]. Finally, it is known that a ubiquinone binding site regulates the aperture of the mPTP [28] and that CoQ is effective at inhibiting mPTP opening triggered by H₂O₂ in epithelial cells [29].

Based upon these observations, here we explored the role of CoQ against A β injury in endothelial cells using microscopy, biochemistry and metabolomic approaches. Our results show that pretreatment of endothelial cells with physiological concentrations of CoQ delays A β incorporation into the plasma membrane and its trafficking to mitochondria, reduces ROS production and calcium influx while increasing NO levels. Moreover, CoQ treatment impedes mPTP opening and reduces necrosis and apoptosis, while also restoring cell migration, wound healing and cell tube formation to control conditions. CoQ blocks A β -induced changes in the endothelial metabolic profile. In sum, CoQ could be a promising molecule to treat endothelial dysfunction associated with early, asymptomatic AD stages in high-risk populations.

Results

CoQ prevents β -amyloid-induced endothelial cell death and restores migration and angiogenesis *in vitro*

It was previously reported that cellular exposure to the amyloid fragment A β _{25–35} results in endothelial cell toxicity similar to β _{1–42}, via inducing cell apoptosis and necrosis [5]. In our experiments we explored the effect of the A β _{25–35} fragment on cell death and the possible cytoprotective role of CoQ. The addition of 5 μ M A β _{25–35} to HUVECs for 24 h increased the percentage of apoptotic nuclei from 0.5% to 2.6% (Figure 1A) and the percentage of Annexin V positive cells from 2.7% to 4.2%, (Figure 1B), indicating a modest but significant increase in apoptosis. A 12 h preincubation with CoQ resulted in a dose-dependent decrease of apoptotic nuclei, reaching control levels at 5 μ M CoQ (Figure 1A), which was confirmed by flow cytometry determination of Annexin V (Figure 1B). The action of CoQ was cytoprotective, as cells needed to be pre-treated with the lipophilic antioxidant prior to A β _{25–35} addition for an observable effect. Simultaneous treatment with 5 μ M A β _{25–35} and CoQ did not affect the percentage of apoptotic cells (Figure S1A). On the other hand, treatment with 5 μ M A β _{25–35} produced an 18% decrease of HUVECs viability, which was mirrored by a similar increase in necrosis (Figure 1C). Preincubation with CoQ restored cell viability to control levels and prevented A β _{25–35} induced necrosis at all doses of CoQ tested (Figure 1C). We assayed the putative A β activation of neutral sphingomyelinase (nSMase), as previously described in neurons [30]. CoQ is also a potent antioxidant in plasma membrane [31] and we had previously demonstrated that higher CoQ levels in liver plasma membrane enhanced antioxidant protection by a mechanism involving the inhibition of nSMase [32]. However, A β did not activate nSMase in HUVECs (Figure S2).

A β damages small blood vessels and impairs the blood supply in early Alzheimer's stages [4], while also increasing the permeability

of the blood brain barrier [3] which reinforces the concept of an early endothelial degeneration in asymptomatic stages. There is also evidence suggesting that A β inhibits neovascularization *in vitro* [33,34]. Thus, we tested the effect of CoQ on A β impaired angiogenesis *in vitro*, and also assaying effects on cell migration, a key step in vessel formation. Addition of A β resulted in a strong decrease in HUVECs migration, evaluated by a standard wound healing assay (Figure 2A), and similar results were obtained by quantifying lamellipodia positive (migrating) cells (Figure 2B). Pretreatment with CoQ completely abrogated the inhibitory effect of A β on HUVECs migration at all doses tested (Figures 2A,B). Similarly, A β produced a 60% reduction in the ability of HUVECs to form capillary-like cell tubes, and this effect was prevented by pretreatment with CoQ in a dose-dependent manner, (Figure 2C).

CoQ prevents β -amyloid-dependent increase of O₂⁻, H₂O₂ and Ca²⁺ in endothelial cells

The deleterious effect of A β in endothelial cells is due to an excess of O₂⁻ and H₂O₂ and altered calcium homeostasis [1,5,35,36]. Thus, our results demonstrated that administration of 5 μ M A β _{25–35} to HUVECs increased O₂⁻ (3-fold) and H₂O₂ (2-fold) levels *vs.* the untreated controls (Figure 3A,B). CoQ alone did not affect the basal levels of reactive oxygen species or free cytosolic Ca²⁺. However, preincubation with CoQ abated A β _{25–35}-dependent increase of O₂⁻ at all doses tested, reaching control levels at 5–7.5 μ M CoQ (Figure 3A). Similarly, A β failed to increase H₂O₂ levels in HUVECs preincubated with 5 μ M CoQ (Figure 3B). In parallel, we tested the effect of CoQ pretreatment on A β -induced changes of Ca²⁺ homeostasis in HUVECs. Administration of 5 μ M A β _{25–35} for 3 h produced a 75% increase of Ca²⁺ levels compared with basal conditions. Preincubation with CoQ reduced A β -dependent Ca²⁺ increase at all tested doses (Figure 4A). Simultaneous treatment with 5 μ M A β _{25–35} and CoQ resulted in a similar Ca²⁺ increase than that induced by A β alone (Figure S1B), indicating that CoQ needs to be previously incorporated into the cell to impede A β action.

CoQ prevents β -amyloid-induced entry of extracellular Ca²⁺ in endothelial cells

Though A β -mediated Ca²⁺ increase is well documented [5,12], there is little study of the kinetics of this secondary messenger dynamics. To this end, we tested the effect of A β in control and CoQ pretreated cells using a real time approach. This technique revealed that the addition of 5 μ M A β _{25–35} to control HUVECs induced a rapid Ca²⁺ increase from the extracellular media, reaching a maximum (150% above baseline) at 5 min from peptide administration (Figure 4B left, blue line). This Ca²⁺ increase was abolished by incubating the cells in Ca²⁺ free media (Figure 4B left, red line). Of note, extracellular Ca²⁺ entry induced by A β _{25–35} action was completely prevented in cells preincubated with 5 μ M CoQ, as Ca²⁺ levels remained unaltered, with or without extracellular calcium (Figure 4B, right).

β -amyloid cytotoxic effects are not prevented by the antioxidants tempol and α -tocopherol

In order to test if the protective effects of CoQ were imparted by its antioxidant properties, we studied the action of the antioxidants tempol and α -tocopherol on cell death, Ca²⁺ and O₂⁻ levels. Preincubation with 1 mM tempol or 100 μ M α -tocopherol did not inhibit apoptosis triggered by 5 μ M A β _{25–35} (Figure 5A), whereas only tempol was able to inhibit necrosis without reaching control levels (Figure 5B). Preincubation with any of the compounds was

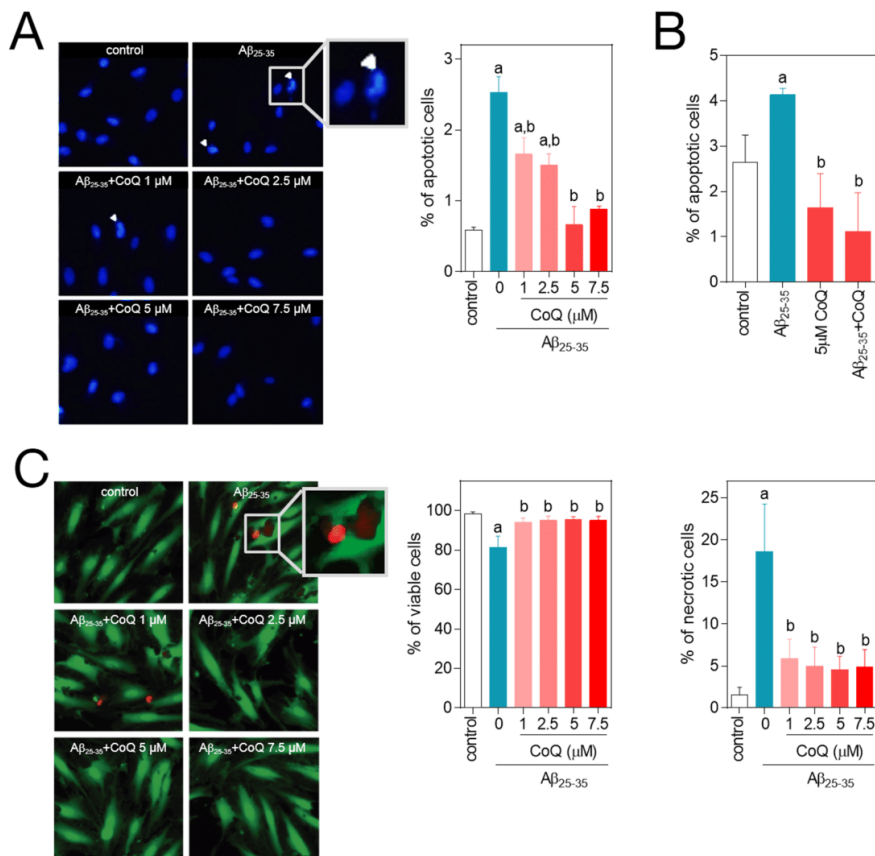


Figure 1. CoQ protects endothelial cells from β-amyloid-induced apoptosis and necrosis. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle alone or with increasing CoQ concentrations (1 to 7.5 μM) and then treated for additional 24 h with 5 μM Aβ₂₅₋₃₅. **A)** Apoptosis was determined by DAPI staining and morphological analysis of nuclei. White arrows indicate typical apoptotic nuclei. Results are expressed as the percentage of apoptotic vs. total nuclei (300 cells/treatment, n = 3). **B)** Apoptosis was also evaluated by flow cytometry. Results are expressed as percentage of cells positive for Annexin V vs. total (n = 3). **Viability and necrosis (C, left and right, respectively)** were determined by cell co-staining with calcein-AM (green) and ethidium bromide (orange) and evaluated by qualitative fluorescence microscopy. Results are expressed as percentage of viable/necrotic cells vs. total (n = 3). a, p < 0.05 vs. control; b, p < 0.05 vs. Aβ₂₅₋₃₅. doi:10.1371/journal.pone.0109223.g001

unable to restore Ca²⁺ and O₂⁻, obtaining only partial but not significant reductions in the case of tempol (Figure 5C, D).

CoQ impedes NO decrease by β-amyloid in endothelial cells

NO is dampened under oxidative stress conditions, due to its reaction with O₂⁻, resulting in the formation of peroxynitrite, and a subsequent increase in oxidative and nitrosative stress that alters endothelial cells function [35]. Our results, obtained with the Griess method, showed that a 24 h treatment of HUVECs with 5 μM Aβ₂₅₋₃₅ decreased the production of NO by 40%. Pretreatment with 5 μM CoQ avoided this inhibitory effect of Aβ on NO production (Figure 6), which compares with the reduction in O₂⁻ and H₂O₂ by CoQ pretreatment, as shown above.

CoQ prevents β-amyloid opening of the mPTP in endothelial cells

Aβ-mediated rise in O₂⁻, H₂O₂ and Ca²⁺ is linked to the opening of the mitochondrial permeability transition pore, which releases mitochondrial content into the cytosol, including the cytochrome c from the inter-membrane space, and initiates cell death. As CoQ inhibits mPTP opening in neurons [16,17], we speculated a similar mechanism could operate in endothelial cells injured by Aβ. We evaluated the mPTP by different strategies. We tested the effect of 5 μM Aβ₂₅₋₃₅ on MitoTracker fluorescence and the level of mitochondrial Ca²⁺ in HUVECs. MitoTracker staining revealed a 25% reduction in the signal after 24 h treatment with 5 μM Aβ₂₅₋₃₅ peptide (Figure 7A, Figure S3), which indicates a change in mitochondrial membrane potential, as MitoTracker intensity depends on mitochondrial membrane polarization. The 3 h treatment with 5 μM Aβ₂₅₋₃₅ peptide was accompanied by a significant decrease in mitochondrial Ca²⁺ (Figure 7B,C, Figure S3), which supports an alteration in

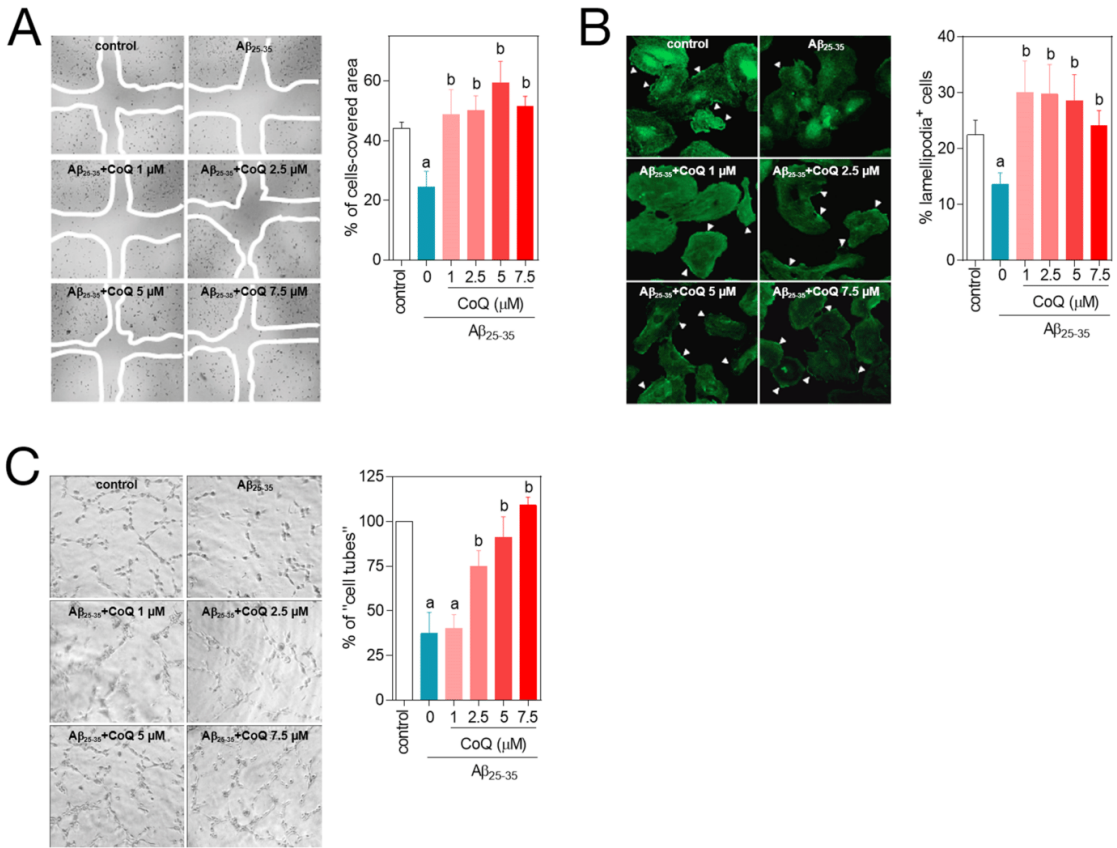


Figure 2. CoQ hinders β -amyloid inhibition of endothelial cells migration and tubes formation. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or increasing CoQ concentrations (1 to 7.5 μ M) and treated for additional 24 h with 5 μ M $A\beta_{25-35}$. **A**) Cell migration was evaluated with the wound healing assay. Results show the percentage of wound recovered after 12 h for the indicated treatments ($n=3$). **B**) Migrating cells were identified with fluorescence microscopy by immunostaining of lamellipodia structures with an anti-actin antibody. Results are expressed as percentage of lamellipodia⁺ cells (white arrows) cells vs. total ($n=3$). **C**) Angiogenesis *in vitro* was determined by “cell tube” formation assays in Matrigel-coated wells. Results show the percentage of cell tubes vs. control after 6 h incubation with the indicated treatments ($n=3$). a, $p<0.05$ vs. control; b, $p<0.05$ vs. $A\beta_{25-35}$. doi:10.1371/journal.pone.0109223.g002

mitochondrial permeability. Both MitoTracker intensity signal and mitochondrial Ca^{2+} levels remained unaltered in HUVECs pretreated with 5 μ M CoQ (Figure 7A,B,C, Figure S3). Furthermore, mPTP opening is reinforced by the release of cytochrome *c* to the cytosol. Addition of 5 μ M $A\beta_{25-35}$ to control HUVECs resulted into a strong release of cytochrome *c*, reaching a 2-fold increase in the cytosolic/mitochondrial ratio *vs.* untreated cells (Figure 7D; Figure S4). Cytochrome *c* release was completely abolished in HUVECs preloaded with 5 μ M CoQ (Figure 7D, Figure S4).

CoQ reduces β -amyloid entry and accumulation into endothelial cell mitochondria

We next tested the effect of CoQ on the incorporation of fluorescent $A\beta_{25-35}$ peptides into HUVECs and its trafficking and accumulation into mitochondria, using fluorescence and confocal microscopy in living cells. Our results showed that fluorescent $A\beta_{25-35}$ signal surpassed the control cells threshold 15 m after

peptide administration, reaching a plateau at 40 min (Figure 8, blue line). Preincubation of HUVECs with 5 μ M CoQ resulted in a 10 m delay in the incorporation, accompanied by a 60% reduction in the maximum signal as compared with control cells (Figure 8, red line). These epifluorescence results were reproduced by confocal microscopy, which showed a 45% reduction in the level of fluorescent $A\beta_{25-35}$ accumulation in whole CoQ pretreated HUVECs 40 m after peptide administration (Figure 9, upper graph). Co-staining with MitoTracker revealed that this difference was not due to an inhibition of $A\beta$ entry into the cytosol (Figure 9, middle graph), but to its accumulation into the mitochondria (Figure 9, bottom graph). Nevertheless, cytosolic $A\beta$ fluorescence was reduced in CoQ treated cells up to 20 m after $A\beta$ addition, whereas differences to control cells lacked statistical significance after 40 min (Figure 9, middle graph). On the other hand, fluorescent $A\beta$ was significantly decreased in the mitochondrial compartment at only 5 m after $A\beta$ addition to CoQ pretreated cells, and this difference increased 3-fold at longer incubation times (Figure 9, bottom graph). Confocal microscopy images

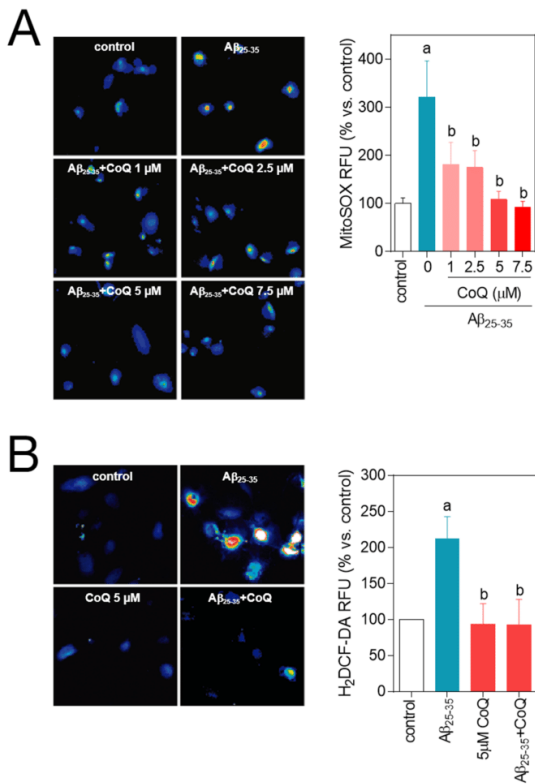


Figure 3. CoQ prevents β -amyloid-mediated increase in O_2^- and H_2O_2 levels in endothelial cells. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or increasing CoQ concentrations (1 to 7.5 μ M) and treated for additional 24 h with 5 μ M $A\beta_{25-35}$. **A)** O_2^- levels were determined by fluorescence microscopy using the probe MitoSOX-AM. **B)** H_2O_2 level was determined by fluorescence microscopy with the probe $H_2DCF-DA$. Results show the percentage of variation of fluorescence vs. control cells (n=4). a, $p < 0.05$ vs. control; b, $p < 0.05$ vs. $A\beta_{25-35}$. doi:10.1371/journal.pone.0109223.g003

depicted in Figure 9 are representative cells incubated for 40 min with fluorescent $A\beta$. Taken together, these results demonstrate that CoQ delays and reduces the entry of $A\beta$ into HUVECs and also significantly dampens trafficking and incorporation into the mitochondria.

CoQ restores the metabolic profile altered by β -amyloid in endothelial cells

Recent studies using murine models of Alzheimer's disease revealed a profound alteration in brain metabolite profiles, which occurs prior to the deposition of $A\beta$ plaques and the appearance of early behavioral changes [37]. Indeed, these changes reflect an increased mitochondrial stress and are related to alterations in Krebs cycle, energy transfer, carbohydrate, neurotransmitter, and amino acid metabolic pathways [37]. On this rationale and based on our previous results (see above), we questioned, first, if $A\beta$ exerts a similar action in endothelial cells and, second, if CoQ could restore those possible $A\beta$ -induced changes to control levels. Using a RMN-based metabolomic approach, we identified 13 metabolites (Figure 10A). Enrichment analysis revealed the

alteration of several pathways including those related to protein biosynthesis, biotin metabolism and catecholamine biosynthesis, among others (Figure 10B). Indeed, addition of 5 μ M $A\beta_{25-35}$ to HUVECs for 24 h resulted in an increase in adenine, tyrosine, L-lactate, creatine and choline levels in 1.3, 1.4, 1.6, 1.4 and 1.75 fold of control, respectively (Figure 10A). Preincubation with 5 μ M CoQ abolished the effect of $A\beta$, lowering metabolite levels to control levels, with the exception of adenine (Figure 10A).

Discussion

Vascular degeneration is initiated by soluble $A\beta$ in early, asymptomatic, Alzheimer's disease stages [2]. The deleterious effect of soluble $A\beta$ in endothelial cells involves its incorporation into the membranes, uptake and trafficking to the mitochondria. This process results in an excess of superoxide free radicals and H_2O_2 plus the deregulation of calcium homeostasis, inducing cell death by apoptosis and necrosis. This damage impairs endothelial cell migration, thus creating gaps that compromise microvessel function [1,35,36]. In this study, we show that the lipophilic antioxidant CoQ emerges as an attractive candidate to prevent the deleterious effects of $A\beta$ on endothelial cells in early Alzheimer's disease stages, which could significantly delay the progression of the pathology. Importantly, we found that CoQ effects are cytoprotective and should be administered before endothelial damage is irreversible.

CoQ cytoprotection involves the blockade of $A\beta$ action at several steps, some of them shared by other antioxidant molecules, but others unique or not described to date. Indeed, previous investigations demonstrated that free radical scavengers prevented, at least in part, $A\beta$ -induced toxicity [2]. Similarly, we have found that the antioxidants tempol and α -tocopherol at high doses only partially reversed $A\beta$ -induced apoptosis and necrosis (Figure 5). On the other hand, CoQ cytoprotective effects are robust and maximal at 5 μ M, a concentration which lies within a range reached *in vivo* after oral supplementation [38].

Our results show, for the first time, that CoQ reduces and delays $A\beta$ incorporation and accumulation into the cell, which is paralleled by a reduction in the influx of extracellular Ca^{2+} . It is known that soluble $A\beta$ incorporates into the plasma membrane forming channels that produce ion leakiness, thus mediating Ca^{2+} entry into the cytosol [12–14,39]. It is noteworthy that the protective effect of CoQ is not mediated by a simple chemical interaction with $A\beta$, because the simultaneous addition of CoQ and $A\beta$ did not result in protection of HUVECs from $A\beta$ toxicity. Rather, HUVECs should be preincubated with CoQ for this protective effect to be observed. Treatment of HUVEC with CoQ (1–10 μ M) for 12 h increased its intracellular levels in a concentration-dependent manner [27]. Exogenous CoQ is initially accumulated in the endo-lysosomal compartment, and then rapidly becomes incorporated mainly to mitochondria-associated membranes and mitochondria, whereas its distribution among endomembranes and the plasma membrane is a late event, requiring 12 hours [40]. In addition, a functional intracellular vesicular trafficking is needed for CoQ to reach various cellular compartments [40]. This suggest that its inhibitory effect on $A\beta$ uptake in endothelial cells does not involve the impairment of endocytic mechanisms. Moreover, the 25–35 fragment and the $A\beta$ are highly hydrophobic peptides which are inserted into the membrane hydrocarbon core, and their incorporation depends on the lipid composition of the bilayer [39,41]. CoQ is incorporated into all cell membranes [40] and disposes the long isoprenoid tail in the hydrophobic midplane of the lipid bilayer in such a way that phospholipid polar heads are in tight contact with the last

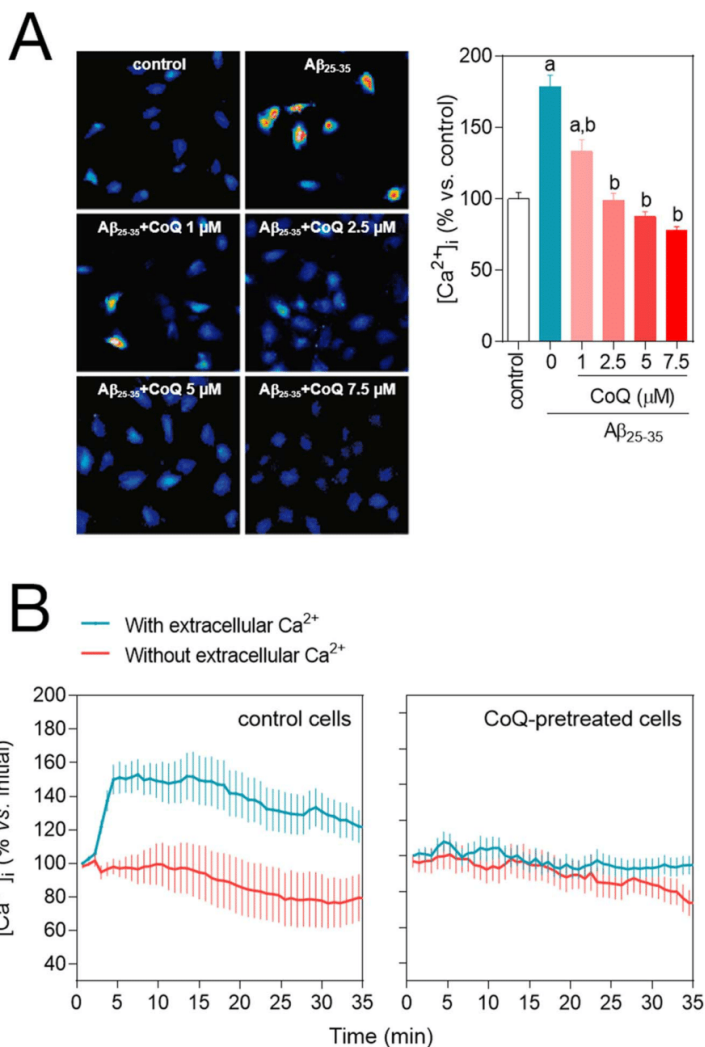


Figure 4. CoQ blocks β -amyloid-induced raise in the free cytosolic Ca^{2+} level in endothelial cells. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or CoQ (1 to 7.5 μM) and treated with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$. Ca^{2+} levels were determined by fluorescence microscopy with the probe Fluo-4-AM. **A)** Ca^{2+} was quantified after 3 h treatment with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ in cells preincubated with CoQ. Results show the percentage of variation of fluorescence vs. control cells (n=4). a, $p < 0.05$ vs. control; b, $p < 0.05$ vs. $\text{A}\beta_{25-35}$. **B)** Changes in Ca^{2+} were monitored by time-lapse microscopy every 30 sec in cells pretreated with PBS (left graph) or 5 μM CoQ (right graph) in the presence (black line) or absence (grey line) of extracellular Ca^{2+} . $\text{A}\beta_{25-35}$ was added in min 1. Results show the averaged percentage of fluorescence variation vs. baseline before $\text{A}\beta_{25-35}$ addition (n=3). doi:10.1371/journal.pone.0109223.g004

isoprenoid unit of the CoQ hydrophobic tail [42]. Based on this, we hypothesize that CoQ could block, via steric hindrance, $\text{A}\beta$ incorporation into the plasma membrane and Ca^{2+} entry, acting as a “cellular armor” and reducing the formation of channels.

The inhibition of the extracellular calcium influx by the addition of verapamil or pimeozide (two calcium channels blockers) to endothelial cell culture medium only partially prevented the $\text{A}\beta$ toxicity [5], indicating that $\text{A}\beta$ also can release calcium from intracellular stores to increase the cytosolic calcium level. Mitochondria are major intracellular calcium stores and we demonstrated here that $\text{A}\beta$ is quickly driven to mitochondria in

HUVECs, deregulating calcium homeostasis. Preincubation of HUVECs with CoQ reduced $\text{A}\beta$ uptake and mainly the $\text{A}\beta$ accumulation into mitochondrion, which is paralleled by a blockade of the intracellular calcium influx induced by $\text{A}\beta$ and the reestablishment of the mitochondrial calcium to control levels, which was otherwise significantly decreased under $\text{A}\beta$ insult.

It has been demonstrated, both *in vitro* and *in vivo*, that $\text{A}\beta$ is localized to the mitochondrial cristae of neurons [19] and that the sole mitochondria-specific $\text{A}\beta$ accumulation is sufficient to cause ROS elevation and mitochondrial dysfunction, leading to mPTP opening and cytochrome *c* release, and causing cellular toxicity

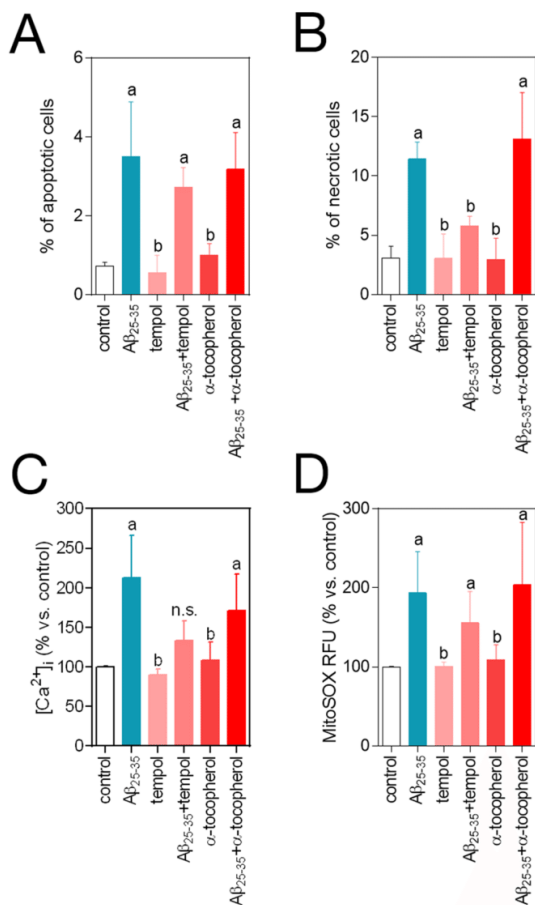


Figure 5. Effects of tempol and α -tocopherol on β -amyloid-induced apoptosis, necrosis, free cytosolic Ca^{2+} and O_2^- . HUVECs were incubated for 12 h with vehicle, 1 mM tempol or 100 μM α -tocopherol, and then treated for additional 3–24 h with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$. **A)** Apoptosis was determined by DAPI staining and morphological analysis of nuclei. Results are expressed as the percentage of apoptotic vs. total nuclei (300 cells/treatment, $n=3$). **B)** Necrosis was determined by staining with ethidium bromide and evaluated by qualitative fluorescence microscopy. Results are expressed as percentage of necrotic vs. total cells ($n=3$). a, $p<0.05$ vs. control; b, $p<0.05$ vs. $\text{A}\beta_{25-35}$. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle, 1 mM tempol or 100 μM α -tocopherol and treated for additional 3 h with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$. **C)** Ca^{2+} levels were determined by fluorescence microscopy with the probe Fluo-4-AM. **D)** O_2^- levels were determined by fluorescence microscopy using the probe MitoSOX-AM. Results show the percentage of variation of fluorescence vs. control cells ($n=3$). a, $p<0.05$ vs. control; b, $p<0.05$ vs. $\text{A}\beta_{25-35}$. doi:10.1371/journal.pone.0109223.g005

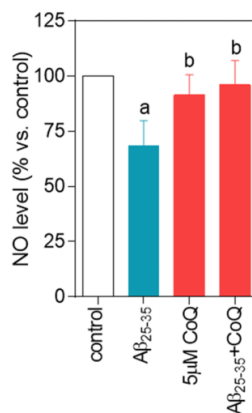


Figure 6. Nitric oxide decrease is prevented by CoQ treatment. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or 5 μM CoQ and treated for additional 24 h with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$. NO was determined in the supernatant by the Griess method. Results are expressed as percentage of NO vs. control ($n=4$). a, $p<0.05$ vs. control; b, $p<0.05$ vs. $\text{A}\beta_{25-35}$. doi:10.1371/journal.pone.0109223.g006

chrome *c* release, which was accompanied by a reduction in O_2^- and H_2O_2 levels. Furthermore, O_2^- and H_2O_2 reduction resulted in an increase of NO levels. As previously described in neurons, $\text{A}\beta$ trafficking to the mitochondria increases ROS levels, which react with NO to produce peroxynitrite, inactivating MnSOD by nitration and generating additional free radicals that over-damage mitochondria [35,43]. Furthermore, CoQ located in extramitochondrial membranes, such as in the Golgi compartment, may be an important cofactor to maintain eNOS in a coupled conformation required to produce physiological NO and, eventually, quench leaking-uncoupled electrons [44].

Metabolomics data reinforce the CoQ improvement of $\text{A}\beta$ -impaired mitochondrial function. Indeed, $\text{A}\beta$ treatment resulted in an increase of creatine levels (Figure 10), which, as reported previously, could be due to an inhibition of creatine kinase by oxidative stress-mediated carbonylation, thus disturbing mitochondrial bioenergetics [45]. $\text{A}\beta$ also increased L-lactate level (Figure 10), which indicates a shift to fermentative metabolism, reinforcing $\text{A}\beta$ -induced mitochondrial damage [37]. Our results show that pretreatment of endothelial cells with CoQ restored both creatine and L-lactate to control levels, indicating a normalization of mitochondrial function.

$\text{A}\beta$ -increased ROS and Ca^{2+} levels in endothelial cells are translated into increased necrosis and apoptosis. Thus, we found an increased level of choline in $\text{A}\beta$ -treated cells which, as indicated previously for retina pericytes, could be consequence of a high phosphatidylcholine hydrolysis due to the pro-oxidant effect of $\text{A}\beta$ peptide that drives to necrotic cell death [46]. Pretreatment with CoQ restored choline to control levels, and also inhibited endothelial necrosis and apoptosis. In an *in vivo* setting, endothelial cell death in microvessels increases permeability and compromises oxygen delivery and nutrient exchange. Moreover, our results show that $\text{A}\beta$ also interfered with the ability of endothelial cells to promote wound repair, as manifested by decreased motility and impaired tube-like structure formation. These processes are implicated in the disturbance of the endothelial integrity because, endothelial cells extruded lamellipodia to move and rapidly close the wound during repair processes [47]. $\text{A}\beta_{25-35}$ addition to HUVECs resulted in a marked decrease

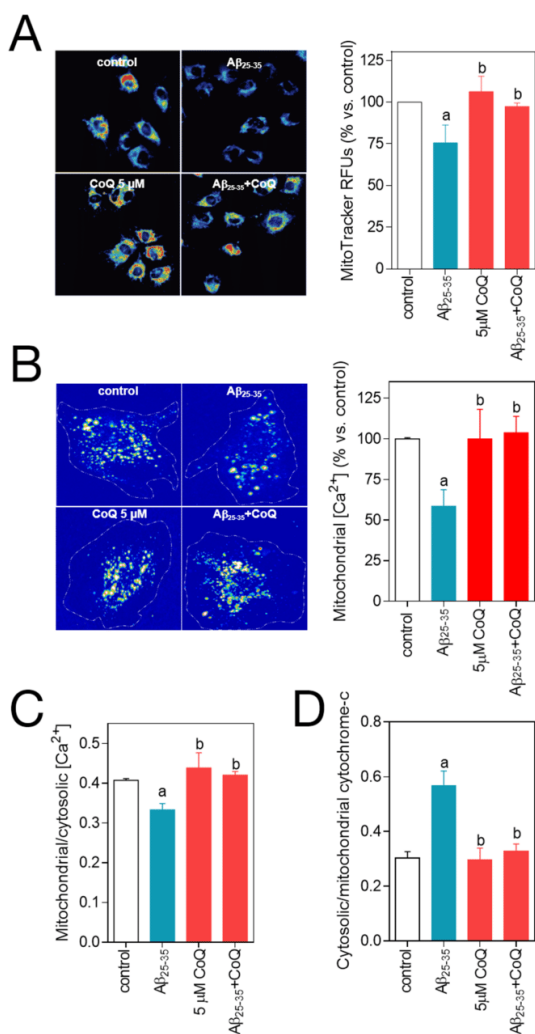


Figure 7. CoQ impedes β -amyloid-induced mPTP opening. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or 5 μ M CoQ and treated for additional 3–24 h with 5 μ M A β_{25-35} . The effect of the treatments on mPTP opening was quantified indirectly by measuring MitoTracker Deep Red fluorescence, mitochondrial Ca²⁺ and cytochrome c release. After treatment with 5 μ M A β_{25-35} , mitochondria were loaded with MitoTracker Deep Red **A**), Calcein-AM and CoCl₂ **B**) and MitoTracker Deep Red plus Fluo-4 **C**). Fluorescence intensity for each probe was determined by fluorescence microscope in living cells (n=3/4). Mitochondrial Ca²⁺ levels were calculated by quenching the cytosolic Calcein-AM signal with CoCl₂ **B**) and by colocalization of Fluo-4 and MitoTracker and further image processing with ImageJ **C**). Cells were loaded with MitoTracker Deep Red and immunostained with an anti-cytochrome c **D**). The amount of cytochrome c in cytosol was calculated by colocalization and image processing with ImageJ (n=3). Results show the percentage of relative fluorescence units (RFUs) vs. control cells or the ratio between cytosolic/mitochondrial Fluo-4-AM or cytochrome c RFUs level. *a*, *p*<0.05 vs. control; *b*, *p*<0.05 vs. A β_{25-35} . doi:10.1371/journal.pone.0109223.g007

in lamellipodia extrusion and a significant delay in wound closure, but preincubation with CoQ reversed the inhibition of the cellular motility. These findings suggest that CoQ can protect microvasculature against the A β_{25-35} -induced endothelial cell death, but can also improve the restoration of the endothelial function by re-endothelization in pathological conditions associated to AD, reducing blood draining and improving oxygenation and nutrients delivery, thus, impacting on neuronal function.

Although AD is, by definition, a non-vascular dementia, vascular comorbidity may be present in the 30-60% of AD patients [20], making compounds that halt vascular oxidative stress putative candidates for therapeutic interventions. Augmented levels of ROS are common factors in all major vascular diseases [48]. Oral CoQ supplementation has been used recently in clinical trials to improve the endothelial function in type II diabetes and cardiovascular diseases [21,22,49,50], and a meta-analysis of the randomized controlled trials concluded that CoQ supplementation is associated with significant improvement in endothelial function [22]. It has been proposed a plasma threshold of 2.5 μ M, above which positive effects can be observed [51]. Reported plasma CoQ in healthy people ranged from 0.40 to 1.91 μ M, but after daily oral supplementation with 200–300 mg of CoQ, plasma CoQ concentration increase up to 3–5 μ M [38], the same CoQ concentration range used in our experiments. These data suggest that CoQ supplementation could be useful in therapy to protect endothelial cells *in vivo* against A β injury.

In conclusion, our results reported herein provide the first *in vitro* evidence that CoQ inhibits the uptake and mitochondrial trafficking of A β peptide in human endothelial cells, also alleviating A β -induced oxidative injury, cell death and decreased motility. CoQ emerges as an attractive molecule to prevent AD-associated endothelial dysfunction in high risk populations during early asymptomatic stages of the disease.

Materials and Methods

Reagents

Coenzyme Q10 was generously provided by Kaneka Corporation. Human A β_{25-35} and tempol were purchased from Tocris. Human A β_{25-35} labelled with HiLyte Fluor 488 was obtained from Anaspec. The fluorescent probes, Fluo-4 AM, H₂DCF-DA, MitoSOX-AM, MitoTracker Deep Red, Calcein-AM and Hoechst were obtained from LifeSciences. Alpha tocopherol was acquired from Sigma-Aldrich.

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Clonetics, Lonza) were maintained in complete EGM-2 medium (Clonetics, Lonza) containing 20% FBS and 1% antibiotic/antimycotic, at 37°C and 5% CO₂. Experiments were performed in DMEM containing 20% FBS. All cells used in this study were up to the 15th passage.

Determination of apoptosis, necrosis and viability

Cells were seeded in 96 well plates and incubated for 12 h with vehicle (controls), CoQ ranging from 1 to 7.5 μ M, 1 μ M tempol or 100 μ M α -tocopherol. The medium was removed and A β_{25-35} was added to 5 μ M. Where indicated, CoQ and A β_{25-35} were added simultaneously to the cultures. After 24 h, cells were incubated with 10 μ g/ml EtBr and 1 μ M Calcein-AM. Viable (green) and necrotic cells (red) were determined by fluorescence microscopy with a Nikon TiU microscope (Nikon, Tokyo, Japan) using a 20 \times objective. Immediately after image acquisition, cells were fixed and permeabilized for 2 min in ice-cold methanol and

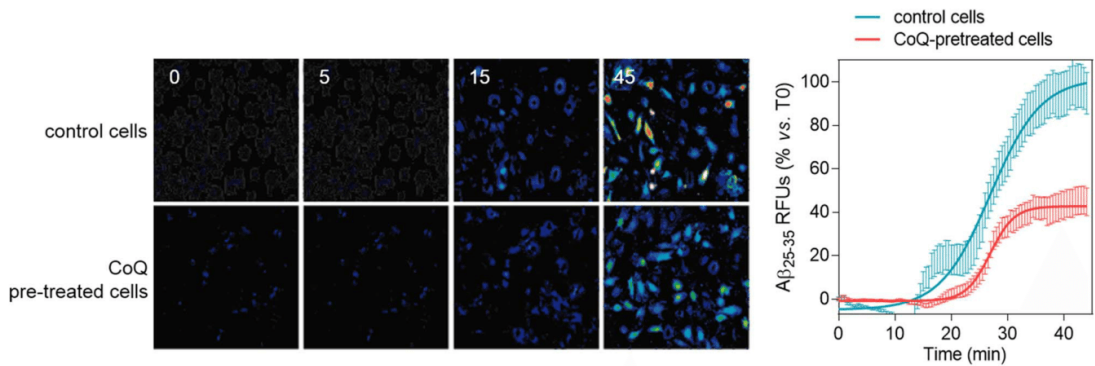


Figure 8. CoQ delays and decreases β -amyloid incorporation into endothelial cells. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or 5 μ M CoQ. Changes in HiLyte Fluor-labeled $A\beta_{25-35}$ were monitored by time-lapse microscopy every 30 sec in cells pretreated with PBS or 5 μ M CoQ. Fluorescent peptide (5 μ M) was added in min 1. Pictures show the variation of fluorescence at different time points, from 0 to 45 min. Graph shows fluorescence dynamics, expressed as normalized relative fluorescence units (RFUs), (n = 3). doi:10.1371/journal.pone.0109223.g008

stained with 1 μ g/ml Hoescht. Apoptotic nuclei were determined according morphological criteria. For necrosis, viability and apoptosis, results are expressed as percentage *vs.* total (n = 4). Additionally, apoptosis was determined by cell flow cytometry. To this end, cells were plated onto 6-well plates and treated as described above. Then, cells were labeled with an anti-annexin V antibody (Bender MedSystems) and apoptotic cells were quantified with a cell flow cytometer FACSCalibur (BD Biosciences) following the manufacturer's instructions. Results are shown as percentage of apoptotic cells *vs.* total (n = 4).

Assays for migration and cell tube formation

HUVECs were plated in 12-well plates, cultured to confluence and then serum starved for 12 h in medium containing vehicle (control) or 5 μ M CoQ. A cross-scratch was done in the monolayer with a 10 μ l pipet tip and the medium was replaced by a fresh medium containing 5 μ M $A\beta_{25-35}$. Percentage of wound closure was calculated by measuring on each image, with ImageJ, the open area free of cells immediately after doing the scratch and at 24 h. Results shown are average of n = 3.

To analyze cytoskeleton reorganization, cells were treated as indicated above and then fixed for 5 min in cold methanol, incubated for 30 min in blocking buffer, stained with the monoclonal antibody for β -actin (Sigma) and detected with an AlexaFluor488-conjugated anti-mouse antibody (Life Sciences). Images were obtained using a Nikon TiU microscope (20 \times objective). To quantify the effects of the treatments on actin reorganization and thus, on cell mobility, cells with a static and a migratory (lamellipodia positive) phenotype were counted in a double blind procedure. At least 200 cells in 4 independent experiments were counted for each group, and cells with migratory phenotype were considered positive. Results are expressed as percentage of positive cells normalized *vs.* control.

For *in vitro* angiogenesis, HUVECs incubated for 12 h with vehicle (control) or CoQ in 24 well plates were detached and plated onto GFR Matrigel-precoated 96-well plates, adding 5 μ M $A\beta_{25-35}$ to the culture medium. Cells were incubated for 6 h and then, the number of cell-tubes was counted from phase-contrast microscopy images. Results were calculated as percentage of cell-tubes *vs.* control (with neither CoQ nor $A\beta$, n = 4).

Determination of $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and Ca^{2+} in single cells

Mitochondrial $O_2^{\cdot-}$, total H_2O_2 and free cytosolic Ca^{2+} levels were determined with the fluorescent probes MitoSox, H_2DCFDA and Fluo-4 (Life Sciences), respectively. Cells were seeded in 96 well plates and incubated for 12 h with vehicle (controls) or CoQ ranging from 1–7.5 μ M, 1 mM tempol or 100 μ M α -tocopherol. Medium was removed and cells were incubated for 3 h in fresh medium containing 5 μ M $A\beta_{25-35}$ peptide. Cells were then loaded for 30 min with 1 μ M of the fluorescent probe (one independent probe per assay), washed in fresh medium and imaged in a Nikon TiU microscope (20 \times objective). Images were analyzed and processed with ImageJ. Results show the percentage of cell signal *vs.* control (n = 4).

The effect of CoQ on $A\beta_{25-35}$ -induced Ca^{2+} level was determined using a real time epifluorescence approach. Cells were grown onto 35 mm plates and treated for 12 h with vehicle (control) or 5 μ M CoQ. Then, cells were loaded for 30 min with 1 μ M Fluo-4 and media was replaced by Hank's balanced solution with/without Ca^{2+} , to assess whether $A\beta_{25-35}$ effect was due to Ca^{2+} entry or release from intracellular stores. Cells were imaged in a Nikon TiU microscope (20 \times objective). The baseline was established within the first minute of recording and after that, 5 μ M $A\beta_{25-35}$ was added to the plate. Epifluorescence images were recorded every 15 s up to 35 min. Series were analyzed with ImageJ. Results show the percent of averaged profiles *vs.* baseline, for each treatment (n = 3).

NO determination

NO level was assessed by the quantification of nitrite accumulation in the culture medium. Cells were seeded in 12 well plates and incubated for 12 h with vehicle (control) or 5 μ M CoQ. Total nitrite accumulated was measured using the modified Griess reagent, according the indications of the manufacturer (Sigma-Aldrich). Results were evaluated by spectrophotometry (BioRad iMark) at 540 nm and expressed as percentage *vs.* control (n = 4).

Mitochondrial Ca^{2+} and cytochrome c levels

Mitochondrial Ca^{2+} was determined by staining the cells with Calcein-AM and quenching the cytosolic Calcein signal with $CoCl_2$. To this end, cells were seeded in 8 well μ -slides (Ibidi) and

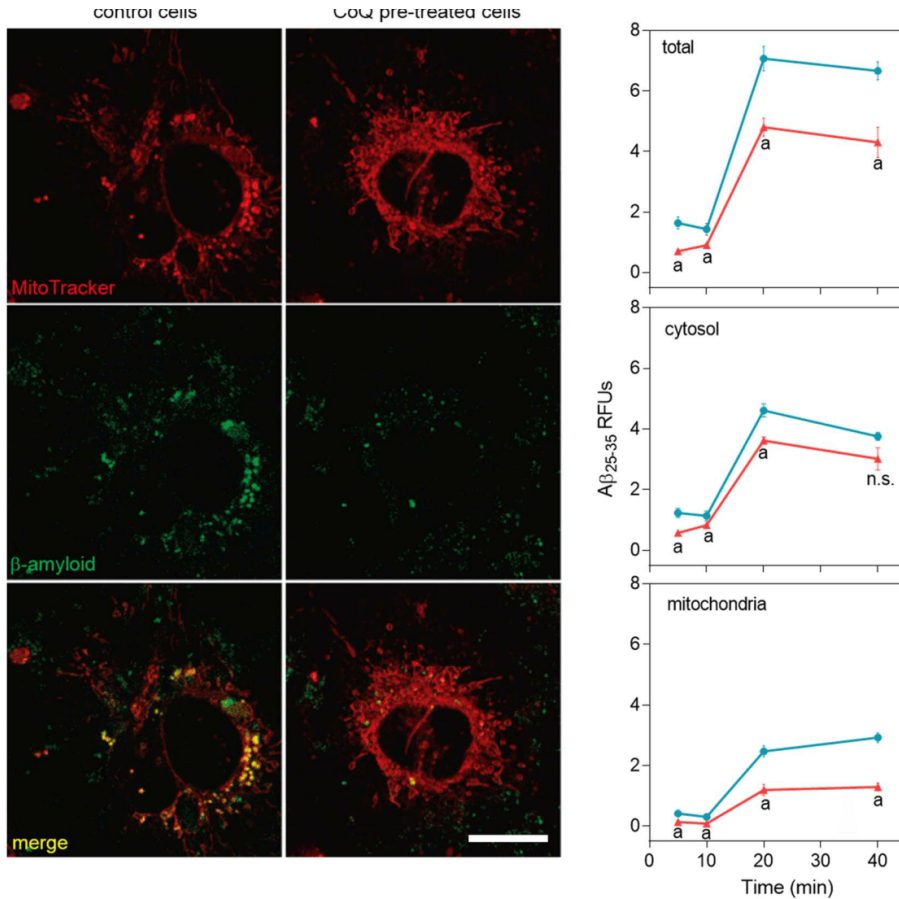


Figure 9. CoQ lessens β -amyloid incorporation into endothelial cells mitochondria. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or 5 μ M CoQ, loaded with Mitotracker Deep Red, and then treated with 5 μ M HiLyte Fluor-labeled A β_{25-35} for 0, 10, 20 and 40 min. Pictures were immediately acquired by confocal microscopy in living cells and show the staining with Mitotracker Deep Red, HiLyte Fluor-labeled A β_{25-35} (green) and merges, in control (left) and CoQ incubated cells (right) at 40 min from A β_{25-35} addition. Colocalization and image processing were performed with ImageJ. Graphs show HiLyte Fluor-labeled A β_{25-35} relative fluorescence units (RFUs) vs. time in the whole cell (total; upper graph), cytosol (middle graph) and mitochondria (bottom graph) in control (black line) and CoQ incubated cells (grey line). n = 3; a, p < 0.005 vs. A β_{25-35} . doi:10.1371/journal.pone.0109223.g009

incubated for 12 h with vehicle (control) or 5 μ M CoQ. The medium was removed and cells were incubated for 3 h in fresh medium containing 5 μ M A β_{25-35} peptide. Then, cells were loaded for 30 min with 1 μ M Calcein-AM and 1 mM CoCl₂, washed in fresh medium and imaged in a Nikon TiU microscope (60x objective). Results, calculated with ImageJ, are expressed as the percentage of mitochondrial Calcein signal vs. control (n = 3). Alternatively, mitochondrial Ca²⁺ was evaluated by co-staining cells with Fluo-4 and the fluorescent mitochondrial probe Mitotracker DeepRed (Life Sciences), which signal is sensitive to mitochondrial potential changes. To this end, cells were seeded in 96 well plates and incubated for 12 h with vehicle (control) or 5 μ M CoQ. The medium was removed and cells were incubated for 3 h in fresh medium containing 5 μ M A β_{25-35} peptide. Then, cells were loaded for 30 min with Fluo-4 and Mitotracker DeepRed (1 μ M each), washed in fresh medium and imaged in a Nikon TiU microscope (20 \times objective). Mitotracker DeepRed

signal was directly quantified with ImageJ. Results show the percentage of cell signal vs. control (n = 4). The amount of mitochondrial Ca²⁺ was calculated by image analysis, subtracting the Fluo-4 signal colocalizing with Mitotracker to the whole cell Fluo-4 signal. This processing was done with ImageJ. Results are expressed as the ratio between mitochondrial and total Ca²⁺ for each treatment (n = 4).

Cytochrome *c* subcellular localization was assessed by labeling mitochondria with Mitotracker DeepRed and immunolabeling cytochrome *c* with a specific monoclonal antibody (BD Biosciences). Briefly, cells seeded in 96 well plates were incubated for 12 h with vehicle (control) or 5 μ M CoQ. Medium was removed and cells were incubated for 24 h in fresh medium containing 5 μ M A β_{25-35} peptide. Then, cells were loaded for 30 min with 1 μ M Mitotracker DeepRed, fixed for 2 min in cold methanol, and stained for 30 min with fluorescein labeled anti-cytochrome *c* antibody (1:200). Cells were washed and immediately imaged in a

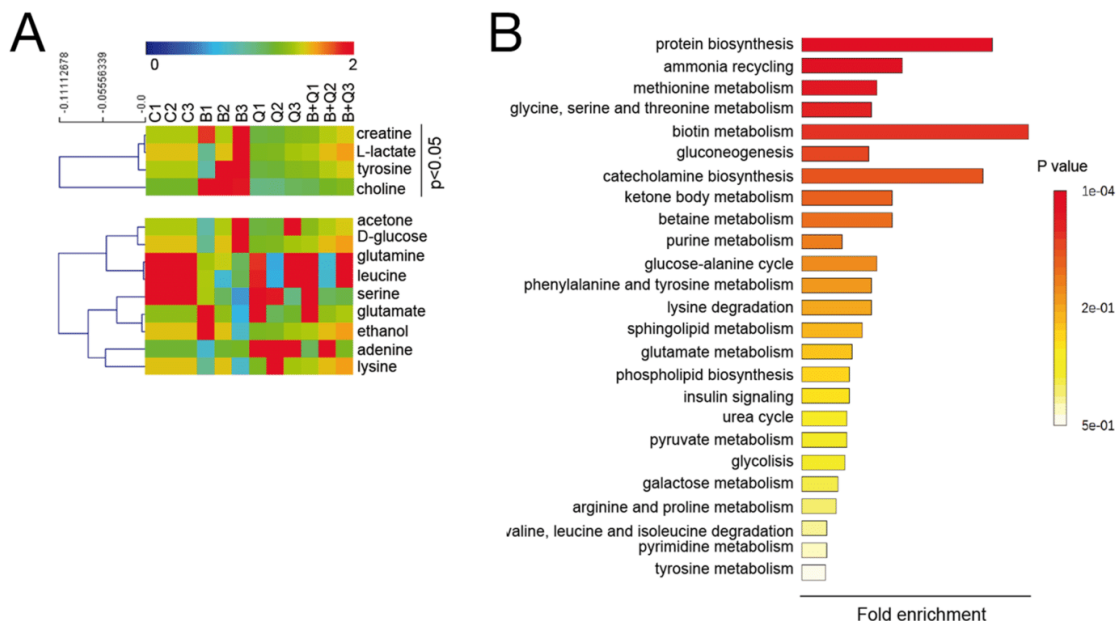


Figure 10. CoQ prevents metabolic changes induced by β -amyloid in endothelial cells. HUVECs were incubated for 12 h with vehicle or 5 μ M CoQ and treated with 5 μ M $A\beta_{25-35}$. Samples were sonicated, lyophilized and dissolved in 40 μ l D_2O . 1H NMR spectra were registered with a Nanoprobe at 400 MHz resonance frequency. Metabolites were identified with Chenomx Profiler and by means of 2D homo- and heteronuclear NMR experiments. Differential analysis and classification was performed with MEV4 and pathways enrichment with MetaboAnalist. **A**) Heatmap and clustering of metabolites identified in HUVECs (n = 3). p < 0.05 where indicated. **B**) Pathways enrichment based on the identified metabolites. Results show the averaged fold change vs. vehicle-treated cells (n = 3). a, p < 0.05 vs. control; b, p < 0.05 vs. $A\beta_{25-35}$. doi:10.1371/journal.pone.0109223.g010

Nikon TiU microscope (20 \times objective). The amount of mitochondrial cytochrome *c* was calculated by image analysis, subtracting the whole cell cytochrome *c* signal to the cytochrome *c* signal colocalizing with Mitotracker. Image processing was performed with ImageJ. Results are expressed as the ratio between cytosolic and mitochondrial cytochrome *c* level for each treatment (n = 4).

SMASE activity

Cells were seeded in 12 well plates and incubated for 24 h with vehicle (controls) or 5 μ M CoQ and then incubated for 24 h in fresh medium containing 5 μ M $A\beta_{25-35}$ peptide. Cells were detached and nSMase activity was determined from cell extracts as described in earlier studies [32].

$A\beta_{25-35}$ incorporation into HUVECs

The effect of CoQ on $A\beta_{25-35}$ incorporation into HUVECs was determined by both fluorescence and confocal approaches. In a first approach, cells were grown onto 35 mm plates and treated for 24 h with vehicle (controls) or 5 μ M CoQ. Then, plates were mounted onto the stage of a Nikon TiU microscope under a 20x objective. A concentration of 5 μ M $A\beta_{25-35}$ peptide labeled with HiLyte Fluor 488 was added and fluorescence was recorded every 30 sec up to 45 min. Time-series were analyzed with ImageJ. Results show averaged cell-fluorescence profiles *vs.* baseline (n = 3) and data fit to exponential growth curves. For confocal studies, cells were grown onto gelatin-coated glass-bottom 35 mm plates and treated for 24 h with vehicle (controls) or 5 μ M CoQ. Then, cells were stained with 1 μ M Mitotracker DeepRed and incubated

with 5 μ M $A\beta_{25-35}$ labeled with HiLyte Fluor 488 for 5, 10, 20 and 40 min. After incubation, cells were washed and plates mounted onto the stage of a Zeiss LSM5 confocal microscope under a 40x objective. Images were sequentially acquired for green ($A\beta_{25-35}$ peptide) and red (Mitotracker DeepRed) channels and processed with ImageJ to calculate the signal of fluorescent $A\beta_{25-35}$ in the whole cell, cytosol and mitochondria. Results show the averaged cell $A\beta_{25-35}$ fluorescence (n = 3).

Metabolomics

Cells were grown onto 25 cm² flasks and treated for 12 h with vehicle (control) or 5 μ M CoQ and then incubated for 24 h in fresh medium containing 5 μ M $A\beta_{25-35}$ peptide. Cells were detached, rinsed twice in PBS and homogenized by sonication in deuterated D_2O (99.98% atom % D) (Sigma-Aldrich). Extracts were lyophilized and resuspended again in 40 μ l of deuterated water (99.994 atom % D) (Sigma-Aldrich). NMR spectra were performed on a Varian VNMRS-400 NMR system using a nanoprobe with rotors of 40 μ l. 1D and 2D NMR spectra were recorded for peak identification. The NMR spectra were processed with Mestrenova (Mestrelab Research) and peaks were also identified with Chenomx Profiler (Chenomx Inc.). Clustering and paired analysis for changes in the metabolites profile were assessed with the free software MEV 4.9 (<http://www.tm4.org/mev.html>). Pathways enrichment was analyzed using the platform MetaboAnalist 2.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp>).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. obtained from, at least, three separate, independent experiments carried out on different days with different cell preparations. Statistical analysis was carried out with Graphpad Prism 6, using Student's *t*-test followed by a Mann–Whitney statistical test or one-way ANOVA (Kruskal–Wallis test) followed by a statistical test for multiple comparisons (Dunn's test). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Supporting Information

Figure S1 Co-administration of CoQ affects neither free cytosolic Ca^{2+} nor apoptosis increase by β -amyloid. **A)** HUVECs were co-incubated for 12 h with CoQ and $\text{A}\beta_{25-35}$ (5 μM each). Apoptosis was determined by DAPI staining and morphological analysis of nuclei. Results are expressed as the percentage of apoptotic *vs.* total nuclei (300 cells/treatment, $n = 3$). **B)** HUVECs were co-incubated for 3 h with vehicle and CoQ and $\text{A}\beta_{25-35}$ peptide (5 μM each). Ca^{2+} levels were determined by fluorescence microscopy with the probe Fluo-4-AM. Results show the percentage of variation of fluorescence *vs.* control cells ($n = 3$). *a*, $p < 0.05$ *vs.* control. (TIF)

Figure S2 Effect of β -amyloid peptide and CoQ on n-SMase activity. HUVECs were incubated for 12 h with 5 μM CoQ, treated for additional 24 h with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$ peptide and then washed and pelleted. Neutral SMase activity was assayed as described in [32]. ($n = 4$). (TIF)

Figure S3 Representative pictures of mitochondrial Ca^{2+} quantification. HUVECs were incubated for 12 h with

vehicle or 5 μM CoQ and treated for additional 3 h with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$. Ca^{2+} levels were measured with Fluo-4-AM. Mitochondria were labeled with MitoTracker Deep Red. Images were acquired with an inverted fluorescence microscope and processed with ImageJ. For each picture, a mask corresponding to mitochondria was subtracted from total Ca^{2+} image to obtain a value of total-mitochondrial Ca^{2+} . (TIF)

Figure S4 Representative pictures of cytosolic cytochrome *c* quantification. HUVECs were incubated for 12 h with 5 μM CoQ and treated for additional 24 h with 5 μM $\text{A}\beta_{25-35}$. Cytochrome *c* was determined by ICC (green). Mitochondria were labeled with MitoTracker Deep Red. Images were acquired with an inverted fluorescence microscope and processed with ImageJ. For each picture, a mask corresponding to mitochondria was subtracted to total cytochrome *c* image, to obtain a value of the cytosolic fraction. (TIF)

Acknowledgments

We thank Kaneka Corporation, who generously provided the CoQ used in these experiments. M.V.G. acknowledges Albacete Science and Technology Park.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MD-P FJA. Performed the experiments: MD-P JF RS-M JRP GP-F MVGA MM JAL-D. Analyzed the data: MD-P FJA. Contributed reagents/materials/analysis tools: MD-P FJA. Wrote the paper: MD-P FJA. Discussed analyses, interpretation and presentation: JMV.

References

- Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430: 631–639.
- Park L, Anrather J, Forster C, Kazama K, Carlson GA, et al. (2004) Abeta-induced vascular oxidative stress and attenuation of functional hyperemia in mouse somatosensory cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 334–342.
- Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PLoS One* 6: e23789.
- Marchesi VT (2011) Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *The FASEB Journal* 25: 5–13.
- Suo Z, Fang C, Crawford F, Mullan M (1997) Superoxide free radical and intracellular calcium mediate A beta(1–42) induced endothelial toxicity. *Brain Res* 762: 144–152.
- Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994) Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817–827.
- Akiyama H, Ikeda K, Kondo H, McGeer PL (1992) Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 146: 152–154.
- Rizzo MT, Leaver HA (2010) Brain endothelial cell death: modes, signaling pathways, and relevance to neural development, homeostasis, and disease. *Mol Neurobiol* 42: 52–63.
- Hsu M-J, Hsu CY, Chen B-C, Chen M-C, Ou G, et al. (2007) Apoptosis signal-regulating kinase 1 in amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell apoptosis. *J Neurosci* 27: 5719–5729.
- Blanc EM, Toborek M, Mark RJ, Hennig B, Mattson MP (1997) Amyloid beta-peptide induces cell monolayer albumin permeability, impairs glucose transport, and induces apoptosis in vascular endothelial cells. *J Neurochem* 68: 1870–1881.
- Xu J, Chen S, Ku G, Ahmed SH, Chen H, et al. (2001) Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 702–710.
- Bhatia R, Lin H, Lal R (2000) Fresh and globular amyloid beta protein (1–42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J* 14: 1233–1243.
- Kawahara M (2010) Neurotoxicity of β -amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis. *Cur Pharm Des* 16: 2779–2789.
- Lal R, Lin H, Quist AP (2007) Amyloid beta ion channel: 3D structure and relevance to amyloid channel paradigm. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1966–1975.
- Park L, Anrather J, Zhou P, Frys K, Pitsick R, et al. (2005) NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide. *J Neurosci* 25: 1769–1777.
- Belliere J, Devun F, Cottet-Rousselle C, Batandier C, Leverve X, et al. (2012) Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death. *J Bioenerg Biomembr* 44: 207–212.
- Li G, Zou LY, Cao CM, Yang ES (2005) Coenzyme Q10 protects SHSY5Y neuronal cells from beta amyloid toxicity and oxygen-glucose deprivation by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Biofactors* 25: 97–107.
- Cha MY, Han SH, Son SM, Hong HS, Choi YJ, et al. (2012) Mitochondria-specific accumulation of amyloid beta induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death. *PLoS One* 7: e34929.
- Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, et al. (2008) The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13145–13150.
- Grammas P (2011) Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 8: 26.
- Dai YL, Luk TH, Yiu KH, Wang M, Yip PM, et al. (2011) Reversal of mitochondrial dysfunction by coenzyme Q10 supplement improves endothelial function in patients with ischaemic left ventricular systolic dysfunction: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis* 216: 395–401.
- Gao L, Mao Q, Cao J, Wang Y, Zhou X, et al. (2012) Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* 221: 311–316.
- Tiano L, Belardinelli R, Carnevali P, Principi F, Seddaiu G, et al. (2007) Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study. *Eur Heart J* 28: 2249–2255.
- Tsai KL, Chen LH, Chiou SH, Chiou GY, Chen YC, et al. (2011) Coenzyme Q10 suppresses oxLDL-induced endothelial oxidative injuries by the modulation of LOX-1-mediated ROS generation via the AMPK/PKC/NADPH oxidase signaling pathway. *Mol Nutr Food Res* 55 Suppl 2: S227–240.

25. Tsai KL, Huang YH, Kao CL, Yang DM, Lee HC, et al. (2012) A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways. *J Nutr Biochem* 23: 458–468.
26. Tsuneki H, Sekizaki N, Suzuki T, Kobayashi S, Wada T, et al. (2007) Coenzyme Q10 prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 566: 1–10.
27. Tsuneki H, Tokai E, Suzuki T, Seki T, Okubo K, et al. (2013) Protective effects of coenzyme Q10 against angiotensin II-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 701: 218–227.
28. Fontaine E, Ichas F, Bernardi P (1998) A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 273: 25734–25740.
29. Naderi J, Somayajulu-Nitu M, Mukerji A, Sharda P, Sikorska M, et al. (2006) Water-soluble formulation of Coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells. *Apoptosis* 11: 1359–1369.
30. Barth BM, Gustafson SJ, Kuhn TB (2012) Neutral sphingomyelinase activation precedes NADPH oxidase-dependent damage in neurons exposed to the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α . *J Neurosci Res* 90: 229–242.
31. Arroyo A, Navarro F, Gomez-Diaz C, Crane FL, Alcain FJ, et al. (2000) Interactions between ascorbyl free radical and coenzyme Q at the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* 32: 199–210.
32. Bello RI, Gomez-Diaz C, Buron MI, Alcain FJ, Navas P, et al. (2005) Enhanced anti-oxidant protection of liver membranes in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet. *Exp Gerontol* 40: 694–706.
33. Patel NS, Quadros A, Brem S, Wotoczek-Obadia M, Mathura VS, et al. (2008) Potent anti-angiogenic motifs within the Alzheimer beta-amyloid peptide. *Amyloid* 15: 5–19.
34. Folin M, Baiguera S, Tommasini M, Guidolin D, Conconi MT, et al. (2005) Effects of beta-amyloid on rat neuromicrovascular endothelial cells cultured in vitro. *Int J Mol Med* 15: 929–935.
35. Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5: 347–360.
36. Kandimalla KK, Scott OG, Fulzele S, Davidson MW, Poduslo JF (2009) Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein. *PLoS One* 4: e4627.
37. Trushina E, Nemutu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, et al. (2012) Defects in Mitochondrial Dynamics and Metabolic Signatures of Evolving Energetic Stress in Mouse Models of Familial Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 7.
38. Villalba JM, Parrado C, Santos-Gonzalez M, Alcain FJ (2010) Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulations. *Expert Opin Investig Drugs* 19: 535–554.
39. Simakova O, Arispe NJ (2011) Fluorescent analysis of the cell-selective Alzheimer's disease $\alpha\beta$ Peptide surface membrane binding: influence of membrane components. *Int J Alzheimer's Dis* 2011: 917629–917629.
40. Fernandez-Ayala DJ, Brea-Calvo G, Lopez-Lluch G, Navas P (2005) Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochim Biophys Acta* 1713: 129–137.
41. Mason RP, Estermyer JD, Kelly JF, Mason PE (1996) Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25–35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 222: 78–82.
42. Genova ML, Lenaz G (2011) New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. *Biofactors* 37: 330–354.
43. Anantharaman M, Tangpong J, Keller JN, Murphy MP, Markesbery WR, et al. (2006) Beta-amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLH/NLH X PS-1P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 168: 1608–1618.
44. Mugoni V, Postel R, Catanzaro V, De Luca E, Turco E, et al. (2013) Ubiad1 is an antioxidant enzyme that regulates eNOS activity by CoQ10 synthesis. *Cell* 152: 504–518.
45. Burklen TS, Schlattner U, Homayouni R, Gough K, Rak M, et al. (2006) The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: GK Inactivation, APP-CK Complexes, and Focal Creatine Deposits. *J Biomed Biotechnol* 2006.
46. Lupo G, Anfuso CD, Assero G, Strosznajder RP, Walski M, et al. (2001) Amyloid beta(1–42) and its beta(25–35) fragment induce in vitro phosphatidylcholine hydrolysis in bovine retina capillary pericytes. *Neurosci Lett* 303: 185–188.
47. Wong MK, Gotlieb AI (1984) In vitro reendothelialization of a single-cell wound. Role of microfilament bundles in rapid lamellipodia-mediated wound closure. *Lab Invest* 51: 75–81.
48. Drummond GR, Selemidis S, Griending KK, Sobey CG (2011) Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10: 453–471.
49. Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF (2009) Coenzyme Q10 improves endothelial dysfunction in statin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 32: 810–812.
50. Lim SC, Lekshminarayanan R, Goh SK, Ong YY, Subramaniam T, et al. (2008) The effect of coenzyme Q10 on microcirculatory endothelial function of subjects with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 196: 966–969.
51. Langsoen PH (2000) Lack of effect of coenzyme Q on left ventricular function in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 35: 816–817.



Versión on-line del artículo y material adicional

Anexo III. Resultados adicionales

Capítulo III. El CoQ10 reduce el depósito de placas de β A, la hipoxia y el grosor de la lámina basal de la microvasculatura cerebral en ratones 3xTg-AD

El Ubiquinol reduce la neofobia y mejora el aprendizaje en ratones 3xTg-AD

Todas las alteraciones observadas sobre el hipocampo deben traducirse como una mejora cognitiva o menor daño cognitivo en ratones Ub y Vh. En colaboración con la Dra. Lydia Giménez-Llort, de la Universidad Autónoma de Barcelona, se realizó un estudio de comportamiento de los ratones tratados con las diferentes dietas. Como hemos visto en el capítulo I de los resultados, el ratón 3xTg-AD presenta alteraciones en el comportamiento desde fases muy tempranas, siendo muy notables a la edad de 12 meses. Los resultados preliminares de comportamiento obtenidos muestran como los ratones presentan un descenso en la neofobia (*corner test*) (Figura 3.10 A). Mediante este método se determina la respuesta directa de los ratones y se basa en la latencia del *rearing* (movimiento en el que el ratón se yergue sobre sus patas traseras). No se observaron diferencias entre el grupo Ub y Vh.

Además se hizo un test de Morris (*Morris water maze test*), un método utilizado para estudiar el aprendizaje y la memoria espacial. En este método los ratones se ponen en una piscina circular. El primer día los ratones encuentran una plataforma que les permite salir del agua, el segundo día la plataforma está en el mismo sitio pero no es visible. De esta forma se evalúa su capacidad de recordar donde se encuentra la plataforma. Nuestros resultados comprobaron como la pérdida de la memoria y el aprendizaje espacial es menor en ratones tratados con Ub y Vh que en ratones St, siendo levemente menor en los Ub (Figura A. B).

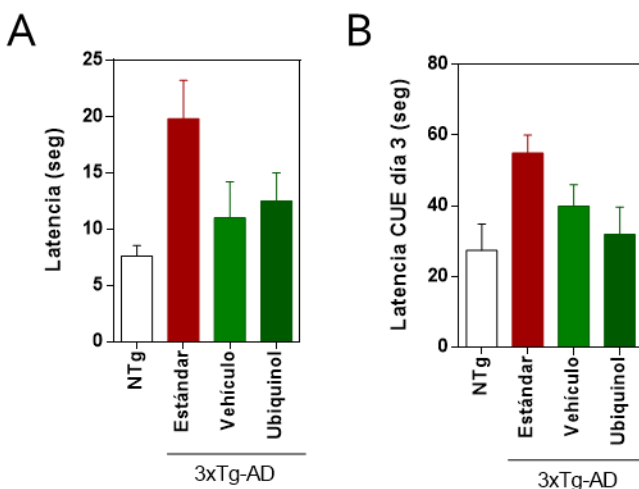


Figura A.III. El ubiquinol reduce el deterioro cognitivo en ratones 3xTg-AD. Se realizó un estudio de neofobia basado en un *corner test* (A) y el test de Morris (B) para el estudio de la memoria a corto plazo.

Bibliografía



La televisión ha hecho maravillas por mi cultura. En cuanto que alguien la enciende voy a la biblioteca y me leo un buen libro

Groucho Marx

- Aberg, F., E. L. Appelkvist, G. Dallner and L. Ernster (1992). "Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues." *Arch Biochem Biophys* **295**(2): 230-234.
- Adams, L., M. C. Franco and A. G. Estevez (2015). "Reactive nitrogen species in cellular signaling." *Exp Biol Med (Maywood)* **240**(6): 711-717.
- Adarsh, K., H. Kaur and V. Mohan (2008). "Coenzyme Q10 (CoQ10) in isolated diastolic heart failure in hypertrophic cardiomyopathy (HCM)." *Biofactors* **32**(1-4): 145-149.
- Adlard, P. A. and A. I. Bush (2011). "The plasma membrane redox system in Alzheimer's disease." *Exp Neurol* **228**(1): 9-14.
- Aghi, M., K. S. Cohen, R. J. Klein, D. T. Scadden and E. A. Chiocca (2006). "Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes." *Cancer Res* **66**(18): 9054-9064.
- Agnihotri, S., K. Burrell, P. Buczkowicz, M. Remke, B. Golbourn, Y. Chornenkyy, A. Gajadhar, N. A. Fernandez, I. D. Clarke, M. S. Barszczyk, S. Pajovic, C. Ternamian, R. Head, N. Sabha, R. W. Sobol, M. D. Taylor, J. T. Rutka, C. Jones, P. B. Dirks, G. Zadeh and C. Hawkins (2014). "ATM regulates 3-methylpurine-DNA glycosylase and promotes therapeutic resistance to alkylating agents." *Cancer Discov* **4**(10): 1198-1213.
- Akiyama, H., K. Ikeda, H. Kondo and P. L. McGeer (1992). "Thrombin accumulation in brains of patients with Alzheimer's disease." *Neurosci Lett* **146**(2): 152-154.
- Alcain, F. J. and J. M. Villalba (2007). "NQO1-directed antitumour quinones." *Expert Opin Ther Pat* **17**(6): 16.
- Ali, M. A., A. Reis, L. H. Ding, M. D. Story, A. A. Habib, A. Chattopadhyay and D. Saha (2009). "SNS-032 prevents hypoxia-mediated glioblastoma cell invasion by inhibiting hypoxia inducible factor-1alpha expression." *Int J Oncol* **34**(4): 1051-1060.
- Aliev, G., D. Seyidova, M. L. Neal, J. Shi, B. T. Lamb, S. L. Siedlak, H. V. Vinters, E. Head, G. Perry, J. C. Lamanna, R. P. Friedland and C. W. Cotman (2002). "Atherosclerotic lesions and mitochondria DNA deletions in brain microvessels as a central target for the development of human AD and AD-like pathology in aged transgenic mice." *Ann N Y Acad Sci* **977**: 45-64.
- Aliyev, A., S. G. Chen, D. Seyidova, M. A. Smith, G. Perry, J. de la Torre and G. Aliev (2005). "Mitochondria DNA deletions in atherosclerotic hypoperfused brain microvessels as a primary target for the development of Alzheimer's disease." *J Neurol Sci* **229-230**: 285-292.
- Aluise, C. D., S. Miriyala, T. Noel, R. Sultana, P. Jungsuwadee, T. J. Taylor, J. Cai, W. M. Pierce, M. Vore, J. A. Moscow, D. K. St Clair and D. A. Butterfield (2011). "2-Mercaptoethane sulfonate prevents doxorubicin-induced plasma protein oxidation and TNF-alpha release: implications for the reactive oxygen species-mediated mechanisms of chemobrain." *Free Radic Biol Med* **50**(11): 1630-1638.

- Alzheimer, A., R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein and F. R. Murtagh (1995). "An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". " Clin Anat **8**(6): 429-431.
- Ambrose, D., M. Resnicoff, D. Coppola, C. Sell, M. Miura, S. Jameson, R. Baserga and R. Rubin (1994). "Growth regulation of human glioblastoma T98G cells by insulin-like growth factor-1 and its receptor." J Cell Physiol **159**(1): 92-100.
- Anantharaman, M., J. Tangpong, J. N. Keller, M. P. Murphy, W. R. Markesbery, K. K. Kinningham and D. K. St Clair (2006). "Beta-amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLH/NLH X PS-1P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease." Am J Pathol **168**(5): 1608-1618.
- Andersen, K., L. J. Launer, M. E. Dewey, L. Letenneur, A. Ott, J. R. Copeland, J. F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, M. Baldereschi, C. Brayne, A. Lobo, J. M. Martinez-Lage, T. Stijnen and A. Hofman (1999). "Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group." Neurology **53**(9): 1992-1997.
- Andrae, J., R. Gallini and C. Betsholtz (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." Genes Dev **22**(10): 1276-1312.
- Anton, K., J. M. Baehring and T. Mayer (2012). "Glioblastoma multiforme: overview of current treatment and future perspectives." Hematol Oncol Clin North Am **26**(4): 825-853.
- Apelt, J., M. Bigl, P. Wunderlich and R. Schliebs (2004). "Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology." Int J Dev Neurosci **22**(7): 475-484.
- Bachman, D. L., P. A. Wolf, R. Linn, J. E. Knoefel, J. Cobb, A. Belanger, R. B. D'Agostino and L. R. White (1992). "Prevalence of dementia and probable senile dementia of the Alzheimer type in the Framingham Study." Neurology **42**(1): 115-119.
- Badie, B. and J. Schartner (2001). "Role of microglia in glioma biology." Microsc Res Tech **54**(2): 106-113.
- Bahar, M., S. Khaghani, P. Pasalar, M. Paknejad, M. R. Khorramizadeh, H. Mirmiranpour and S. G. Nejad (2010). "Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model." Nutr J **9**: 62.
- Baldeiras, I., I. Santana, M. T. Proenca, M. H. Garrucho, R. Pascoal, A. Rodrigues, D. Duro and C. R. Oliveira (2010). "Oxidative damage and progression to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment." J Alzheimers Dis **21**(4): 1165-1177.
- Baldwin, A. S., Jr. (2001). "Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease." J Clin Invest **107**(1): 3-6.
- Balercia, G., E. Buldreghini, A. Vignini, L. Tiano, F. Paggi, S. Amoroso, G. Ricciardo-Lamonica, M. Boscaro, A. Lenzi and G. Littarru (2009). "Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial." Fertil Steril **91**(5): 1785-1792.

- Bando, H., T. Atsumi, T. Nishio, H. Niwa, S. Mishima, C. Shimizu, N. Yoshioka, R. Bucala and T. Koike (2005). "Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer." *Clin Cancer Res* **11**(16): 5784-5792.
- Bang, J., W. K. Jeon, I. S. Lee, J. S. Han and B. Y. Kim (2013). "Biphasic functional regulation in hippocampus of rat with chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral common carotid artery." *PLoS One* **8**(7): e70093.
- Basseres, D. S. and A. S. Baldwin (2006). "Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression." *Oncogene* **25**(51): 6817-6830.
- Battino, M., S. Bompadre, L. Leone, E. Devecchi, A. Degiuli, F. D'Agostino, G. Cambie, M. D'Agostino, L. Faggi, G. Colturani, A. Gorini and R. F. Villa (2003). "Coenzyme Q, Vitamin E and Apo-E alleles in Alzheimer Disease." *Biofactors* **18**(1-4): 277-281.
- Beal, M. F. (1999). "Coenzyme Q10 administration and its potential for treatment of neurodegenerative diseases." *Biofactors* **9**(2-4): 261-266.
- Beckmann, J. S., Y. Z. Ye, P. G. Anderson, J. Chen, M. A. Accavitti, M. M. Tarpey and C. R. White (1994). "Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry." *Biol Chem Hoppe Seyler* **375**(2): 81-88.
- Behl, C., J. B. Davis, R. Lesley and D. Schubert (1994). "Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity." *Cell* **77**(6): 817-827.
- Belardinelli, R., L. Tiano and G. P. Littarru (2008). "Oxidative stress, endothelial function and coenzyme Q10." *Biofactors* **32**(1-4): 129-133.
- Belliere, J., F. Devun, C. Cottet-Rousselle, C. Batandier, X. Lerverve and E. Fontaine (2012). "Prerequisites for ubiquinone analogs to prevent mitochondrial permeability transition-induced cell death." *J Bioenerg Biomembr* **44**(1): 207-212.
- Bello, R. I., V. E. Kagan, V. Tyurin, F. Navarro, F. J. Alcaín and J. M. Villalba (2003). "Regeneration of lipophilic antioxidants by NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1." *Protoplasma* **221**(1-2): 129-135.
- Ben-Yosef, Y., N. Lahat, S. Shapiro, H. Bitterman and A. Miller (2002). "Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation." *Circ Res* **90**(7): 784-791.
- Bentinger, M., M. Tekle and G. Dallner (2010). "Coenzyme Q--biosynthesis and functions." *Biochem Biophys Res Commun* **396**(1): 74-79.
- Bergers, G. and S. Song (2005). "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." *Neuro Oncol* **7**(4): 452-464.
- Bhat, K. P., V. Balasubramanian, B. Vaillant, R. Ezhilarasan, K. Hummelink, F. Hollingsworth, K. Wani, L. Heathcock, J. D. James, L. D. Goodman, S. Conroy, L. Long, N. Lelic, S. Wang, J. Gumin, D. Raj, Y. Kodama, A. Raghunathan, A. Olar, K. Joshi, C. E. Pelloski, A. Heimberger, S. H. Kim, D. P. Cahill, G. Rao, W. F. Den Dunnen, H. W. Boddeke, H. S. Phillips, I. Nakano, F. F. Lang, H. Colman, E. P. Sulman and K. Aldape (2013). "Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma." *Cancer Cell* **24**(3): 331-346.

- Bhatia, R., H. Lin and R. Lal (2000). "Fresh and globular amyloid beta protein (1-42) induces rapid cellular degeneration: evidence for AbetaP channel-mediated cellular toxicity." *FASEB J* **14**(9): 1233-1243.
- Bilkei-Gorzo, A. (2014). "Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease." *Pharmacol Ther* **142**(2): 244-257.
- Biron, K. E., D. L. Dickstein, R. Gopaul and W. A. Jefferies (2011). "Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease." *PLoS One* **6**(8): e23789.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* **279**(5349): 349-352.
- Bonda, D. J., H. G. Lee, A. Camins, M. Pallas, G. Casadesus, M. A. Smith and X. Zhu (2011). "The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations." *Lancet Neurol* **10**(3): 275-279.
- Bonfoco, E., D. Krainc, M. Ankarcrona, P. Nicotera and S. A. Lipton (1995). "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7162-7166.
- Bonnet, S., S. L. Archer, J. Allalunis-Turner, A. Haromy, C. Beaulieu, R. Thompson, C. T. Lee, G. D. Lopaschuk, L. Puttagunta, S. Bonnet, G. Harry, K. Hashimoto, C. J. Porter, M. A. Andrade, B. Thebaud and E. D. Michelakis (2007). "A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth." *Cancer Cell* **11**(1): 37-51.
- Bottero, V., S. Withoff and I. M. Verma (2006). "NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis." *Cell Death Differ* **13**(5): 785-797.
- Bourasset, F., M. Ouellet, C. Tremblay, C. Julien, T. M. Do, S. Oddo, F. LaFerla and F. Calon (2009). "Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." *Neuropharmacology* **56**(4): 808-813.
- Bouron, A., C. Mbebi, J. P. Loeffler and M. De Waard (2004). "The beta-amyloid precursor protein controls a store-operated Ca²⁺ entry in cortical neurons." *Eur J Neurosci* **20**(8): 2071-2078.
- Braak, E., K. Griffing, K. Arai, J. Bohl, H. Bratzke and H. Braak (1999). "Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer?" *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249 Suppl 3**: 14-22.
- Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." *Acta Neuropathol* **82**(4): 239-259.
- Braak, H. and E. Braak (1995). "Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes." *Neurobiol Aging* **16**(3): 271-278; discussion 278-284.
- Brandon, M., P. Baldi and D. C. Wallace (2006). "Mitochondrial mutations in cancer." *Oncogene* **25**(34): 4647-4662.

- Brat, D. J. and E. G. Van Meir (2004). "Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma." *Lab Invest* **84**(4): 397-405.
- Bravard, A., C. Luccioni, E. Moustacchi and O. Rigaud (1999). "Contribution of antioxidant enzymes to the adaptive response to ionizing radiation of human lymphoblasts." *Int J Radiat Biol* **75**(5): 639-645.
- Brem, S. (1976). "The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors." *Clin Neurosurg* **23**: 440-453.
- Brenneisen, P., K. Briviba, M. Wlaschek, J. Wenk and K. Scharffetter-Kochanek (1997). "Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts." *Free Radic Biol Med* **22**(3): 515-524.
- Brown, J. M. (2014). "Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy." *Br J Radiol* **87**(1035): 20130686.
- Buee, L., P. R. Hof, C. Bouras, A. Delacourte, D. P. Perl, J. H. Morrison and H. M. Fillit (1994). "Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders." *Acta Neuropathol* **87**(5): 469-480.
- Butterfield, D. A., A. Castegna, C. M. Lauderback and J. Drake (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." *Neurobiol Aging* **23**(5): 655-664.
- Butterfield, D. A., J. Drake, C. Pocernich and A. Castegna (2001). "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide." *Trends Mol Med* **7**(12): 548-554.
- Cabiscol, E., J. Tamarit and J. Ros (2000). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." *Int Microbiol* **3**(1): 3-8.
- Cai, Y., X. M. Zhang, L. N. Macklin, H. Cai, X. G. Luo, S. Oddo, F. M. Laferla, R. G. Struble, G. M. Rose, P. R. Patrylo and X. X. Yan (2012). "BACE1 elevation is involved in amyloid plaque development in the triple transgenic model of Alzheimer's disease: differential Aβ antibody labeling of early-onset axon terminal pathology." *Neurotox Res* **21**(2): 160-174.
- Cain, J. C. and R. A. Morton (1955). "Some minor constituents of liver oils." *Biochem J* **60**(2): 274-283.
- Callahan, M. J., W. J. Lipinski, F. Bian, R. A. Durham, A. Pack and L. C. Walker (2001). "Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice." *Am J Pathol* **158**(3): 1173-1177.
- Camphausen, K., B. Purow, M. Sproull, T. Scott, T. Ozawa, D. F. Deen and P. J. Tofilon (2005). "Influence of in vivo growth on human glioma cell line gene expression: convergent profiles under orthotopic conditions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8287-8292.
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* **455**(7216): 1061-1068.

- Candolfi, M., J. F. Curtin, W. S. Nichols, A. G. Muhammad, G. D. King, G. E. Pluhar, E. A. McNiel, J. R. Ohlfest, A. B. Freese, P. F. Moore, J. Lerner, P. R. Lowenstein and M. G. Castro (2007). "Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression." *J Neurooncol* **85**(2): 133-148.
- Capelli, E., M. Civallero, S. Barni, M. Ceroni and R. Nano (1999). "Interleukin-2 induces the growth of human glioblastoma cells in culture." *Anticancer Res* **19**(4B): 3147-3151.
- Carlson, B. L., P. T. Grogan, A. C. Mladek, M. A. Schroeder, G. J. Kitange, P. A. Decker, C. Giannini, W. Wu, K. A. Ballman, C. D. James and J. N. Sarkaria (2009). "Radiosensitizing effects of temozolomide observed in vivo only in a subset of O6-methylguanine-DNA methyltransferase methylated glioblastoma multiforme xenografts." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **75**(1): 212-219.
- Carroll, J. C., E. R. Rosario, S. Kreimer, A. Villamagna, E. Gentschein, F. Z. Stanczyk and C. J. Pike (2010). "Sex differences in beta-amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure." *Brain Res* **1366**: 233-245.
- Carter, D. B. (2005). "The interaction of amyloid-beta with ApoE." *Subcell Biochem* **38**: 255-272.
- Caspani, E. M., P. H. Crossley, C. Redondo-Garcia and S. Martinez (2014). "Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes." *PLoS One* **9**(7): e101402.
- Castagne, V., M. Gautschi, K. Lefevre, A. Posada and P. G. Clarke (1999). "Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system." *Prog Neurobiol* **59**(4): 397-423.
- Castedo, M., J. L. Perfettini, T. Roumier, A. Valent, H. Raslova, K. Yakushijin, D. Horne, J. Feunteun, G. Lenoir, R. Medema, W. Vainchenker and G. Kroemer (2004). "Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy." *Oncogene* **23**(25): 4362-4370.
- Celik, T. and A. Iyisoy (2009). "Coenzyme Q10 and coronary artery bypass surgery: what we have learned from clinical trials." *J Cardiothorac Vasc Anesth* **23**(6): 935-936.
- Cimini, A., S. Moreno, M. D'Amelio, L. Cristiano, B. D'Angelo, S. Falone, E. Benedetti, P. Carrara, F. Fanelli, F. Cecconi, F. Amicarelli and M. P. Ceru (2009). "Early biochemical and morphological modifications in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for peroxisomes." *J Alzheimers Dis* **18**(4): 935-952.
- Claudio, L. (1996). "Ultrastructural features of the blood-brain barrier in biopsy tissue from Alzheimer's disease patients." *Acta Neuropathol* **91**(1): 6-14.
- Cleren, C., L. Yang, B. Lorenzo, N. Y. Calingasan, A. Schomer, A. Sireci, E. J. Wille and M. F. Beal (2008). "Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism." *J Neurochem* **104**(6): 1613-1621.
- Cobbs, C. S., T. R. Whisenhunt, D. R. Wesemann, L. E. Harkins, E. G. Van Meir and M. Samanta (2003). "Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive

- oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells." Cancer Res **63**(24): 8670-8673.
- Cohen, M. H., Y. L. Shen, P. Keegan and R. Pazdur (2009). "FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme." Oncologist **14**(11): 1131-1138.
- Coldiron, A. D., Jr., R. A. Sanders and J. B. Watkins, 3rd (2002). "Effects of combined quercetin and coenzyme Q(10) treatment on oxidative stress in normal and diabetic rats." J Biochem Mol Toxicol **16**(4): 197-202.
- Cominacini, L., A. F. Pasini, U. Garbin, A. Davoli, M. L. Tosetti, M. Campagnola, A. Rigoni, A. M. Pastorino, V. Lo Cascio and T. Sawamura (2000). "Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species." J Biol Chem **275**(17): 12633-12638.
- Coniglio, S. J. and J. E. Segall (2013). "Review: molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion." Matrix Biol **32**(7-8): 372-380.
- Cooper, J. M., L. V. Korlipara, P. E. Hart, J. L. Bradley and A. H. Schapira (2008). "Coenzyme Q10 and vitamin E deficiency in Friedreich's ataxia: predictor of efficacy of vitamin E and coenzyme Q10 therapy." Eur J Neurol **15**(12): 1371-1379.
- Cordoba-Pedregosa Mdel, C., J. M. Villalba, D. Gonzalez-Aragon, R. I. Bello and F. J. Alcain (2006). "Cellular density and cell type are the key factors in growth inhibition induced by 2,5bis [1-aziridinyl]-1,4 benzoquinone (DZQ)." Anticancer Res **26**(5A): 3535-3540.
- Correia, S. C. and P. I. Moreira (2010). "Hypoxia-inducible factor 1: a new hope to counteract neurodegeneration?" J Neurochem **112**(1): 1-12.
- Crane, F. L. (2001). "Biochemical functions of coenzyme Q10." J Am Coll Nutr **20**(6): 591-598.
- Crane, F. L., Y. Hatefi, R. L. Lester and C. Widmer (1957). "Isolation of a quinone from beef heart mitochondria." Biochim Biophys Acta **25**(1): 220-221.
- Cummings, J. L. (2004). "Alzheimer's disease." N Engl J Med **351**(1): 56-67.
- Curry, R. C., S. Dahiya, V. Alva Venur, J. J. Raizer and M. S. Ahluwalia (2015). "Bevacizumab in high-grade gliomas: past, present, and future." Expert Rev Anticancer Ther **15**(4): 387-397.
- Curtin, J. F., G. D. King, M. Candolfi, R. B. Greeno, K. M. Kroeger, P. R. Lowenstein and M. G. Castro (2005). "Combining cytotoxic and immune-mediated gene therapy to treat brain tumors." Curr Top Med Chem **5**(12): 1151-1170.
- Cha, M. Y., S. H. Han, S. M. Son, H. S. Hong, Y. J. Choi, J. Byun and I. Mook-Jung (2012). "Mitochondria-specific accumulation of amyloid beta induces mitochondrial dysfunction leading to apoptotic cell death." PLoS One **7**(4): e34929.
- Chami, L. and F. Checler (2012). "BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **7**: 52.
- Chang, Y. T., W. N. Chang, N. W. Tsai, C. C. Huang, C. T. Kung, Y. J. Su, W. C. Lin, B. C. Cheng, C. M. Su, Y. F. Chiang and C. H. Lu (2014). "The roles of biomarkers of oxidative

- stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review." Biomed Res Int **2014**: 182303.
- Charles, N. A., E. C. Holland, R. Gilbertson, R. Glass and H. Kettenmann (2012). "The brain tumor microenvironment." Glia **60**(3): 502-514.
- Chaturvedi, R. K. and M. F. Beal (2008). "Mitochondrial approaches for neuroprotection." Ann N Y Acad Sci **1147**: 395-412.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br Med Bull **49**(3): 481-493.
- Chen, J., Y. Li, T. S. Yu, R. M. McKay, D. K. Burns, S. G. Kernie and L. F. Parada (2012). "A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy." Nature **488**(7412): 522-526.
- Chen, N. and J. Debnath (2010). "Autophagy and tumorigenesis." FEBS Lett **584**(7): 1427-1435.
- Chen, W. T. (1989). "Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells." J Exp Zool **251**(2): 167-185.
- Cheng, L., Z. Huang, W. Zhou, Q. Wu, S. Donnola, J. K. Liu, X. Fang, A. E. Sloan, Y. Mao, J. D. Lathia, W. Min, R. E. McLendon, J. N. Rich and S. Bao (2013). "Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth." Cell **153**(1): 139-152.
- Chiocca, E. A. (2002). "Oncolytic viruses." Nat Rev Cancer **2**(12): 938-950.
- Chiu, W. T., S. C. Shen, J. M. Chow, C. W. Lin, L. T. Shia and Y. C. Chen (2010). "Contribution of reactive oxygen species to migration/invasion of human glioblastoma cells U87 via ERK-dependent COX-2/PGE(2) activation." Neurobiol Dis **37**(1): 118-129.
- Choi, J. S., S. Y. Park, E. Y. Yi, Y. J. Kim and J. W. Jeong (2011). "Coenzyme Q10 decreases basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced angiogenesis by blocking ERK activation." Oncol Res **19**(10-11): 455-461.
- Choi, S. L., S. J. Kim, K. T. Lee, J. Kim, J. Mu, M. J. Birnbaum, S. Soo Kim and J. Ha (2001). "The regulation of AMP-activated protein kinase by H(2)O(2)." Biochem Biophys Res Commun **287**(1): 92-97.
- da Fonseca, A. C. and B. Badie (2013). "Microglia and macrophages in malignant gliomas: recent discoveries and implications for promising therapies." Clin Dev Immunol **2013**: 264124.
- Dahm-Daphi, J. (2000). "p53: biology and role for cellular radiosensitivity." Strahlenther Onkol **176**(6): 278-285.
- Dai, C. and E. C. Holland (2001). "Glioma models." Biochim Biophys Acta **1551**(1): M19-27.
- Dai, Y. L., T. H. Luk, K. H. Yiu, M. Wang, P. M. Yip, S. W. Lee, S. W. Li, S. Tam, B. Fong, C. P. Lau, C. W. Siu and H. F. Tse (2011). "Reversal of mitochondrial dysfunction by coenzyme Q10 supplement improves endothelial function in patients with ischaemic left ventricular systolic dysfunction: a randomized controlled trial." Atherosclerosis **216**(2): 395-401.

- Damoiseaux, J. S., K. E. Prater, B. L. Miller and M. D. Greicius (2012). "Functional connectivity tracks clinical deterioration in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **33**(4): 828 e819-830.
- Daniel J Klinsky, K. A., Akihisa Abe, Md Joynal Abedin,, A. A. A. Hagai Abeliovich, Hiroaki Adachi, Christopher and P. D. A. M Adams, Khosrow Adeli (2016). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)." Autophagy: 240.
- Davies, K. J. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects." J Biol Chem **262**(20): 9895-9901.
- de Bustos, F., F. J. Jimenez-Jimenez, J. A. Molina, C. Gomez-Escalonilla, C. de Andres, P. del Hoyo, M. Zurdo, A. Tallon-Barranco, A. Berbel, J. Porta-Etessam, G. Parrilla and J. Arenas (2000). "Serum levels of coenzyme Q10 in patients with multiple sclerosis." Acta Neurol Scand **101**(3): 209-211.
- de la Torre, J. C. (2012). "Cerebral hemodynamics and vascular risk factors: setting the stage for Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **32**(3): 553-567.
- Deane, R., R. D. Bell, A. Sagare and B. V. Zlokovic (2009). "Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease." CNS Neurol Disord Drug Targets **8**(1): 16-30.
- DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli and C. B. Thompson (2007). "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19345-19350.
- Deighton, R. F., T. Le Bihan, S. F. Martin, A. M. Gerth, M. McCulloch, J. M. Edgar, L. E. Kerr, I. R. Whittle and J. McCulloch (2014). "Interactions among mitochondrial proteins altered in glioblastoma." J Neurooncol **118**(2): 247-256.
- Delanty, N. and M. A. Dichter (1998). "Oxidative injury in the nervous system." Acta Neurol Scand **98**(3): 145-153.
- Demou, Z. N. and M. J. Hendrix (2008). "Microgenomics profile the endogenous angiogenic phenotype in subpopulations of aggressive melanoma." J Cell Biochem **105**(2): 562-573.
- Denko, N. C. (2008). "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour." Nat Rev Cancer **8**(9): 705-713.
- Deprez, J., D. Vertommen, D. R. Alessi, L. Hue and M. H. Rider (1997). "Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades." J Biol Chem **272**(28): 17269-17275.
- Desbaillets, I., M. Tada, N. de Tribolet, A. C. Diserens, M. F. Hamou and E. G. Van Meir (1994). "Human astrocytomas and glioblastomas express monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in vivo and in vitro." Int J Cancer **58**(2): 240-247.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.

- Dewhirst, M. W., Y. Cao and B. Moeller (2008). "Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response." *Nat Rev Cancer* **8**(6): 425-437.
- Diaz, B., G. Shani, I. Pass, D. Anderson, M. Quintavalle and S. A. Courtneidge (2009). "Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation." *Sci Signal* **2**(88): ra53.
- Dickson, D. W., J. Farlo, P. Davies, H. Crystal, P. Fuld and S. H. Yen (1988). "Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques." *Am J Pathol* **132**(1): 86-101.
- Digiesi, V., F. Cantini, A. Oradei, G. Bisi, G. C. Guarino, A. Brocchi, F. Bellandi, M. Mancini and G. P. Littarru (1994). "Coenzyme Q10 in essential hypertension." *Mol Aspects Med* **15 Suppl**: s257-263.
- Dixit, S., A. Bernardo, J. M. Walker, J. A. Kennard, G. Y. Kim, E. S. Kessler and F. E. Harrison (2015). "Vitamin C deficiency in the brain impairs cognition, increases amyloid accumulation and deposition, and oxidative stress in APP/PSEN1 and normally aging mice." *ACS Chem Neurosci* **6**(4): 570-581.
- Djuzenova, C. S., V. Fiedler, S. Memmel, A. Katzer, S. Hartmann, G. Krohne, H. Zimmermann, C. J. Scholz, B. Polat, M. Flentje and V. L. Sukhorukov (2015). "Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status." *Exp Cell Res* **330**(2): 346-357.
- Do, T. M., W. Alata, A. Dodacki, M. T. Traversy, H. Chacun, L. Pradier, J. M. Scherrmann, R. Farinotti, F. Calon and F. Bourasset (2014). "Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease." *Neuropharmacology* **81**: 311-317.
- Domae, N., H. Sawada, E. Matsuyama, T. Konishi and H. Uchino (1981). "Cardiomyopathy and other chronic toxic effects induced in rabbits by doxorubicin and possible prevention by coenzyme Q10." *Cancer Treat Rep* **65**(1-2): 79-91.
- Domenech, E., C. Maestre, L. Esteban-Martinez, D. Partida, R. Pascual, G. Fernandez-Miranda, E. Seco, R. Campos-Olivas, M. Perez, D. Megias, K. Allen, M. Lopez, A. K. Saha, G. Velasco, E. Rial, R. Mendez, P. Boya, M. Salazar-Roa and M. Malumbres (2015). "AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest." *Nat Cell Biol* **17**(10): 1304-1316.
- Drummond, G. R., S. Selemidis, K. K. Griendling and C. G. Sobey (2011). "Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets." *Nat Rev Drug Discov* **10**(6): 453-471.
- Du, J., R. Xu, Z. Hu, Y. Tian, Y. Zhu, L. Gu and L. Zhou (2011). "PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells." *PLoS One* **6**(9): e25213.
- Duce, J. A., A. Tsatsanis, M. A. Cater, S. A. James, E. Robb, K. Wikhe, S. L. Leong, K. Perez, T. Johanssen, M. A. Greenough, H. H. Cho, D. Galatis, R. D. Moir, C. L. Masters, C. McLean, R. E. Tanzi, R. Cappai, K. J. Barnham, G. D. Ciccotosto, J. T. Rogers and A. I. Bush (2010). "Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease." *Cell* **142**(6): 857-867.

- Duran-Prado, M., J. Frontinan, R. Santiago-Mora, J. R. Peinado, C. Parrado-Fernandez, M. V. Gomez-Almagro, M. Moreno, J. A. Lopez-Dominguez, J. M. Villalba and F. J. Alcaín (2014). "Coenzyme Q10 protects human endothelial cells from beta-amyloid uptake and oxidative stress-induced injury." *PLoS One* **9**(10): e109223.
- Dvorak, H. F. (2003). "Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma." *Am J Pathol* **162**(6): 1747-1757.
- Edlund, C., M. Soderberg, K. Kristensson and G. Dallner (1992). "Ubiquinone, dolichol, and cholesterol metabolism in aging and Alzheimer's disease." *Biochem Cell Biol* **70**(6): 422-428.
- Emerling, B. M., F. Weinberg, C. Snyder, Z. Burgess, G. M. Mutlu, B. Viollet, G. R. Budinger and N. S. Chandel (2009). "Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio." *Free Radic Biol Med* **46**(10): 1386-1391.
- England, B., T. Huang and M. Karsy (2013). "Current understanding of the role and targeting of tumor suppressor p53 in glioblastoma multiforme." *Tumour Biol* **34**(4): 2063-2074.
- Fan, C. H., W. L. Liu, H. Cao, C. Wen, L. Chen and G. Jiang (2013). "O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas." *Cell Death Dis* **4**: e876.
- Faraci, F. M. (2003). "Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(3): 371-373.
- Farkas, E., P. G. Luiten and F. Bari (2007). "Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases." *Brain Res Rev* **54**(1): 162-180.
- Feigin, A., K. Kiebertz, P. Como, C. Hickey, K. Claude, D. Abwender, C. Zimmerman, K. Steinberg and I. Shoulson (1996). "Assessment of coenzyme Q10 tolerability in Huntington's disease." *Mov Disord* **11**(3): 321-323.
- Feldkamp, M. M., P. Lala, N. Lau, L. Roncari and A. Guha (1999). "Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens." *Neurosurgery* **45**(6): 1442-1453.
- Feldman, M. E., B. Apsel, A. Uotila, R. Loewith, Z. A. Knight, D. Ruggiero and K. M. Shokat (2009). "Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2." *PLoS Biol* **7**(2): e38.
- Ferla, R., M. Bonomi, L. Otvos, Jr. and E. Surmacz (2011). "Glioblastoma-derived leptin induces tube formation and growth of endothelial cells: comparison with VEGF effects." *BMC Cancer* **11**: 303.
- Fernandez-Ayala, D. J., G. Brea-Calvo, G. Lopez-Lluch and P. Navas (2005). "Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system." *Biochim Biophys Acta* **1713**(2): 129-137.
- Ferrandon, S., C. Malleval, B. El Hamdani, P. Battiston-Montagne, R. Bolbos, J. B. Langlois, P. Manas, S. M. Gryaznov, G. Alphonse, J. Honnorat, C. Rodriguez-Lafrasse and D.

- Poncet (2015). "Telomerase inhibition improves tumor response to radiotherapy in a murine orthotopic model of human glioblastoma." *Mol Cancer* **14**: 134.
- Fiaschi, T. and P. Chiarugi (2012). "Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison." *Int J Cell Biol* **2012**: 762825.
- Filippi-Chiela, E. C., M. P. Thome, M. M. Bueno e Silva, A. L. Pelegrini, P. F. Ledur, B. Garicochea, L. L. Zamin and G. Lenz (2013). "Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells." *BMC Cancer* **13**: 147.
- Filippi-Chiela, E. C., E. S. Villodre, L. L. Zamin and G. Lenz (2011). "Autophagy interplay with apoptosis and cell cycle regulation in the growth inhibiting effect of resveratrol in glioma cells." *PLoS One* **6**(6): e20849.
- Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." *J Cell Biol* **194**(1): 7-15.
- Fischer, V. W., A. Siddiqi and Y. Yusufaly (1990). "Altered angioarchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **79**(6): 672-679.
- Folin, M., S. Baiguera, M. Tommasini, D. Guidolin, M. T. Conconi, E. De Carlo, G. G. Nussdorfer and P. P. Parnigotto (2005). "Effects of beta-amyloid on rat neuromicrovascular endothelial cells cultured in vitro." *Int J Mol Med* **15**(6): 929-935.
- Folkers, K. (1996). "Relevance of the biosynthesis of coenzyme Q10 and of the four bases of DNA as a rationale for the molecular causes of cancer and a therapy." *Biochem Biophys Res Commun* **224**(2): 358-361.
- Folkers, K., J. Drzewoski, P. C. Richardson, J. Ellis, S. Shizukuishi and L. Baker (1981). "Bioenergetics in clinical medicine. XVI. Reduction of hypertension in patients by therapy with coenzyme Q10." *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **31**(1): 129-140.
- Folkins, C., Y. Shaked, S. Man, T. Tang, C. R. Lee, Z. Zhu, R. M. Hoffman and R. S. Kerbel (2009). "Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1." *Cancer Res* **69**(18): 7243-7251.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* **285**(21): 1182-1186.
- Fontaine, E., F. Ichas and P. Bernardi (1998). "A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore." *J Biol Chem* **273**(40): 25734-25740.
- Forsmark-Andree, P., G. Dallner and L. Ernster (1995). "Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles." *Free Radic Biol Med* **19**(6): 749-757.
- Forsmark, P., F. Aberg, B. Norling, K. Nordenbrand, G. Dallner and L. Ernster (1991). "Inhibition of lipid peroxidation by ubiquinol in submitochondrial particles in the absence of vitamin E." *FEBS Lett* **285**(1): 39-43.
- Fouad, M. A., A. M. Agha, M. M. Merzabani and S. A. Shouman (2013). "Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: calorie restriction is the force to the cytotoxicity." *Hum Exp Toxicol* **32**(10): 1067-1080.

- Fraga, C. G., M. K. Shigenaga, J. W. Park, P. Degan and B. N. Ames (1990). "Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4533-4537.
- Franco, M., P. Roswall, E. Cortez, D. Hanahan and K. Pietras (2011). "Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression." *Blood* **118**(10): 2906-2917.
- Franken, N. A., H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree (2006). "Clonogenic assay of cells in vitro." *Nat Protoc* **1**(5): 2315-2319.
- Frei, B., M. C. Kim and B. N. Ames (1990). "Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12): 4879-4883.
- Frei, B., R. Stocker and B. N. Ames (1988). "Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24): 9748-9752.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters." *J Biol Chem* **272**(30): 18515-18517.
- Friedmann-Morvinski, D., R. Narasimamurthy, Y. Xia, C. Myskiw, Y. Soda and I. M. Verma (2016). "Targeting NF-kappaB in glioblastoma: A therapeutic approach." *Sci Adv* **2**(1): e1501292.
- Fujiwara, S., K. Nakagawa, H. Harada, S. Nagato, K. Furukawa, M. Teraoka, T. Seno, K. Oka, S. Iwata and T. Ohnishi (2007). "Silencing hypoxia-inducible factor-1alpha inhibits cell migration and invasion under hypoxic environment in malignant gliomas." *Int J Oncol* **30**(4): 793-802.
- Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho and W. K. Cavenee (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." *Genes Dev* **21**(21): 2683-2710.
- Gao, L., Q. Mao, J. Cao, Y. Wang, X. Zhou and L. Fan (2012). "Effects of coenzyme Q10 on vascular endothelial function in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Atherosclerosis* **221**(2): 311-316.
- Garcia-Mesa, Y., J. C. Lopez-Ramos, L. Gimenez-Llort, S. Revilla, R. Guerra, A. Gruart, F. M. Laferla, R. Cristofol, J. M. Delgado-Garcia and C. Sanfeliu (2011). "Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice." *J Alzheimers Dis* **24**(3): 421-454.
- Garrido-Maraver, J., M. D. Cordero, M. Oropesa-Avila, A. Fernandez Vega, M. de la Mata, A. Delgado Pavon, M. de Miguel, C. Perez Calero, M. Villanueva Paz, D. Cotan and J. A. Sanchez-Alcazar (2014). "Coenzyme q10 therapy." *Mol Syndromol* **5**(3-4): 187-197.
- Gatenby, R. A. and R. J. Gillies (2004). "Why do cancers have high aerobic glycolysis?" *Nat Rev Cancer* **4**(11): 891-899.
- Genova, M. L. and G. Lenaz (2011). "New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria." *Biofactors* **37**(5): 330-354.

- Gharbi, S. I., M. J. Zvelebil, S. J. Shuttleworth, T. Hancox, N. Saghir, J. F. Timms and M. D. Waterfield (2007). "Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002." Biochem J **404**(1): 15-21.
- Gillies, R. J., I. Robey and R. A. Gatenby (2008). "Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers." J Nucl Med **49 Suppl 2**: 24S-42S.
- Gimenez-Llort, L., G. Blazquez, T. Canete, B. Johansson, S. Oddo, A. Tobena, F. M. LaFerla and A. Fernandez-Teruel (2007). "Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid." Neurosci Biobehav Rev **31**(1): 125-147.
- Gini, B., C. Zanca, D. Guo, T. Matsutani, K. Masui, S. Ikegami, H. Yang, D. Nathanson, G. R. Villa, D. Shackelford, S. Zhu, K. Tanaka, I. Babic, D. Akhavan, K. Lin, A. Assuncao, Y. Gu, B. Bonetti, D. S. Mortensen, S. Xu, H. K. Raymon, W. K. Cavenee, F. B. Furnari, C. D. James, G. Kroemer, J. R. Heath, K. Hege, R. Chopra, T. F. Cloughesy and P. S. Mischel (2013). "The mTOR kinase inhibitors, CC214-1 and CC214-2, preferentially block the growth of EGFRvIII-activated glioblastomas." Clin Cancer Res **19**(20): 5722-5732.
- Girao da Cruz, M. T., J. Jordao, K. A. Dasilva, C. A. Ayala-Grosso, A. Ypsilanti, Y. Q. Weng, F. M. Laferla, J. McLaurin and I. Aubert (2012). "Early increases in soluble amyloid-beta levels coincide with cholinergic degeneration in 3xTg-AD mice." J Alzheimers Dis **32**(2): 267-272.
- Girouard, H. and C. Iadecola (2006). "Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease." J Appl Physiol (1985) **100**(1): 328-335.
- Giuliani, D., A. Bitto, M. Galantucci, D. Zaffe, A. Ottani, N. Irrera, L. Neri, G. M. Cavallini, D. Altavilla, A. R. Botticelli, F. Squadrito and S. Guarini (2014). "Melanocortins protect against progression of Alzheimer's disease in triple-transgenic mice by targeting multiple pathophysiological pathways." Neurobiol Aging **35**(3): 537-547.
- Giuliani, D., A. Ottani, D. Zaffe, M. Galantucci, F. Strinati, R. Lodi and S. Guarini (2013). "Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms." Neurobiol Learn Mem **104**: 82-91.
- Goder, A., G. Nagel, A. Kraus, B. Dorsam, N. Seiwert, B. Kaina and J. Fahrner (2015). "Lipoic acid inhibits the DNA repair protein O 6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and triggers its depletion in colorectal cancer cells with concomitant autophagy induction." Carcinogenesis **36**(8): 817-831.
- Golbidi, S., S. A. Ebadi and I. Laher (2011). "Antioxidants in the treatment of diabetes." Curr Diabetes Rev **7**(2): 106-125.
- Gonzalez-Marrero, I., L. Gimenez-Llort, C. E. Johanson, E. M. Carmona-Calero, L. Castaneyra-Ruiz, J. M. Brito-Armas, A. Castaneyra-Perdomo and R. Castro-Fuentes (2015). "Choroid plexus dysfunction impairs beta-amyloid clearance in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Front Cell Neurosci **9**: 17.

- Gorman, S., M. Tosetto, F. Lyng, O. Howe, K. Sheahan, D. O'Donoghue, J. Hyland, H. Mulcahy and J. O'Sullivan (2009). "Radiation and chemotherapy bystander effects induce early genomic instability events: telomere shortening and bridge formation coupled with mitochondrial dysfunction." Mutat Res **669**(1-2): 131-138.
- Gorrini, C., I. S. Harris and T. W. Mak (2013). "Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy." Nat Rev Drug Discov **12**(12): 931-947.
- Gottlieb, E. and I. P. Tomlinson (2005). "Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update." Nat Rev Cancer **5**(11): 857-866.
- Grammas, P. (2011). "Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." J Neuroinflammation **8**: 26.
- Grek, C. L. and K. D. Tew (2010). "Redox metabolism and malignancy." Curr Opin Pharmacol **10**(4): 362-368.
- Griguer, C. E. and C. R. Oliva (2011). "Bioenergetics pathways and therapeutic resistance in gliomas: emerging role of mitochondria." Curr Pharm Des **17**(23): 2421-2427.
- Grombacher, T., U. Eichhorn and B. Kaina (1998). "p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents." Oncogene **17**(7): 845-851.
- Groneberg, D. A., B. Kindermann, M. Althammer, M. Klapper, J. Vormann, G. P. Littarru and F. Doring (2005). "Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells." Int J Biochem Cell Biol **37**(6): 1208-1218.
- Groussard, C., I. Morel, M. Chevanne, M. Monnier, J. Cillard and A. Delamarche (2000). "Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study." J Appl Physiol (1985) **89**(1): 169-175.
- Gunther, W., E. Pawlak, R. Damasceno, H. Arnold and A. J. Terzis (2003). "Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids." Br J Cancer **88**(3): 463-469.
- Haass, C., A. Y. Hung, M. G. Schlossmacher, D. B. Teplow and D. J. Selkoe (1993). "beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms." J Biol Chem **268**(5): 3021-3024.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran and S. Sisodia (2012). "Trafficking and proteolytic processing of APP." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(5): a006270.
- Hadjipanayis, C. G. and E. G. Van Meir (2009). "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies." Trends Mol Med **15**(11): 519-530.
- Hadjipanayis, C. G. and E. G. Van Meir (2009). "Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy." J Mol Med (Berl) **87**(4): 363-374.
- Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." Br J Exp Pathol **70**(6): 737-757.
- Halliwell, B. (1992). "Reactive oxygen species and the central nervous system." J Neurochem **59**(5): 1609-1623.

- Halliwell, B. (1997). "Antioxidants and human disease: a general introduction." *Nutr Rev* **55**(1 Pt 2): S44-49; discussion S49-52.
- Hamilton, S. J., G. T. Chew and G. F. Watts (2009). "Coenzyme Q10 improves endothelial dysfunction in statin-treated type 2 diabetic patients." *Diabetes Care* **32**(5): 810-812.
- Han, G., L. Wang, R. Zhao, Z. Yue, X. Zhou, X. Hu, Y. Cao, D. Dai and J. Liu (2012). "Leptin promotes human glioblastoma growth through activating Signal Transducers and Activators of Transcription 3 signaling." *Brain Res Bull* **87**(2-3): 274-279.
- Han, G., L. Wang, W. Zhao, Z. Yue, R. Zhao, Y. Li, X. Zhou, X. Hu and J. Liu (2013). "High expression of leptin receptor leads to temozolomide resistance with exhibiting stem/progenitor cell features in glioblastoma." *Cell Cycle* **12**(24): 3833-3840.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Handy, D. E. and J. Loscalzo (2012). "Redox regulation of mitochondrial function." *Antioxid Redox Signal* **16**(11): 1323-1367.
- Hansson Petersen, C. A., N. Alikhani, H. Behbahani, B. Wiehager, P. F. Pavlov, I. Alafuzoff, V. Leinonen, A. Ito, B. Winblad, E. Glaser and M. Ankarcrona (2008). "The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13145-13150.
- Hardas, S. S., R. Sultana, A. M. Clark, T. L. Beckett, L. I. Szewda, M. P. Murphy and D. A. Butterfield (2013). "Oxidative modification of lipoic acid by HNE in Alzheimer disease brain." *Redox Biol* **1**: 80-85.
- Hardee, M. E. and D. Zagzag (2012). "Mechanisms of glioma-associated neovascularization." *Am J Pathol* **181**(4): 1126-1141.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 774-785.
- Hardie, D. G., F. A. Ross and S. A. Hawley (2012). "AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern." *Chem Biol* **19**(10): 1222-1236.
- Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." *Science* **297**(5580): 353-356.
- Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* **256**(5054): 184-185.
- Hargreaves, I., Ed. (2015). *Coenzyme Q10. From Fact to Fiction*. Pharmacology- Research, Safety testing and Regulation. New York, Nova Biomedical.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-460.
- Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." *Nat Rev Cancer* **2**(1): 38-47.
- Harrison, F. E., A. H. Hosseini, M. P. McDonald and J. M. May (2009). "Vitamin C reduces spatial learning deficits in middle-aged and very old APP/PSEN1 transgenic and wild-type mice." *Pharmacol Biochem Behav* **93**(4): 443-450.

- Hathcock, J. N. and A. Shao (2006). "Risk assessment for coenzyme Q10 (Ubiquinone)." Regul Toxicol Pharmacol **45**(3): 282-288.
- Hayden, K. M., P. P. Zandi, C. G. Lyketsos, A. S. Khachaturian, L. A. Bastian, G. Charoonruk, J. T. Tschanz, M. C. Norton, C. F. Pieper, R. G. Munger, J. C. Breitner, K. A. Welsh-Bohmer and I. Cache County (2006). "Vascular risk factors for incident Alzheimer disease and vascular dementia: the Cache County study." Alzheimer Dis Assoc Disord **20**(2): 93-100.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- Hegi, M. E., A. C. Diserens, T. Gorlia, M. F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer and R. Stupp (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
- Hendricks, J. (2007). "Stereology for biological research with a focus on Neuroscience." MBF Press **185**.
- Hermisson, M., A. Klumpp, W. Wick, J. Wischhusen, G. Nagel, W. Roos, B. Kaina and M. Weller (2006). "O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells." J Neurochem **96**(3): 766-776.
- Hielscher, A. and S. Gerecht (2015). "Hypoxia and free radicals: role in tumor progression and the use of engineering-based platforms to address these relationships." Free Radic Biol Med **79**: 281-291.
- Hirai, K., G. Aliev, A. Nunomura, H. Fujioka, R. L. Russell, C. S. Atwood, A. B. Johnson, Y. Kress, H. V. Vinters, M. Tabaton, S. Shimohama, A. D. Cash, S. L. Siedlak, P. L. Harris, P. K. Jones, R. B. Petersen, G. Perry and M. A. Smith (2001). "Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease." J Neurosci **21**(9): 3017-3023.
- Hirata-Fukae, C., H. F. Li, H. S. Hoe, A. J. Gray, S. S. Minami, K. Hamada, T. Niikura, F. Hua, H. Tsukagoshi-Nagai, Y. Horikoshi-Sakuraba, M. Mughal, G. W. Rebeck, F. M. LaFerla, M. P. Mattson, N. Iwata, T. C. Saido, W. L. Klein, K. E. Duff, P. S. Aisen and Y. Matsuoka (2008). "Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model." Brain Res **1216**: 92-103.
- Hirose, Y., M. S. Berger and R. O. Pieper (2001). "p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells." Cancer Res **61**(5): 1957-1963.
- Hirschhaeuser, F., U. G. Sattler and W. Mueller-Klieser (2011). "Lactate: a metabolic key player in cancer." Cancer Res **71**(22): 6921-6925.
- Hohsfield, L. A., N. Daschil, G. Oradd, I. Stromberg and C. Humpel (2014). "Vascular pathology of 20-month-old hypercholesterolemia mice in comparison to triple-transgenic and APPSwDI Alzheimer's disease mouse models." Mol Cell Neurosci **63**: 83-95.
- Holash, J., P. C. Maisonpierre, D. Compton, P. Boland, C. R. Alexander, D. Zagzag, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (1999). "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." Science **284**(5422): 1994-1998.

- Holland, E. C., J. Celestino, C. Dai, L. Schaefer, R. E. Sawaya and G. N. Fuller (2000). "Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice." *Nat Genet* **25**(1): 55-57.
- Horak, P., A. R. Crawford, D. D. Vadysirisack, Z. M. Nash, M. P. DeYoung, D. Sgroi and L. W. Ellisen (2010). "Negative feedback control of HIF-1 through REDD1-regulated ROS suppresses tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(10): 4675-4680.
- Hornebeck, W., E. Lambert, E. Petitfrere and P. Bernard (2005). "Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression." *Biochimie* **87**(3-4): 377-383.
- Hosoe, K., M. Kitano, H. Kishida, H. Kubo, K. Fujii and M. Kitahara (2007). "Study on safety and bioavailability of ubiquinol (Kaneka QH) after single and 4-week multiple oral administration to healthy volunteers." *Regul Toxicol Pharmacol* **47**(1): 19-28.
- Huang, C. K., C. Y. Yang, Y. M. Jeng, C. L. Chen, H. H. Wu, Y. C. Chang, C. Ma, W. H. Kuo, K. J. Chang, J. Y. Shew and W. H. Lee (2014). "Autocrine/paracrine mechanism of interleukin-17B receptor promotes breast tumorigenesis through NF-kappaB-mediated antiapoptotic pathway." *Oncogene* **33**(23): 2968-2977.
- Huang, H., L. Fletcher, N. Beeharry, R. Daniel, G. Kao, T. J. Yen and R. J. Muschel (2008). "Abnormal cytokinesis after X-irradiation in tumor cells that override the G2 DNA damage checkpoint." *Cancer Res* **68**(10): 3724-3732.
- Huang, H., H. Lin, X. Zhang and J. Li (2012). "Resveratrol reverses temozolomide resistance by downregulation of MGMT in T98G glioblastoma cells by the NF-kappaB-dependent pathway." *Oncol Rep* **27**(6): 2050-2056.
- Huang, L., B. Li, W. Li, H. Guo and F. Zou (2009). "ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity." *Carcinogenesis* **30**(5): 737-744.
- Huse, J. T., H. S. Phillips and C. W. Brennan (2011). "Molecular subclassification of diffuse gliomas: seeing order in the chaos." *Glia* **59**(8): 1190-1199.
- Hwang, Y. S., M. Jeong, J. S. Park, M. H. Kim, D. B. Lee, B. A. Shin, N. Mukaida, L. M. Ellis, H. R. Kim, B. W. Ahn and Y. D. Jung (2004). "Interleukin-1beta stimulates IL-8 expression through MAP kinase and ROS signaling in human gastric carcinoma cells." *Oncogene* **23**(39): 6603-6611.
- Hyman, B. T. and T. Gomez-Isla (1997). "The natural history of Alzheimer neurofibrillary tangles and amyloid deposits." *Neurobiol Aging* **18**(4): 386-387; discussion 389-392.
- Hyun, D. H., M. R. Mughal, H. Yang, J. H. Lee, E. J. Ko, N. D. Hunt, R. de Cabo and M. P. Mattson (2010). "The plasma membrane redox system is impaired by amyloid beta-peptide and in the hippocampus and cerebral cortex of 3xTgAD mice." *Exp Neurol* **225**(2): 423-429.
- Iadecola, C. (2004). "Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **5**(5): 347-360.
- Iadecola, C., F. Zhang, K. Niwa, C. Eckman, S. K. Turner, E. Fischer, S. Younkin, D. R. Borchelt, K. K. Hsiao and G. A. Carlson (1999). "SOD1 rescues cerebral endothelial

- dysfunction in mice overexpressing amyloid precursor protein." Nat Neurosci **2**(2): 157-161.
- Iida, T., M. Iwahashi, M. Katsuda, K. Ishida, M. Nakamori, M. Nakamura, T. Naka, T. Ojima, K. Ueda, K. Hayata, Y. Nakamura and H. Yamaue (2011). "Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer." Oncol Rep **25**(5): 1271-1277.
- Ischiropoulos, H. and J. S. Beckman (2003). "Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?" J Clin Invest **111**(2): 163-169.
- Ishikawa, K., K. Takenaga, M. Akimoto, N. Koshikawa, A. Yamaguchi, H. Imanishi, K. Nakada, Y. Honma and J. Hayashi (2008). "ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis." Science **320**(5876): 661-664.
- Isobe, C., T. Abe and Y. Terayama (2009). "Increase in the oxidized/total coenzyme Q-10 ratio in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients." Dement Geriatr Cogn Disord **28**(5): 449-454.
- Ito, K., N. Miwa, K. Hagiwara, T. Yano, K. Shimizu-Saito, N. Goseki, T. Iwai and S. Horikawa (1999). "Regulation of methionine adenosyltransferase activity by the glutathione level in rat liver during ischemia-reperfusion." Surg Today **29**(10): 1053-1058.
- Jakubowicz-Gil, J., E. Langner, D. Badziul, I. Wertel and W. Rzeski (2013). "Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment." Tumour Biol **34**(4): 2367-2378.
- Jamal, M., B. H. Rath, E. S. Williams, K. Camphausen and P. J. Tofilon (2010). "Microenvironmental regulation of glioblastoma radioresponse." Clin Cancer Res **16**(24): 6049-6059.
- Jang, T., J. M. Calaoagan, E. Kwon, S. Samuelsson, L. Recht and K. R. Laderoute (2011). "5'-AMP-activated protein kinase activity is elevated early during primary brain tumor development in the rat." Int J Cancer **128**(9): 2230-2239.
- Janolino, V. G. and H. E. Swaisgood (1975). "Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk." J Biol Chem **250**(7): 2532-2538.
- Janssen-Heininger, Y. M., B. T. Mossman, N. H. Heintz, H. J. Forman, B. Kalyanaraman, T. Finkel, J. S. Stamler, S. G. Rhee and A. van der Vliet (2008). "Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises." Free Radic Biol Med **45**(1): 1-17.
- Jantaratnotai, N., H. B. Choi and J. G. McLarnon (2009). "ATP stimulates chemokine production via a store-operated calcium entry pathway in C6 glioma cells." BMC Cancer **9**: 442.
- Jarrett, J. T., E. P. Berger and P. T. Lansbury, Jr. (1993). "The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Biochemistry **32**(18): 4693-4697.
- Jensen, R. L. (2009). "Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target." J Neurooncol **92**(3): 317-335.
- Jiang, H., L. Zhang, J. Kuo, K. Kuo, S. C. Gautam, L. Groc, A. I. Rodriguez, D. Koubi, T. J. Hunter, G. B. Corcoran, M. D. Seidman and R. A. Levine (2005). "Resveratrol-

- induced apoptotic death in human U251 glioma cells." Mol Cancer Ther **4**(4): 554-561.
- Jiao, Y., H. Li, Y. Liu, A. Guo, X. Xu, X. Qu, S. Wang, J. Zhao, Y. Li and Y. Cao (2015). "Resveratrol Inhibits the Invasion of Glioblastoma-Initiating Cells via Down-Regulation of the PI3K/Akt/NF-kappaB Signaling Pathway." Nutrients **7**(6): 4383-4402.
- Johannessen, T. C. and R. Bjerkvig (2012). "Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme." Expert Rev Anticancer Ther **12**(5): 635-642.
- Jolliet, P., N. Simon, J. Barre, J. Y. Pons, M. Boukef, B. J. Paniel and J. P. Tillement (1998). "Plasma coenzyme Q10 concentrations in breast cancer: prognosis and therapeutic consequences." Int J Clin Pharmacol Ther **36**(9): 506-509.
- Jones, D. P. (2006). "Redefining oxidative stress." Antioxid Redox Signal **8**(9-10): 1865-1879.
- Julien, C., C. Tremblay, V. Emond, M. Lebbadi, N. Salem, Jr., D. A. Bennett and F. Calon (2009). "Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **68**(1): 48-58.
- Jung, C. H., S. H. Ro, J. Cao, N. M. Otto and D. H. Kim (2010). "mTOR regulation of autophagy." FEBS Lett **584**(7): 1287-1295.
- Jung, H. J., E. H. Park and C. J. Lim (2009). "Evaluation of anti-angiogenic, anti-inflammatory and antinociceptive activity of coenzyme Q(10) in experimental animals." J Pharm Pharmacol **61**(10): 1391-1395.
- Kalaria, R. N. and P. Hedera (1995). "Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease." Neuroreport **6**(3): 477-480.
- Kalaria, R. N. and A. B. Pax (1995). "Increased collagen content of cerebral microvessels in Alzheimer's disease." Brain Res **705**(1-2): 349-352.
- Kandimalla, K. K., O. G. Scott, S. Fulzele, M. W. Davidson and J. F. Poduslo (2009). "Mechanism of neuronal versus endothelial cell uptake of Alzheimer's disease amyloid beta protein." PLoS One **4**(2): e4627.
- Kaneda, H., T. Arao, K. Matsumoto, M. A. De Velasco, D. Tamura, K. Aomatsu, K. Kudo, K. Sakai, T. Nagai, Y. Fujita, K. Tanaka, K. Yanagihara, Y. Yamada, I. Okamoto, K. Nakagawa and K. Nishio (2011). "Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer." Br J Cancer **105**(8): 1210-1217.
- Kanninen, K., T. M. Malm, H. K. Jyrkkanen, G. Goldsteins, V. Keksa-Goldsteine, H. Tanila, M. Yamamoto, S. Yla-Herttuala, A. L. Levenonen and J. Koistinaho (2008). "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid." Mol Cell Neurosci **39**(3): 302-313.
- Kanzawa, T., I. M. Germano, T. Komata, H. Ito, Y. Kondo and S. Kondo (2004). "Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells." Cell Death Differ **11**(4): 448-457.
- Kato, Y., S. Ozawa, M. Tsukuda, E. Kubota, K. Miyazaki, Y. St-Pierre and R. Hata (2007). "Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D

- activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma." FEBS J **274**(12): 3171-3183.
- Kawahara, M. (2010). "Neurotoxicity of beta-amyloid protein: oligomerization, channel formation, and calcium dyshomeostasis." Curr Pharm Des **16**(25): 2779-2789.
- Kawai, M., R. N. Kalaria, S. I. Harik and G. Perry (1990). "The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease." Am J Pathol **137**(6): 1435-1446.
- Kehlen, A., K. Thiele, D. Riemann, N. Rainov and J. Langner (1999). "Interleukin-17 stimulates the expression of IkappaB alpha mRNA and the secretion of IL-6 and IL-8 in glioblastoma cell lines." J Neuroimmunol **101**(1): 1-6.
- Kelleher, R. J. and R. L. Soiza (2013). "Evidence of endothelial dysfunction in the development of Alzheimer's disease: Is Alzheimer's a vascular disorder?" Am J Cardiovasc Dis **3**(4): 197-226.
- Kelly, T., Y. Yan, R. L. Osborne, A. B. Athota, T. L. Rozypal, J. C. Colclasure and W. S. Chu (1998). "Proteolysis of extracellular matrix by invadopodia facilitates human breast cancer cell invasion and is mediated by matrix metalloproteinases." Clin Exp Metastasis **16**(6): 501-512.
- Kerr, D. S. (2010). "Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade." Mol Genet Metab **99**(3): 246-255.
- Kim, D., S. Kim, H. Koh, S. O. Yoon, A. S. Chung, K. S. Cho and J. Chung (2001). "Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production." FASEB J **15**(11): 1953-1962.
- Kim, Y. (2013). "Regulation of cell proliferation and migration in glioblastoma: new therapeutic approach." Front Oncol **3**: 53.
- Kimbrough, I. F., S. Robel, E. D. Roberson and H. Sontheimer (2015). "Vascular amyloidosis impairs the gliovascular unit in a mouse model of Alzheimer's disease." Brain **138**(Pt 12): 3716-3733.
- Kimmelman, A. C. (2011). "The dynamic nature of autophagy in cancer." Genes Dev **25**(19): 1999-2010.
- King, G. D., J. F. Curtin, M. Candolfi, K. Kroeger, P. R. Lowenstein and M. G. Castro (2005). "Gene therapy and targeted toxins for glioma." Curr Gene Ther **5**(6): 535-557.
- Kirkwood, T. B. and S. N. Austad (2000). "Why do we age?" Nature **408**(6809): 233-238.
- Kitagawa, K., Y. Yagita, T. Sasaki, S. Sugiura, E. Omura-Matsuoka, T. Mabuchi, K. Matsushita and M. Hori (2005). "Chronic mild reduction of cerebral perfusion pressure induces ischemic tolerance in focal cerebral ischemia." Stroke **36**(10): 2270-2274.
- Kleihues, P., K. J. Zulch, S. Matsumoto and U. Radke (1970). "Morphology of malignant gliomas induced in rabbits by systemic application of N-methyl-N-nitrosourea." J Neurool **198**(1): 65-78.
- Klotz, L. O., C. Sanchez-Ramos, I. Prieto-Arroyo, P. Urbanek, H. Steinbrenner and M. Monsalve (2015). "Redox regulation of FoxO transcription factors." Redox Biol **6**: 51-72.

- Knizhnik, A. V., W. P. Roos, T. Nikolova, S. Quiros, K. H. Tomaszowski, M. Christmann and B. Kaina (2013). "Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage." *PLoS One* **8**(1): e55665.
- Kohsaka, S., K. Takahashi, L. Wang, M. Tanino, T. Kimura, H. Nishihara and S. Tanaka (2013). "Inhibition of GSH synthesis potentiates temozolomide-induced bystander effect in glioblastoma." *Cancer Lett* **331**(1): 68-75.
- Koike, M. A., K. N. Green, M. Blurton-Jones and F. M. Laferla (2010). "Oligemic hypoperfusion differentially affects tau and amyloid- β ." *Am J Pathol* **177**(1): 300-310.
- Kook, S. Y., K. M. Lee, Y. Kim, M. Y. Cha, S. Kang, S. H. Baik, H. Lee, R. Park and I. Mook-Jung (2014). "High-dose of vitamin C supplementation reduces amyloid plaque burden and ameliorates pathological changes in the brain of 5XFAD mice." *Cell Death Dis* **5**: e1083.
- Koroshetz, W. J., B. G. Jenkins, B. R. Rosen and M. F. Beal (1997). "Energy metabolism defects in Huntington's disease and effects of coenzyme Q10." *Ann Neurol* **41**(2): 160-165.
- Koshikawa, N., J. Hayashi, A. Nakagawara and K. Takenaga (2009). "Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α gene transcription via phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway." *J Biol Chem* **284**(48): 33185-33194.
- Koukourakis, M. I., A. Giatromanolaki, A. L. Harris and E. Sivridis (2006). "Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma." *Cancer Res* **66**(2): 632-637.
- Koul, D., R. Parthasarathy, R. Shen, M. A. Davies, S. A. Jasser, S. K. Chintala, J. S. Rao, Y. Sun, E. N. Benveniste, T. J. Liu and W. K. Yung (2001). "Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN." *Oncogene* **20**(46): 6669-6678.
- Kovacic, P. and J. D. Jacintho (2001). "Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer." *Curr Med Chem* **8**(7): 773-796.
- Kreisman, N. R., S. Soliman and D. Gozal (2000). "Regional differences in hypoxic depolarization and swelling in hippocampal slices." *J Neurophysiol* **83**(2): 1031-1038.
- Krishnamachary, B., S. Berg-Dixon, B. Kelly, F. Agani, D. Feldser, G. Ferreira, N. Iyer, J. LaRusch, B. Pak, P. Taghavi and G. L. Semenza (2003). "Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1." *Cancer Res* **63**(5): 1138-1143.
- Kubiawski, T., T. Jang, M. B. Lachyankar, R. Salmonsén, R. R. Nabi, P. J. Quesenberry, N. S. Litofsky, A. H. Ross and L. D. Recht (2001). "Association of increased phosphatidylinositol 3-kinase signaling with increased invasiveness and gelatinase activity in malignant gliomas." *J Neurosurg* **95**(3): 480-488.

- Kudo, H., T. Kokunai, T. Kondoh, N. Tamaki and S. Matsumoto (1990). "Quantitative analysis of glutathione in rat central nervous system: comparison of GSH in infant brain with that in adult brain." Brain Res **511**(2): 326-328.
- Kussmaul, L. and J. Hirst (2006). "The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(20): 7607-7612.
- LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.
- Langsjoen, P. H. (2000). "Lack of effect of coenzyme Q on left ventricular function in patients with congestive heart failure." J Am Coll Cardiol **35**(3): 816-817.
- Langsjoen, P. H. and A. M. Langsjoen (2013). "Comparison Study of Plasma Coenzyme Q10 Levels in Healthy Subjects Supplemented With Ubiquinol Versus Ubiquinone." Clinical Pharmacology in Drug Development **3**(1): 4.
- Laperriere, N., L. Zuraw, G. Cairncross and G. Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site (2002). "Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review." Radiother Oncol **64**(3): 259-273.
- Laredj, L. N., F. Licitra and H. M. Puccio (2014). "The molecular genetics of coenzyme Q biosynthesis in health and disease." Biochimie **100**: 78-87.
- Lathrop, A. E. and L. Loeb (1916). "Further investigations on the origin of tumors in mice. III. On the part played by internal secretion in the spontaneous development of tumors." J Cancer Res **1**(1): 1-19.
- Laurijssens, B., F. Aujard and A. Rahman (2013). "Animal models of Alzheimer's disease and drug development." Drug Discov Today Technol **10**(3): e319-327.
- Lee, C. S., E. Y. Choi, S. C. Lee, H. J. Koh, J. H. Lee and J. H. Chung (2015). "Resveratrol Inhibits Hypoxia-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Pathological Neovascularization." Yonsei Med J **56**(6): 1678-1685.
- Lee, H. C., D. W. Kim, K. Y. Jung, I. C. Park, M. J. Park, M. S. Kim, S. H. Woo, C. H. Rhee, H. Yoo, S. H. Lee and S. I. Hong (2004). "Increased expression of antioxidant enzymes in radioresistant variant from U251 human glioblastoma cell line." Int J Mol Med **13**(6): 883-887.
- Lee, J., J. H. Boo and H. Ryu (2009). "The failure of mitochondria leads to neurodegeneration: Do mitochondria need a jump start?" Adv Drug Deliv Rev **61**(14): 1316-1323.
- Lee, K. H. and J. R. Kim (2009). "Reactive oxygen species regulate the generation of urokinase plasminogen activator in human hepatoma cells via MAPK pathways after treatment with hepatocyte growth factor." Exp Mol Med **41**(3): 180-188.
- Lee, Y. J., I. S. Park, Y. J. Lee, J. H. Shim, M. K. Cho, H. S. Nam, J. W. Park, M. H. Oh and S. H. Lee (2014). "Resveratrol contributes to chemosensitivity of malignant mesothelioma cells with activation of p53." Food Chem Toxicol **63**: 153-160.
- Lei, J., X. Huo, W. Duan, Q. Xu, R. Li, J. Ma, X. Li, L. Han, W. Li, H. Sun, E. Wu and Q. Ma (2014). "alpha-Mangostin inhibits hypoxia-driven ROS-induced PSC activation and pancreatic cancer cell invasion." Cancer Lett **347**(1): 129-138.

- Levine, A. J. and A. M. Puzio-Kuter (2010). "The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes." *Science* **330**(6009): 1340-1344.
- Li, G., C. R. Jack, X. F. Yang and E. S. Yang (2008). "Diet supplement CoQ10 delays brain atrophy in aged transgenic mice with mutations in the amyloid precursor protein: an in vivo volume MRI study." *Biofactors* **32**(1-4): 169-178.
- Li, G., L. Y. Zou, C. M. Cao and E. S. Yang (2005). "Coenzyme Q10 protects SHSY5Y neuronal cells from beta amyloid toxicity and oxygen-glucose deprivation by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore." *Biofactors* **25**(1-4): 97-107.
- Li, H., Y. Liu, Y. Jiao, A. Guo, X. Xu, X. Qu, S. Wang, J. Zhao, Y. Li and Y. Cao (2016). "Resveratrol sensitizes glioblastoma-initiating cells to temozolomide by inducing cell apoptosis and promoting differentiation." *Oncol Rep* **35**(1): 343-351.
- Li, J. M. and A. M. Shah (2004). "Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**(5): R1014-1030.
- Li, S., T. Jiang, G. Li and Z. Wang (2008). "Impact of p53 status to response of temozolomide in low MGMT expression glioblastomas: preliminary results." *Neurol Res* **30**(6): 567-570.
- Li, W., L. Cao, X. Chen, J. Lei and Q. Ma (2015). "Resveratrol inhibits hypoxia-driven ROS-induced invasive and migratory ability of pancreatic cancer cells via suppression of the Hedgehog signaling pathway." *Oncol Rep*.
- Li, W. and M. B. Graeber (2012). "The molecular profile of microglia under the influence of glioma." *Neuro Oncol* **14**(8): 958-978.
- Li, W., J. Ma, Q. Ma, B. Li, L. Han, J. Liu, Q. Xu, W. Duan, S. Yu, F. Wang and E. Wu (2013). "Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-kappaB pathway." *Curr Med Chem* **20**(33): 4185-4194.
- Li, Y., Y. Li, P. Ge and C. Ma (2016). "MiR-126 Regulates the ERK Pathway via Targeting KRAS to Inhibit the Glioma Cell Proliferation and Invasion." *Mol Neurobiol*.
- Li, Y., P. Zhang, F. Qiu, L. Chen, C. Miao, J. Li, W. Xiao and E. Ma (2012). "Inactivation of PI3K/Akt signaling mediates proliferation inhibition and G2/M phase arrest induced by andrographolide in human glioblastoma cells." *Life Sci* **90**(25-26): 962-967.
- Li, Z., Y. Xu, C. Zhang, X. Liu, L. Jiang and F. Chen (2014). "Mammalian diaphanous-related formin 1 is required for motility and invadopodia formation in human U87 glioblastoma cells." *Int J Mol Med* **33**(2): 383-391.
- Liao, S., J. Xia, Z. Chen, S. Zhang, A. Ahmad, L. Miele, F. H. Sarkar and Z. Wang (2011). "Inhibitory effect of curcumin on oral carcinoma CAL-27 cells via suppression of Notch-1 and NF-kappaB signaling pathways." *J Cell Biochem* **112**(4): 1055-1065.
- Lim, S. C., R. Lekshminarayanan, S. K. Goh, Y. Y. Ong, T. Subramaniam, C. F. Sum, C. N. Ong and B. L. Lee (2008). "The effect of coenzyme Q10 on microcirculatory endothelial function of subjects with type 2 diabetes mellitus." *Atherosclerosis* **196**(2): 966-969.

- Lin, C. J., C. C. Lee, Y. L. Shih, T. Y. Lin, S. H. Wang, Y. F. Lin and C. M. Shih (2012). "Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy." Free Radic Biol Med **52**(2): 377-391.
- Lissoni, P., S. Meregalli, L. Nosetto, S. Barni, G. Tancini, V. Fossati and G. Maestroni (1996). "Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone." Oncology **53**(1): 43-46.
- Liu, Q., G. Li, R. Li, J. Shen, Q. He, L. Deng, C. Zhang and J. Zhang (2010). "IL-6 promotion of glioblastoma cell invasion and angiogenesis in U251 and T98G cell lines." J Neurooncol **100**(2): 165-176.
- Liu, X., L. Wang, J. Chen, Q. Ling, H. Wang, S. Li, L. Li, S. Yang, M. Xia and L. Jing (2015). "Estrogen receptor beta agonist enhances temozolomide sensitivity of glioma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway." Mol Med Rep **11**(2): 1516-1522.
- Liu, Y., J. B. Morgan, V. Coothankandaswamy, R. Liu, M. B. Jekabsons, F. Mahdi, D. G. Nagle and Y. D. Zhou (2009). "The Caulerpa pigment caulerpin inhibits HIF-1 activation and mitochondrial respiration." J Nat Prod **72**(12): 2104-2109.
- Liu, Y. and D. R. Schubert (2009). "The specificity of neuroprotection by antioxidants." J Biomed Sci **16**: 98.
- Lockwood, K., S. Moesgaard, T. Yamamoto and K. Folkers (1995). "Progress on therapy of breast cancer with vitamin Q10 and the regression of metastases." Biochem Biophys Res Commun **212**(1): 172-177.
- Lonnrot, K., P. Holm, A. Lagerstedt, H. Huhtala and H. Alho (1998). "The effects of lifelong ubiquinone Q10 supplementation on the Q9 and Q10 tissue concentrations and life span of male rats and mice." Biochem Mol Biol Int **44**(4): 727-737.
- Lonnrot, K., T. Metsa-Ketela, G. Molnar, J. P. Ahonen, M. Latvala, J. Peltola, T. Pietila and H. Alho (1996). "The effect of ascorbate and ubiquinone supplementation on plasma and CSF total antioxidant capacity." Free Radic Biol Med **21**(2): 211-217.
- Loomans, H. A. and C. D. Andl (2014). "Intertwining of Activin A and TGFbeta Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion." Cancers (Basel) **7**(1): 70-91.
- Lopez-Lluch, G., J. C. Rodriguez-Aguilera, C. Santos-Ocana and P. Navas (2010). "Is coenzyme Q a key factor in aging?" Mech Ageing Dev **131**(4): 225-235.
- Loreck, D. J., J. Galarraga, J. Van der Feen, J. M. Phang, B. H. Smith and C. J. Cummins (1987). "Regulation of the pentose phosphate pathway in human astrocytes and gliomas." Metab Brain Dis **2**(1): 31-46.
- Lorger, M. (2012). "Tumor microenvironment in the brain." Cancers (Basel) **4**(1): 218-243.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvett, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2007). "Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease." Nucleic Acids Res **35**(22): 7497-7504.

- Lovell, M. A., C. Xie and W. R. Markesbery (2001). "Acrolein is increased in Alzheimer's disease brain and is toxic to primary hippocampal cultures." Neurobiol Aging **22**(2): 187-194.
- Lu, H., R. A. Forbes and A. Verma (2002). "Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis." J Biol Chem **277**(26): 23111-23115.
- Lu, K. V. and G. Bergers (2013). "Mechanisms of evasive resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma." CNS Oncol **2**(1): 49-65.
- Lucio-Eterovic, A. K., Y. Piao and J. F. de Groot (2009). "Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy." Clin Cancer Res **15**(14): 4589-4599.
- Lum, H. and K. A. Roebuck (2001). "Oxidant stress and endothelial cell dysfunction." Am J Physiol Cell Physiol **280**(4): C719-741.
- Luo, J., S. Li, X. Qin, Q. Peng, Y. Liu, S. Yang, X. Qin, Y. Xiong and Z. Zeng (2016). "Association of the NQO1 C609T polymorphism with Alzheimer's disease in Chinese populations: a meta-analysis." Int J Neurosci **126**(3): 199-204.
- Lushchak, V. I. (2012). "Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions." J Amino Acids **2012**: 736837.
- Lushchak, V. I. (2014). "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification." Chem Biol Interact **224C**: 164-175.
- Machesky, L. M. (2008). "Lamellipodia and filopodia in metastasis and invasion." FEBS Lett **582**(14): 2102-2111.
- Madeo, J. and C. Elsayad (2013). "The Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis Parkinsonism **3**(116).
- Mae, T., Sakamoto, Y., Morikawa, S., Hidaka, T., (2001). Pharmaceutical composition comprising coenzyme Q10. US Patent. U. Patent. United States. **6,184,255**.
- Maher, E. A., F. B. Furnari, R. M. Bachoo, D. H. Rowitch, D. N. Louis, W. K. Cavenee and R. A. DePinho (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." Genes Dev **15**(11): 1311-1333.
- Mallawaaratchy, D. M., M. E. Buckland, K. L. McDonald, C. C. Li, L. Ly, E. K. Sykes, R. I. Christopherson and K. L. Kaufman (2015). "Membrane proteome analysis of glioblastoma cell invasion." J Neuropathol Exp Neurol **74**(5): 425-441.
- Manaye, K. F., P. R. Mouton, G. Xu, A. Drew, D. L. Lei, Y. Sharma, G. W. Rebeck and S. Turner (2013). "Age-related loss of noradrenergic neurons in the brains of triple transgenic mice." Age (Dordr) **35**(1): 139-147.
- Marchesi, V. T. (2011). "Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy." FASEB J **25**(1): 5-13.
- Mark, R. J., Z. Pang, J. W. Geddes, K. Uchida and M. P. Mattson (1997). "Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation." J Neurosci **17**(3): 1046-1054.

- Markovic, D. S., R. Glass, M. Synowitz, N. Rooijen and H. Kettenmann (2005). "Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2." J Neuropathol Exp Neurol **64**(9): 754-762.
- Martin, S. F., F. Navarro, N. Forthoffer, P. Navas and J. M. Villalba (2001). "Neutral magnesium-dependent sphingomyelinase from liver plasma membrane: purification and inhibition by ubiquinol." J Bioenerg Biomembr **33**(2): 143-153.
- Mason, R. P., J. D. Estermyer, J. F. Kelly and P. E. Mason (1996). "Alzheimer's disease amyloid beta peptide 25-35 is localized in the membrane hydrocarbon core: x-ray diffraction analysis." Biochem Biophys Res Commun **222**(1): 78-82.
- Mastrangelo, M. A. and W. J. Bowers (2008). "Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice." BMC Neurosci **9**: 81.
- Matoba, S., J. G. Kang, W. D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P. J. Hurley, F. Bunz and P. M. Hwang (2006). "p53 regulates mitochondrial respiration." Science **312**(5780): 1650-1653.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature **430**(7000): 631-639.
- Mattson, M. P., W. Fu, G. Waeg and K. Uchida (1997). "4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, inhibits dephosphorylation of the microtubule-associated protein tau." Neuroreport **8**(9-10): 2275-2281.
- McCarthy, S. A. and R. Bicknell (1993). "Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A." J Biol Chem **268**(31): 23066-23071.
- McDowell, K. A., G. J. Riggins and G. L. Gallia (2011). "Targeting the AKT pathway in glioblastoma." Curr Pharm Des **17**(23): 2411-2420.
- McFarland, B. C., S. W. Hong, R. Rajbhandari, G. B. Twitty, Jr., G. K. Gray, H. Yu, E. N. Benveniste and S. E. Nozell (2013). "NF-kappaB-induced IL-6 ensures STAT3 activation and tumor aggressiveness in glioblastoma." PLoS One **8**(11): e78728.
- Medina, M. and J. Avila (2015). "Further understanding of tau phosphorylation: implications for therapy." Expert Rev Neurother **15**(1): 115-122.
- Mehdi, M. Z., N. R. Pandey, S. K. Pandey and A. K. Srivastava (2005). "H2O2-induced phosphorylation of ERK1/2 and PKB requires tyrosine kinase activity of insulin receptor and c-Src." Antioxid Redox Signal **7**(7-8): 1014-1020.
- Mehta, D. C., J. L. Short and J. A. Nicolazzo (2013). "Altered brain uptake of therapeutics in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Pharm Res **30**(11): 2868-2879.
- Mehta, D. C., J. L. Short and J. A. Nicolazzo (2013). "Reduced CNS exposure of memantine in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease assessed using a novel LC-MS technique." J Pharm Biomed Anal **85**: 198-206.
- Meijer, T. W., J. H. Kaanders, P. N. Span and J. Bussink (2012). "Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy." Clin Cancer Res **18**(20): 5585-5594.

- Miles, M. V., B. J. Patterson, M. B. Schapiro, F. J. Hickey, M. Chalfonte-Evans, P. S. Horn and S. L. Hotze (2006). "Coenzyme Q10 absorption and tolerance in children with Down syndrome: a dose-ranging trial." *Pediatr Neurol* **35**(1): 30-37.
- Miyakawa, T., A. Shimoji, R. Kuramoto and Y. Higuchi (1982). "The relationship between senile plaques and cerebral blood vessels in Alzheimer's disease and senile dementia. Morphological mechanism of senile plaque production." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **40**(2): 121-129.
- Mizushima, N. and M. Komatsu (2011). "Autophagy: renovation of cells and tissues." *Cell* **147**(4): 728-741.
- Mohamed, M. M. and B. F. Sloane (2006). "Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(10): 764-775.
- Molinuevo, J. L., A. Llado and L. Rami (2005). "Memantine: targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and other dementias." *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **20**(2): 77-85.
- Monteverde, T., N. Muthalagu, J. Port and D. J. Murphy (2015). "Evidence of cancer-promoting roles for AMPK and related kinases." *FEBS J* **282**(24): 4658-4671.
- Morantz, R. A., G. W. Wood, M. Foster, M. Clark and K. Gollahon (1979). "Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 1: Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity." *J Neurosurg* **50**(3): 298-304.
- Morantz, R. A., G. W. Wood, M. Foster, M. Clark and K. Gollahon (1979). "Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: studies of the macrophage content of human brain tumors." *J Neurosurg* **50**(3): 305-311.
- Morash, B., J. Johnstone, C. Leopold, A. Li, P. Murphy, E. Ur and M. Wilkinson (2000). "The regulation of leptin gene expression in the C6 glioblastoma cell line." *Mol Cell Endocrinol* **165**(1-2): 97-105.
- Morgan, M. J. and Z. G. Liu (2011). "Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling." *Cell Res* **21**(1): 103-115.
- Morris, A. W., R. O. Carare, S. Schreiber and C. A. Hawkes (2014). "The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of beta-amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy." *Front Aging Neurosci* **6**: 251.
- Mota, S. I., R. O. Costa, I. L. Ferreira, I. Santana, G. L. Caldeira, C. Padovano, A. C. Fonseca, I. Baldeiras, C. Cunha, L. Letra, C. R. Oliveira, C. M. Pereira and A. C. Rego (2015). "Oxidative stress involving changes in Nrf2 and ER stress in early stages of Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1852**(7): 1428-1441.
- Murakami, K., N. Murata, Y. Noda, S. Tahara, T. Kaneko, N. Kinoshita, H. Hatsuta, S. Murayama, K. J. Barnham, K. Irie, T. Shirasawa and T. Shimizu (2011). "SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid beta protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease." *J Biol Chem* **286**(52): 44557-44568.
- Murakami, K., N. Murata, Y. Ozawa, N. Kinoshita, K. Irie, T. Shirasawa and T. Shimizu (2011). "Vitamin C restores behavioral deficits and amyloid-beta oligomerization

- without affecting plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **26**(1): 7-18.
- Murakami, K., T. Shimizu and K. Irie (2011). "Formation of the 42-mer Amyloid beta Radical and the Therapeutic Role of Superoxide Dismutase in Alzheimer's Disease." J Amino Acids **2011**: 654207.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." Biochem J **417**(1): 1-13.
- Naderi, J., M. Somayajulu-Nitu, A. Mukerji, P. Sharda, M. Sikorska, H. Borowy-Borowski, B. Antonsson and S. Pandey (2006). "Water-soluble formulation of Coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells." Apoptosis **11**(8): 1359-1369.
- Nakanishi, C. and M. Toi (2005). "Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs." Nat Rev Cancer **5**(4): 297-309.
- Naugler, W. E. and M. Karin (2008). "NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms." Curr Opin Genet Dev **18**(1): 19-26.
- Navarro, F., J. M. Villalba, F. L. Crane, W. C. Mackellar and P. Navas (1995). "A phospholipid-dependent NADH-coenzyme Q reductase from liver plasma membrane." Biochem Biophys Res Commun **212**(1): 138-143.
- Navas, P., J. M. Villalba and R. de Cabo (2007). "The importance of plasma membrane coenzyme Q in aging and stress responses." Mitochondrion **7 Suppl**: S34-40.
- Nazarenko, I., S. M. Hede, X. He, A. Hedren, J. Thompson, M. S. Lindstrom and M. Nister (2012). "PDGF and PDGF receptors in glioma." Ups J Med Sci **117**(2): 99-112.
- Nejati-Koshki, K., A. Akbarzadeh, M. Pourhasan-Moghaddam, A. Abhari and H. Dariushnejad (2014). "Inhibition of leptin and leptin receptor gene expression by silibinin-curcumin combination." Asian Pac J Cancer Prev **14**(11): 6595-6599.
- Nejati-Koshki, K., A. Akbarzadeh and M. Pourhassan-Moghaddam (2014). "Curcumin inhibits leptin gene expression and secretion in breast cancer cells by estrogen receptors." Cancer Cell Int **14**: 66.
- Newlands, E. S., M. F. Stevens, S. R. Wedge, R. T. Wheelhouse and C. Brock (1997). "Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials." Cancer Treat Rev **23**(1): 35-61.
- Nishida, Y., T. Yokota, T. Takahashi, T. Uchihara, K. Jishage and H. Mizusawa (2006). "Deletion of vitamin E enhances phenotype of Alzheimer disease model mouse." Biochem Biophys Res Commun **350**(3): 530-536.
- Nishie, A., M. Ono, T. Shono, J. Fukushi, M. Otsubo, H. Onoue, Y. Ito, T. Inamura, K. Ikezaki, M. Fukui, T. Iwaki and M. Kuwano (1999). "Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas." Clin Cancer Res **5**(5): 1107-1113.
- Niwa, K., G. A. Carlson and C. Iadecola (2000). "Exogenous A beta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice." J Cereb Blood Flow Metab **20**(12): 1659-1668.

- Nogueira, L., P. Ruiz-Ontanon, A. Vazquez-Barquero, F. Moris and J. L. Fernandez-Luna (2011). "The NFkappaB pathway: a therapeutic target in glioblastoma." *Oncotarget* **2**(8): 646-653.
- Nogueira, V., Y. Park, C. C. Chen, P. Z. Xu, M. L. Chen, I. Tonic, T. Unterman and N. Hay (2008). "Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis." *Cancer Cell* **14**(6): 458-470.
- Nunomura, A., P. I. Moreira, A. Takeda, M. A. Smith and G. Perry (2007). "Oxidative RNA damage and neurodegeneration." *Curr Med Chem* **14**(28): 2968-2975.
- Nunomura, A., G. Perry, G. Aliev, K. Hirai, A. Takeda, E. K. Balraj, P. K. Jones, H. Ghanbari, T. Wataya, S. Shimohama, S. Chiba, C. S. Atwood, R. B. Petersen and M. A. Smith (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." *J Neuropathol Exp Neurol* **60**(8): 759-767.
- O'Brien, R. J. and P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." *Annu Rev Neurosci* **34**: 185-204.
- Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng and F. M. LaFerla (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **24**(8): 1063-1070.
- Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari and F. M. LaFerla (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." *Neuron* **39**(3): 409-421.
- Okamoto, S., M. Nitta, T. Maruyama, T. Sawada, T. Komori, Y. Okada and Y. Muragaki (2016). "Bevacizumab changes vascular structure and modulates the expression of angiogenic factors in recurrent malignant gliomas." *Brain Tumor Pathol.*
- Oliva, C. R., S. E. Nozell, A. Diers, S. G. McCluggage, 3rd, J. N. Sarkaria, J. M. Markert, V. M. Darley-Usmar, S. M. Bailey, G. Y. Gillespie, A. Landar and C. E. Griguer (2010). "Acquisition of temozolomide chemoresistance in gliomas leads to remodeling of mitochondrial electron transport chain." *J Biol Chem* **285**(51): 39759-39767.
- Olivieri, G., J. Bodycote and S. Wolff (1984). "Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine." *Science* **223**(4636): 594-597.
- Ordys, B. B., S. Launay, R. F. Deighton, J. McCulloch and I. R. Whittle (2010). "The role of mitochondria in glioma pathophysiology." *Mol Neurobiol* **42**(1): 64-75.
- Ortega, A. L., S. Mena and J. M. Estrela (2011). "Glutathione in cancer cell death." *Cancers (Basel)* **3**(1): 1285-1310.
- Ortega, F., J. Stott, S. A. Visser and C. Bendtsen (2013). "Interplay between alpha-, beta-, and gamma-secretases determines biphasic amyloid-beta protein level in the presence of a gamma-secretase inhibitor." *J Biol Chem* **288**(2): 785-792.
- Ottley, E. and E. Gold (2012). "Insensitivity to the growth inhibitory effects of activin A: an acquired capability in prostate cancer progression." *Cytokine Growth Factor Rev* **23**(3): 119-125.
- Pahl, H. L. (1999). "Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors." *Oncogene* **18**(49): 6853-6866.

- Papandreou, I., R. A. Cairns, L. Fontana, A. L. Lim and N. C. Denko (2006). "HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption." *Cell Metab* **3**(3): 187-197.
- Park, L., J. Anrather, C. Forster, K. Kazama, G. A. Carlson and C. Iadecola (2004). "Abeta-induced vascular oxidative stress and attenuation of functional hyperemia in mouse somatosensory cortex." *J Cereb Blood Flow Metab* **24**(3): 334-342.
- Park, L., J. Anrather, P. Zhou, K. Frys, R. Pitstick, S. Younkin, G. A. Carlson and C. Iadecola (2005). "NADPH-oxidase-derived reactive oxygen species mediate the cerebrovascular dysfunction induced by the amyloid beta peptide." *J Neurosci* **25**(7): 1769-1777.
- Patel, N. S., A. Quadros, S. Brem, M. Wotoczek-Obadia, V. S. Mathura, V. Laporte, M. Mullan and D. Paris (2008). "Potent anti-angiogenic motifs within the Alzheimer beta-amyloid peptide." *Amyloid* **15**(1): 5-19.
- Pavlidis, S., D. Whitaker-Menezes, R. Castello-Cros, N. Flomenberg, A. K. Witkiewicz, P. G. Frank, M. C. Casimiro, C. Wang, P. Fortina, S. Addya, R. G. Pestell, U. E. Martinez-Outschoorn, F. Sotgia and M. P. Lisanti (2009). "The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma." *Cell Cycle* **8**(23): 3984-4001.
- Paw, I., R. C. Carpenter, K. Watabe, W. Debinski and H. W. Lo (2015). "Mechanisms regulating glioma invasion." *Cancer Lett* **362**(1): 1-7.
- Perumal, S. S., P. Shanthy and P. Sachdanandam (2005). "Augmented efficacy of tamoxifen in rat breast tumorigenesis when gavaged along with riboflavin, niacin, and CoQ10: effects on lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria." *Chem Biol Interact* **152**(1): 49-58.
- Perumal, S. S., P. Shanthy and P. Sachdanandam (2005). "Combined efficacy of tamoxifen and coenzyme Q10 on the status of lipid peroxidation and antioxidants in DMBA induced breast cancer." *Mol Cell Biochem* **273**(1-2): 151-160.
- Ponten, J. and E. H. Macintyre (1968). "Long term culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**(4): 465-486.
- Popescu, A. M., O. Alexandru, C. Brindusa, S. O. Purcaru, D. E. Tache, L. G. Tataranu, C. Taisescu and A. Dricu (2015). "Targeting the VEGF and PDGF signaling pathway in glioblastoma treatment." *Int J Clin Exp Pathol* **8**(7): 7825-7837.
- Pouliliou, S. and M. I. Koukourakis (2014). "Gamma histone 2AX (gamma-H2AX) as a predictive tool in radiation oncology." *Biomarkers* **19**(3): 167-180.
- Prakash, S., J. Sunitha and M. Hans (2010). "Role of coenzyme Q(10) as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases." *Indian J Pharmacol* **42**(6): 334-337.
- Prasad, G., T. Sottero, X. Yang, S. Mueller, C. D. James, W. A. Weiss, M. Y. Polley, T. Ozawa, M. S. Berger, D. T. Aftab, M. D. Prados and D. A. Haas-Kogan (2011). "Inhibition of PI3K/mTOR pathways in glioblastoma and implications for combination therapy with temozolomide." *Neuro Oncol* **13**(4): 384-392.
- Pratico, D. (2010). "The neurobiology of isoprostanes and Alzheimer's disease." *Biochim Biophys Acta* **1801**(8): 930-933.

- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretzschmar and J. Herms (2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein." *J Neurosci* **26**(27): 7212-7221.
- Pu, P., C. Kang, J. Li and H. Jiang (2004). "Antisense and dominant-negative AKT2 cDNA inhibits glioma cell invasion." *Tumour Biol* **25**(4): 172-178.
- Pu, P., C. Kang, J. Li, H. Jiang and J. Cheng (2006). "The effects of antisense AKT2 RNA on the inhibition of malignant glioma cell growth in vitro and in vivo." *J Neurooncol* **76**(1): 1-11.
- Puri, T., S. Goyal, P. K. Julka, O. Nair, D. N. Sharma and G. K. Rath (2010). "Lycopene in treatment of high-grade gliomas: a pilot study." *Neurol India* **58**(1): 20-23.
- Qiang, L., Y. Yang, Y. J. Ma, F. H. Chen, L. B. Zhang, W. Liu, Q. Qi, N. Lu, L. Tao, X. T. Wang, Q. D. You and Q. L. Guo (2009). "Isolation and characterization of cancer stem like cells in human glioblastoma cell lines." *Cancer Lett* **279**(1): 13-21.
- Qiu, B. and M. C. Simon (2015). "Oncogenes strike a balance between cellular growth and homeostasis." *Semin Cell Dev Biol*.
- Quinn, P. J., J. P. Fabisiak and V. E. Kagan (1999). "Expansion of antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q." *Biofactors* **9**(2-4): 149-154.
- Quinzii, C. M. and M. Hirano (2010). "Coenzyme Q and mitochondrial disease." *Dev Disabil Res Rev* **16**(2): 183-188.
- Radaelli, E., R. Ceruti, V. Patton, M. Russo, A. Degrassi, V. Croci, F. Caprera, G. Stortini, E. Scanziani, E. Pesenti and R. Alzani (2009). "Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease." *Histol Histopathol* **24**(7): 879-891.
- Rademakers, S. E., P. N. Span, J. H. Kaanders, F. C. Sweep, A. J. van der Kogel and J. Bussink (2008). "Molecular aspects of tumour hypoxia." *Mol Oncol* **2**(1): 41-53.
- Rahal, A., A. Kumar, V. Singh, B. Yadav, R. Tiwari, S. Chakraborty and K. Dhama (2014). "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay." *Biomed Res Int* **2014**: 761264.
- Raina, A. K., D. J. Templeton, J. C. Deak, G. Perry and M. A. Smith (1999). "Quinone reductase (NQO1), a sensitive redox indicator, is increased in Alzheimer's disease." *Redox Rep* **4**(1-2): 23-27.
- Rainov, N. G. and H. Ren (2003). "Gene therapy for human malignant brain tumors." *Cancer J* **9**(3): 180-188.
- Rajasekhar, V. K., A. Viale, N. D. Socci, M. Wiedmann, X. Hu and E. C. Holland (2003). "Oncogenic Ras and Akt signaling contribute to glioblastoma formation by differential recruitment of existing mRNAs to polysomes." *Mol Cell* **12**(4): 889-901.
- Rammal, H., J. Bouayed, C. Younos and R. Soulimani (2008). "Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice." *Brain Behav Immun* **22**(8): 1156-1159.

- Randall, A. D., J. Witton, C. Booth, A. Hynes-Allen and J. T. Brown (2010). "The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway." Neuropharmacology **59**(4-5): 243-267.
- Rapoport, S. I. (2000). "Functional brain imaging to identify affected subjects genetically at risk for Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5696-5698.
- Reddy, M. M., M. S. Fernandes, R. Salgia, R. L. Levine, J. D. Griffin and M. Sattler (2011). "NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases." Leukemia **25**(2): 281-289.
- Refolo, L. M., B. Malester, J. LaFrancois, T. Bryant-Thomas, R. Wang, G. S. Tint, K. Sambamurti, K. Duff and M. A. Pappolla (2000). "Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model." Neurobiol Dis **7**(4): 321-331.
- Ren, S. and E. J. Lien (1997). "Natural products and their derivatives as cancer chemopreventive agents." Prog Drug Res **48**: 147-171.
- Revilla, S., C. Sunol, Y. Garcia-Mesa, L. Gimenez-Llort, C. Sanfeliu and R. Cristofol (2014). "Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain." Neuropharmacology **81**: 55-63.
- Rhee, S. G. (2006). "Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling." Science **312**(5782): 1882-1883.
- Rhim, J. S., W. P. Tsai, Z. Q. Chen, Z. Chen, C. Van Waes, A. M. Burger and J. A. Lautenberger (1998). "A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis." Carcinogenesis **19**(4): 673-681.
- Ricard, C., F. Stanchi, T. Rodriguez, M. C. Amoureux, G. Rougon and F. Debarbieux (2013). "Dynamic quantitative intravital imaging of glioblastoma progression reveals a lack of correlation between tumor growth and blood vessel density." PLoS One **8**(9): e72655.
- Riemenschneider, M. J., M. E. Hegi and G. Reifenberger (2010). "MGMT promoter methylation in malignant gliomas." Target Oncol **5**(3): 161-165.
- Rios, M., M. Foretz, B. Viollet, A. Prieto, M. Fraga, J. A. Costoya and R. Senaris (2013). "AMPK activation by oncogenesis is required to maintain cancer cell proliferation in astrocytic tumors." Cancer Res **73**(8): 2628-2638.
- Riviere, S., I. Birlouez-Aragon, F. Nourhashemi and B. Vellas (1998). "Low plasma vitamin C in Alzheimer patients despite an adequate diet." Int J Geriatr Psychiatry **13**(11): 749-754.
- Rodrigue, K. M., K. M. Kennedy and D. C. Park (2009). "Beta-amyloid deposition and the aging brain." Neuropsychol Rev **19**(4): 436-450.
- Roher, A. E., C. Esh, T. A. Kokjohn, W. Kalback, D. C. Luehrs, J. D. Seward, L. I. Sue and T. G. Beach (2003). "Circle of willis atherosclerosis is a risk factor for sporadic Alzheimer's disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(11): 2055-2062.
- Rong, Y., D. L. Durden, E. G. Van Meir and D. J. Brat (2006). "'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis." J Neuropathol Exp Neurol **65**(6): 529-539.

- Rosenfeldt, F. L., S. J. Haas, H. Krum, A. Hadj, K. Ng, J. Y. Leong and G. F. Watts (2007). "Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: a meta-analysis of the clinical trials." J Hum Hypertens **21**(4): 297-306.
- Ruitenbergh, A., T. den Heijer, S. L. Bakker, J. C. van Swieten, P. J. Koudstaal, A. Hofman and M. M. Breteler (2005). "Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: the Rotterdam Study." Ann Neurol **57**(6): 789-794.
- Ruitenbergh, A., A. Ott, J. C. van Swieten, A. Hofman and M. M. Breteler (2001). "Incidence of dementia: does gender make a difference?" Neurobiol Aging **22**(4): 575-580.
- Runquist, M., I. Parmryd, A. Thelin, T. Chojnacki and G. Dallner (1995). "Distribution of branch point prenyltransferases in regions of bovine brain." J Neurochem **65**(5): 2299-2306.
- Rusciani, L., I. Proietti, A. Rusciani, A. Paradisi, G. Sbordoni, C. Alfano, S. Panunzi, A. De Gaetano and S. Lippa (2006). "Low plasma coenzyme Q10 levels as an independent prognostic factor for melanoma progression." J Am Acad Dermatol **54**(2): 234-241.
- Russo, S. M., J. E. Tepper, A. S. Baldwin, Jr., R. Liu, J. Adams, P. Elliott and J. C. Cusack, Jr. (2001). "Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB." Int J Radiat Oncol Biol Phys **50**(1): 183-193.
- Sabharwal, S. S. and P. T. Schumacker (2014). "Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?" Nat Rev Cancer **14**(11): 709-721.
- Samid, D., Z. Ram, W. R. Hudgins, S. Shack, L. Liu, S. Walbridge, E. H. Oldfield and C. E. Myers (1994). "Selective activity of phenylacetate against malignant gliomas: resemblance to fetal brain damage in phenylketonuria." Cancer Res **54**(4): 891-895.
- Sandor, P. S., L. Di Clemente, G. Coppola, U. Saenger, A. Fumal, D. Magis, L. Seidel, R. M. Agosti and J. Schoenen (2005). "Efficacy of coenzyme Q10 in migraine prophylaxis: a randomized controlled trial." Neurology **64**(4): 713-715.
- SantaCruz, K. S., E. Yazlovitskaya, J. Collins, J. Johnson and C. DeCarli (2004). "Regional NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity in Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **25**(1): 63-69.
- Santos-Gonzalez, M., C. Gomez Diaz, P. Navas and J. M. Villalba (2007). "Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet." Exp Gerontol **42**(8): 798-806.
- Santos-Ocana, C., J. M. Villalba, F. Cordoba, S. Padilla, F. L. Crane, C. F. Clarke and P. Navas (1998). "Genetic evidence for coenzyme Q requirement in plasma membrane electron transport." J Bioenerg Biomembr **30**(5): 465-475.
- Sanzey, M., S. A. Abdul Rahim, A. Oudin, A. Dirkse, T. Kaoma, L. Vallar, C. Herold-Mende, R. Bjerkvig, A. Golebiewska and S. P. Niclou (2015). "Comprehensive analysis of glycolytic enzymes as therapeutic targets in the treatment of glioblastoma." PLoS One **10**(5): e0123544.
- Saran, M., C. Michel and W. Bors (1990). "Reaction of NO with O₂⁻. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF)." Free Radic Res Commun **10**(4-5): 221-226.

- Saretzki, G., N. Sitte, U. Merkel, R. E. Wurm and T. von Zglinicki (1999). "Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments." *Oncogene* **18**(37): 5148-5158.
- Sato, A., M. Okada, K. Shibuya, E. Watanabe, S. Seino, K. Suzuki, Y. Narita, S. Shibui, T. Kayama and C. Kitanaka (2013). "Resveratrol promotes proteasome-dependent degradation of Nanog via p53 activation and induces differentiation of glioma stem cells." *Stem Cell Res* **11**(1): 601-610.
- Savio, M., D. Ferraro, C. Maccario, R. Vaccarone, L. D. Jensen, F. Corana, B. Mannucci, L. Bianchi, Y. Cao and L. A. Stivala (2016). "Resveratrol analogue 4,4'-dihydroxy-trans-stilbene potently inhibits cancer invasion and metastasis." *Sci Rep* **6**: 19973.
- Sayre, L. M., D. A. Zelasko, P. L. Harris, G. Perry, R. G. Salomon and M. A. Smith (1997). "4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **68**(5): 2092-2097.
- Scita, G., P. Tenca, E. Frittoli, A. Tocchetti, M. Innocenti, G. Giardina and P. P. Di Fiore (2000). "Signaling from Ras to Rac and beyond: not just a matter of GEFs." *EMBO J* **19**(11): 2393-2398.
- Schmelzer, C., M. Kitano, G. Rimbach, P. Niklowitz, T. Menke, K. Hosoe and F. Doring (2009). "Effects of ubiquinol-10 on microRNA-146a expression in vitro and in vivo." *Mediators Inflamm* **2009**: 415437.
- Schmelzer, C., I. Lindner, G. Rimbach, P. Niklowitz, T. Menke and F. Doring (2008). "Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression." *Biofactors* **32**(1-4): 179-183.
- Schmelzer, C., I. Lindner, C. Vock, K. Fujii and F. Doring (2007). "Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study." *IUBMB Life* **59**(10): 628-633.
- Schmidt, N. O., M. Westphal, C. Hagel, S. Ergun, D. Stavrou, E. M. Rosen and K. Lamszus (1999). "Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis." *Int J Cancer* **84**(1): 10-18.
- Schmitt, C. A. (2007). "Cellular senescence and cancer treatment." *Biochim Biophys Acta* **1775**(1): 5-20.
- Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeuerle (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1." *EMBO J* **10**(8): 2247-2258.
- Schroder, K. (2014). "NADPH oxidases in redox regulation of cell adhesion and migration." *Antioxid Redox Signal* **20**(13): 2043-2058.
- Schumacker, P. T. (2006). "Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword." *Cancer Cell* **10**(3): 175-176.
- Selkoe, D. J. (1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." *Neuron* **6**(4): 487-498.
- Selkoe, D. J. (1999). "Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease." *Nature* **399**(6738 Suppl): A23-31.

- Semenza, G. L. (2009). "Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1." *Semin Cancer Biol* **19**(1): 12-16.
- Semenza, G. L. (2010). "Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics." *Oncogene* **29**(5): 625-634.
- Semenza, G. L. (2012). "Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy." *Trends Pharmacol Sci* **33**(4): 207-214.
- Semenza, G. L. (2013). "Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis." *Oncogene* **32**(35): 4057-4063.
- Shaifer, C. A., J. Huang and P. C. Lin (2010). "Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance." *Int J Cancer* **127**(9): 2063-2075.
- Sharma, K., R. W. Goehle, X. Di, M. A. Hicks, 2nd, S. V. Torti, F. M. Torti, H. Harada and D. A. Gewirtz (2014). "A novel cytosolic form of autophagy in sensitization of non-small cell lung cancer cells to radiation by vitamin D and the vitamin D analog, EB 1089." *Autophagy* **10**(12): 2346-2361.
- Shen, S. H., A. L. Kwan, Y. Y. Chen and Z. X. Wang (2013). "Effect of silencing HIF-1alpha on proliferation, invasion and migration of glioblastoma U87 cells." *Neurol Sci* **34**(3): 365-371.
- Sheng, J. and Z. Xu (2015). "Three decades of research on angiogenin: a review and perspective." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*.
- Shi, H., B. Zheng, Y. Wu, Y. Tang, L. Wang, Y. Gao, H. Gong, J. Du and R. Yu (2015). "Ubiquitin ligase Siah1 promotes the migration and invasion of human glioma cells by regulating HIF-1alpha signaling under hypoxia." *Oncol Rep* **33**(3): 1185-1190.
- Shi, J., L. Zhang, A. Shen, J. Zhang, Y. Wang, Y. Zhao, L. Zou, Q. Ke, F. He, P. Wang, C. Cheng and G. Shi (2010). "Clinical and biological significance of forkhead class box O 3a expression in glioma: mediation of glioma malignancy by transcriptional regulation of p27kip1." *J Neurooncol* **98**(1): 57-69.
- Shinde, U. A., A. A. Mehta and R. K. Goyal (2000). "Nitric oxide: a molecule of the millennium." *Indian J Exp Biol* **38**(3): 201-210.
- Shineman, D. W., G. S. Basi, J. L. Bizon, C. A. Colton, B. D. Greenberg, B. A. Hollister, J. Lincecum, G. G. Leblanc, L. B. Lee, F. Luo, D. Morgan, I. Morse, L. M. Refolo, D. R. Riddell, K. Scarce-Levie, P. Sweeney, J. Yrjanheikki and H. M. Fillit (2011). "Accelerating drug discovery for Alzheimer's disease: best practices for preclinical animal studies." *Alzheimers Res Ther* **3**(5): 28.
- Shivakumar, B. R., H. K. Anandatheerthavarada and V. Ravindranath (1991). "Free radical scavenging systems in developing rat brain." *Int J Dev Neurosci* **9**(2): 181-185.
- Shults, C. W. (2005). "Therapeutic role of coenzyme Q(10) in Parkinson's disease." *Pharmacol Ther* **107**(1): 120-130.
- Siegel, D., D. L. Gustafson, D. L. Dehn, J. Y. Han, P. Boonchoong, L. J. Berliner and D. Ross (2004). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger." *Mol Pharmacol* **65**(5): 1238-1247.

- Sies, H. (2015). "Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine." Redox Biol **4**: 180-183.
- Sies, H. and E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 617-631.
- Simakova, O. and N. J. Arispe (2011). "Fluorescent analysis of the cell-selective Alzheimer's disease abeta Peptide surface membrane binding: influence of membrane components." Int J Alzheimers Dis **2011**: 917629.
- Singer, E., J. Judkins, N. Salomonis, L. Matlaf, P. Soteropoulos, S. McAllister and L. Soroceanu (2015). "Reactive oxygen species-mediated therapeutic response and resistance in glioblastoma." Cell Death Dis **6**: e1601.
- Singh, C. K., M. A. Ndiaye and N. Ahmad (2015). "Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation." Biochim Biophys Acta **1852**(6): 1178-1185.
- Sinha, S., N. Koul, D. Dixit, V. Sharma and E. Sen (2011). "IGF-1 induced HIF-1alpha-TLR9 cross talk regulates inflammatory responses in glioma." Cell Signal **23**(11): 1869-1875.
- Skoog, I. and D. Gustafson (2006). "Update on hypertension and Alzheimer's disease." Neurol Res **28**(6): 605-611.
- Smith, P. S., W. Zhao, D. R. Spitz and M. E. Robbins (2007). "Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress." Free Radic Biol Med **42**(6): 787-797.
- Soderberg, M., C. Edlund, K. Kristensson and G. Dallner (1990). "Lipid compositions of different regions of the human brain during aging." J Neurochem **54**(2): 415-423.
- Sohal, R. S. and M. J. Forster (2007). "Coenzyme Q, oxidative stress and aging." Mitochondrion **7 Suppl**: S103-111.
- Sohmiya, M., M. Tanaka, Y. Suzuki, Y. Tanino, K. Okamoto and Y. Yamamoto (2005). "An increase of oxidized coenzyme Q-10 occurs in the plasma of sporadic ALS patients." J Neurol Sci **228**(1): 49-53.
- Sowers, J. L., Ed. (2014). The Role of Inflammation in Brain Cancer. James L. Sowers.
- Sporn, M. B. and K. T. Liby (2012). "NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context." Nat Rev Cancer **12**(8): 564-571.
- Straus, D. S. (2013). "TNFalpha and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells." Mol Cancer **12**: 78.
- Stupp, R. and E. Newlands (2001). "New approaches for temozolomide therapy: use in newly diagnosed glioma." Semin Oncol **28**(4 Suppl 13): 19-23.
- Sultana, R., M. Perluigi and D. A. Butterfield (2009). "Oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease (AD), mild cognitive impairment and animal models of AD: role of Abeta in pathogenesis." Acta Neuropathol **118**(1): 131-150.
- Sumien, N., K. R. Heinrich, R. A. Shetty, R. S. Sohal and M. J. Forster (2009). "Prolonged intake of coenzyme Q10 impairs cognitive functions in mice." J Nutr **139**(10): 1926-1932.
- Suo, Z., C. Fang, F. Crawford and M. Mullan (1997). "Superoxide free radical and intracellular calcium mediate A beta(1-42) induced endothelial toxicity." Brain Res **762**(1-2): 144-152.

- Suzuki, N., T. Iwatsubo, A. Odaka, Y. Ishibashi, C. Kitada and Y. Ihara (1994). "High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy." Am J Pathol **145**(2): 452-460.
- Svineng, G., C. Ravuri, O. Rikardsen, N. E. Huseby and J. O. Winberg (2008). "The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function." Connect Tissue Res **49**(3): 197-202.
- Swerdlow, R. H., J. M. Burns and S. M. Khan (2010). "The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis." J Alzheimers Dis **20 Suppl 2**: S265-279.
- Swietach, P., R. D. Vaughan-Jones and A. L. Harris (2007). "Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 299-310.
- Switzeny, O. J., E. Mullner, K. H. Wagner, H. Brath, E. Aumuller and A. G. Haslberger (2012). "Vitamin and antioxidant rich diet increases MLH1 promoter DNA methylation in DMT2 subjects." Clin Epigenetics **4**(1): 19.
- Swomley, A. M., S. Forster, J. T. Keeney, J. Triplett, Z. Zhang, R. Sultana and D. A. Butterfield (2014). "Aβ, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies." Biochim Biophys Acta **1842**(8): 1248-1257.
- Szatrowski, T. P. and C. F. Nathan (1991). "Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells." Cancer Res **51**(3): 794-798.
- Szpaderska, A. M. and A. Frankfater (2001). "An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer." Cancer Res **61**(8): 3493-3500.
- Takahashi, T., T. Okamoto and T. Kishi (1996). "Characterization of NADPH-dependent ubiquinone reductase activity in rat liver cytosol: effect of various factors on ubiquinone-reducing activity and discrimination from other quinone reductases." J Biochem **119**(2): 256-263.
- Takahashi, T., T. Okamoto, K. Mori, H. Sayo and T. Kishi (1993). "Distribution of ubiquinone and ubiquinol homologues in rat tissues and subcellular fractions." Lipids **28**(9): 803-809.
- Takeda, S., N. Sato, K. Uchio-Yamada, K. Sawada, T. Kunieda, D. Takeuchi, H. Kurinami, M. Shinohara, H. Rakugi and R. Morishita (2010). "Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Aβ deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(15): 7036-7041.
- Tamagno, E., M. Guglielmotto, D. Monteleone and M. Tabaton (2012). "Amyloid-beta production: major link between oxidative stress and BACE1." Neurotox Res **22**(3): 208-219.
- Tanida, I. (2011). "Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy." Antioxid Redox Signal **14**(11): 2201-2214.
- Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell **120**(4): 545-555.
- Taylor, C., H. A. Loomans, G. F. Le Bras, R. B. Koumangoye, A. I. Romero-Morales, L. L. Quast, A. I. Zaika, W. El-Rifai, T. Andl and C. D. Andl (2015). "Activin a signaling regulates cell invasion and proliferation in esophageal adenocarcinoma." Oncotarget **6**(33): 34228-34244.

- Tedone, T., M. Correale, G. Barbarossa, V. Casavola, A. Paradiso and S. J. Reshkin (1997). "Release of the aspartyl protease cathepsin D is associated with and facilitates human breast cancer cell invasion." *FASEB J* **11**(10): 785-792.
- Tennant, D. A., R. V. Duran and E. Gottlieb (2010). "Targeting metabolic transformation for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **10**(4): 267-277.
- Teran, E., I. Hernandez, B. Nieto, R. Tavera, J. E. Ocampo and A. Calle (2009). "Coenzyme Q10 supplementation during pregnancy reduces the risk of pre-eclampsia." *Int J Gynaecol Obstet* **105**(1): 43-45.
- Tiano, L., R. Belardinelli, P. Carnevali, F. Principi, G. Seddaiu and G. P. Littarru (2007). "Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: a double-blind, randomized controlled study." *Eur Heart J* **28**(18): 2249-2255.
- Tiano, L., P. Carnevali, L. Padella, L. Santoro, F. Principi, F. Bruge, F. Carle, R. Gesuita, O. Gabrielli and G. P. Littarru (2011). "Effect of Coenzyme Q10 in mitigating oxidative DNA damage in Down syndrome patients, a double blind randomized controlled trial." *Neurobiol Aging* **32**(11): 2103-2105.
- Torres-Lista, V., C. Parrado-Fernandez, I. Alvarez-Monton, J. Frontinan-Rubio, M. Duran-Prado, J. R. Peinado, B. Johansson, F. J. Alcaín and L. Gimenez-Llort (2014). "Neophobia, NQO1 and SIRT1 as premorbid and prodromal indicators of AD in 3xTg-AD mice." *Behav Brain Res* **271**: 140-146.
- Torres, L. L., N. B. Quaglio, G. T. de Souza, R. T. Garcia, L. M. Dati, W. L. Moreira, A. P. Loureiro, J. N. de Souza-Talarico, J. Smid, C. S. Porto, C. M. Bottino, R. Nitrini, S. B. Barros, R. Camarini and T. Marcourakis (2011). "Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **26**(1): 59-68.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno and K. Tada (1980). "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)." *Int J Cancer* **26**(2): 171-176.
- Tsuneki, H., N. Sekizaki, T. Suzuki, S. Kobayashi, T. Wada, T. Okamoto, I. Kimura and T. Sasaoka (2007). "Coenzyme Q10 prevents high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells." *Eur J Pharmacol* **566**(1-3): 1-10.
- Tsvetkov, P., Y. Adamovich, E. Elliott and Y. Shaul (2011). "E3 ligase STUB1/CHIP regulates NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) accumulation in aged brain, a process impaired in certain Alzheimer disease patients." *J Biol Chem* **286**(11): 8839-8845.
- Turner, P. R., K. O'Connor, W. P. Tate and W. C. Abraham (2003). "Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory." *Prog Neurobiol* **70**(1): 1-32.
- Turunen, M., J. Olsson and G. Dallner (2004). "Metabolism and function of coenzyme Q." *Biochim Biophys Acta* **1660**(1-2): 171-199.
- Uys, J. D., P. J. Mulholland and D. M. Townsend (2014). "Glutathione and redox signaling in substance abuse." *Biomed Pharmacother* **68**(6): 799-807.

- van Dijk, E. J., N. D. Prins, S. E. Vermeer, A. Hofman, C. M. van Duijn, P. J. Koudstaal and M. M. Breteler (2004). "Plasma amyloid beta, apolipoprotein E, lacunar infarcts, and white matter lesions." Ann Neurol **55**(4): 570-575.
- Van Meir, E., Y. Sawamura, A. C. Diserens, M. F. Hamou and N. de Tribolet (1990). "Human glioblastoma cells release interleukin 6 in vivo and in vitro." Cancer Res **50**(20): 6683-6688.
- van Norden, A. G., E. J. van Dijk, K. F. de Laat, P. Scheltens, M. G. Olderikkert and F. E. de Leeuw (2012). "Dementia: Alzheimer pathology and vascular factors: from mutually exclusive to interaction." Biochim Biophys Acta **1822**(3): 340-349.
- Vander Heiden, M. G. (2011). "Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens." Nat Rev Drug Discov **10**(9): 671-684.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley and C. B. Thompson (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.
- Vassar, R., B. D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E. A. Mendiaz, P. Denis, D. B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M. A. Jarosinski, A. L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J. C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers and M. Citron (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science **286**(5440): 735-741.
- Vaziri, H. and S. Benchimol (1996). "From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging." Exp Gerontol **31**(1-2): 295-301.
- Vergara, D., C. M. Valente, A. Tinelli, C. Siciliano, V. Lorusso, R. Acierno, G. Giovinazzo, A. Santino, C. Storelli and M. Maffia (2011). "Resveratrol inhibits the epidermal growth factor-induced epithelial mesenchymal transition in MCF-7 cells." Cancer Lett **310**(1): 1-8.
- Villalba J.M., A. A., Navarro F., Rodríguez-Aguilera, J.C. and Navas, P. (2001). Insights in cellular protection against oxidative stress: The necessity for extramitochondrial coenzyme Q. In Mitochondrial Ubiquinone (Coenzyme Q10): Biochemical, Functional, Medical, and Therapeutic Aspects in Human Health and Diseases. . M. Ebadi, Marwah, J. and Chopra, R.K. Scottsdale, Prominent Press. **2**: 89-120.
- Villalba, J. M., F. Navarro, F. Cordoba, A. Serrano, A. Arroyo, F. L. Crane and P. Navas (1995). "Coenzyme Q reductase from liver plasma membrane: purification and role in trans-plasma-membrane electron transport." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4887-4891.
- Villalba, J. M. and P. Navas (2000). "Plasma membrane redox system in the control of stress-induced apoptosis." Antioxid Redox Signal **2**(2): 213-230.
- Villalba, J. M., C. Parrado, M. Santos-Gonzalez and F. J. Alcain (2010). "Therapeutic use of coenzyme Q10 and coenzyme Q10-related compounds and formulations." Expert Opin Investig Drugs **19**(4): 535-554.
- Villalba, C., U. Cortes, M. Wager, J. M. Tourani, P. Rivet, C. Marquant, S. Martin, A. G. Turhan and L. Karayan-Tapon (2012). "O6-Methylguanine-methyltransferase

- (MGMT) promoter methylation status in glioma stem-like cells is correlated to temozolomide sensitivity under differentiation-promoting conditions." *Int J Mol Sci* **13**(6): 6983-6994.
- Walter, L., V. Nogueira, X. Leverage, M. P. Heitz, P. Bernardi and E. Fontaine (2000). "Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site." *J Biol Chem* **275**(38): 29521-29527.
- Wallace, D. C. (2012). "Mitochondria and cancer." *Nat Rev Cancer* **12**(10): 685-698.
- Wang, J., H. Tanila, J. Puolivali, I. Kadish and T. van Groen (2003). "Gender differences in the amount and deposition of amyloidbeta in APPswe and PS1 double transgenic mice." *Neurobiol Dis* **14**(3): 318-327.
- Wang, L., W. Zhan, S. Xie, J. Hu, Q. Shi, X. Zhou, Y. Wu, S. Wang, Z. Fei and R. Yu (2014). "Over-expression of Rap2a inhibits glioma migration and invasion by down-regulating p-AKT." *Cell Biol Int* **38**(3): 326-334.
- Wang, S., V. L. DeGross and S. K. Clinton (2003). "Tomato and soy polyphenols reduce insulin-like growth factor-I-stimulated rat prostate cancer cell proliferation and apoptotic resistance in vitro via inhibition of intracellular signaling pathways involving tyrosine kinase." *J Nutr* **133**(7): 2367-2376.
- Wang, Y. and S. Hekimi (2013). "Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **48**(1): 69-88.
- Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." *Science* **124**(3215): 269-270.
- Warner, T. A., J. Q. Kang, J. A. Kennard and F. E. Harrison (2015). "Low brain ascorbic acid increases susceptibility to seizures in mouse models of decreased brain ascorbic acid transport and Alzheimer's disease." *Epilepsy Res* **110**: 20-25.
- Weaver, A. M. (2006). "Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion." *Clin Exp Metastasis* **23**(2): 97-105.
- Wei, Y., Z. Zou, N. Becker, M. Anderson, R. Sumpter, G. Xiao, L. Kinch, P. Koduru, C. S. Christudass, R. W. Veltri, N. V. Grishin, M. Peyton, J. Minna, G. Bhagat and B. Levine (2013). "EGFR-mediated Beclin 1 phosphorylation in autophagy suppression, tumor progression, and tumor chemoresistance." *Cell* **154**(6): 1269-1284.
- Weinberg, S. E. and N. S. Chandel (2015). "Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy." *Nat Chem Biol* **11**(1): 9-15.
- Wen, P. Y., S. Kesari and J. Drappatz (2006). "Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment." *Expert Rev Anticancer Ther* **6**(5): 733-754.
- Wesolowska, A., A. Kwiatkowska, L. Slomnicki, M. Dembinski, A. Master, M. Sliwa, K. Franciszkiewicz, S. Chouaib and B. Kaminska (2008). "Microglia-derived TGF-beta as an important regulator of glioblastoma invasion--an inhibition of TGF-beta-dependent effects by shRNA against human TGF-beta type II receptor." *Oncogene* **27**(7): 918-930.
- Wilson, R. S., D. R. Weir, S. E. Leurgans, D. A. Evans, L. E. Hebert, K. M. Langa, B. L. Plassman, B. J. Small and D. A. Bennett (2011). "Sources of variability in estimates

- of the prevalence of Alzheimer's disease in the United States." Alzheimers Dement **7**(1): 74-79.
- Wolf, A., S. Agnihotri and A. Guha (2010). "Targeting metabolic remodeling in glioblastoma multiforme." Oncotarget **1**(7): 552-562.
- Wolf DE, H. C., Trenner NR, et al. (1958). "Coenzyme Q. Structure studies on the coenzyme Q group." J. Am. Chem. Soc. **80**: 3.
- Wondrak, G. T. (2009). "Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities." Antioxid Redox Signal **11**(12): 3013-3069.
- Wong, M. K. and A. I. Gotlieb (1984). "In vitro reendothelialization of a single-cell wound. Role of microfilament bundles in rapid lamellipodia-mediated wound closure." Lab Invest **51**(1): 75-81.
- Wynford-Thomas, D., J. A. Bond, F. S. Wyllie and C. J. Jones (1995). "Does telomere shortening drive selection for p53 mutation in human cancer?" Mol Carcinog **12**(3): 119-123.
- Xia, W., W. Fu, X. Cai, M. Wang, H. Chen, W. Xing, Y. Wang, M. Zou, T. Xu and D. Xu (2015). "Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating NF-kappaB signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3." PLoS One **10**(2): e0116983.
- Xia, Y., S. Shen and I. M. Verma (2014). "NF-kappaB, an active player in human cancers." Cancer Immunol Res **2**(9): 823-830.
- Yang, X., G. Dai, G. Li and E. S. Yang (2010). "Coenzyme Q10 reduces beta-amyloid plaque in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease." J Mol Neurosci **41**(1): 110-113.
- Yang, X., Y. Yang, G. Li, J. Wang and E. S. Yang (2008). "Coenzyme Q10 attenuates beta-amyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation." J Mol Neurosci **34**(2): 165-171.
- Ye, X. Z., S. L. Xu, Y. H. Xin, S. C. Yu, Y. F. Ping, L. Chen, H. L. Xiao, B. Wang, L. Yi, Q. L. Wang, X. F. Jiang, L. Yang, P. Zhang, C. Qian, Y. H. Cui, X. Zhang and X. W. Bian (2012). "Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway." J Immunol **189**(1): 444-453.
- Yu, H., D. Pardoll and R. Jove (2009). "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3." Nat Rev Cancer **9**(11): 798-809.
- Yu, Z., G. Xie, G. Zhou, Y. Cheng, G. Zhang, G. Yao, Y. Chen, Y. Li and G. Zhao (2015). "NVP-BE2235, a novel dual PI3K-mTOR inhibitor displays anti-glioma activity and reduces chemoresistance to temozolomide in human glioma cells." Cancer Lett **367**(1): 58-68.
- Yuan, Y., X. Xue, R. B. Guo, X. L. Sun and G. Hu (2012). "Resveratrol enhances the antitumor effects of temozolomide in glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR signaling pathway." CNS Neurosci Ther **18**(7): 536-546.
- Yue, W. Y. and Z. P. Chen (2005). "Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma?" J Histochem Cytochem **53**(8): 997-1002.
- Yun, J., C. Rago, I. Cheong, R. Pagliarini, P. Angenendt, H. Rajagopalan, K. Schmidt, J. K. Willson, S. Markowitz, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr., V. E. Velculescu, C. Lengauer, K. W.

- Kinzler, B. Vogelstein and N. Papadopoulos (2009). "Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells." *Science* **325**(5947): 1555-1559.
- Zamin, L. L., E. C. Filippi-Chiela, P. Dillenburg-Pilla, F. Horn, C. Salbego and G. Lenz (2009). "Resveratrol and quercetin cooperate to induce senescence-like growth arrest in C6 rat glioma cells." *Cancer Sci* **100**(9): 1655-1662.
- Zanotto-Filho, A., E. Braganhol, M. I. Edelweiss, G. A. Behr, R. Zanin, R. Schroder, A. Simoes-Pires, A. M. Battastini and J. C. Moreira (2012). "The curry spice curcumin selectively inhibits cancer cells growth in vitro and in preclinical model of glioblastoma." *J Nutr Biochem* **23**(6): 591-601.
- Zhang, D., B. Yan, S. Yu, C. Zhang, B. Wang, Y. Wang, J. Wang, Z. Yuan, L. Zhang and J. Pan (2015). "Coenzyme Q10 inhibits the aging of mesenchymal stem cells induced by D-galactose through Akt/mTOR signaling." *Oxid Med Cell Longev* **2015**: 867293.
- Zhang, Y., F. Aberg, E. L. Appelkvist, G. Dallner and L. Ernster (1995). "Uptake of dietary coenzyme Q supplement is limited in rats." *J Nutr* **125**(3): 446-453.
- Zhang, Y., Q. Liu, F. Wang, E. A. Ling, S. Liu, L. Wang, Y. Yang, L. Yao, X. Chen, F. Wang, W. Shi, M. Gao and A. Hao (2013). "Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1 α ." *J Pineal Res* **55**(2): 121-130.
- Zhong, D., G. He, S. Zhao, J. Li, Y. Lang, W. Ye, Y. Li, C. Jiang and X. Li (2015). "LRG1 modulates invasion and migration of glioma cell lines through TGF-beta signaling pathway." *Acta Histochem* **117**(6): 551-558.
- Zhou, J. H., H. Y. Cheng, Z. Q. Yu, D. W. He, Z. Pan and D. T. Yang (2011). "Resveratrol induces apoptosis in pancreatic cancer cells." *Chin Med J (Engl)* **124**(11): 1695-1699.
- Zhu, X., M. A. Smith, K. Honda, G. Aliev, P. I. Moreira, A. Nunomura, G. Casadesus, P. L. Harris, S. L. Siedlak and G. Perry (2007). "Vascular oxidative stress in Alzheimer disease." *J Neurol Sci* **257**(1-2): 240-246.

