

Memoria Final
Proyecto de Investigación-Fundación Domingo Martínez
Marzo 2005

| Título del Proyecto |
|--|
| "Estudio del efecto del óxido nítrico sobre la proliferación de las células musculares lisas de la vasculatura cerebral: implicaciones fisiopatológicas en la enfermedad de Alzheimer" |

| Investigador Principal |
|---|
| Apellidos y nombre: Muñoz López , Francisco José DNI.: 4.161.287-N Entidad: Universidad Pompeu Fabra Centro: Facultad de Ciencias de la Salud y de la Vida Departamento o Servicio: Ciencias Experimentales y de la Salud Puesto: Profesor Lector de Fisiología Dirección postal completa: C/ Dr. Aiguader, 80 Teléfono: 93 542 28 84 Fax: 93 542 28 02 Correo electrónico: paco.munoz@upf.edu |

Firma del Investigador principal

Fdo.: Francisco J. Muñoz López
En Barcelona a 7 de Marzo de 2005

Memoria Científico-Técnica del Proyecto

Resultados obtenidos

El presente proyecto se inició en 2003 y ha sido recientemente concluido. En su realización se han evaluado los efectos del óxido nítrico (NO) sobre células vasculares y neuronales en la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA). Los resultados obtenidos se especifican a continuación:

1. No hemos encontrado ningún efecto significativo de modulación por NO de la proliferación celular sobre líneas celulares de miocitos vasculares, endotelio y neuroblastos. Los dadores de NO se utilizaron desde el rango nanomolar hasta 500 μ M. Sin embargo, una clara asociación entre muerte celular y NO en presencia de productores de daño oxidativo se estableció en todas las líneas celulares. Esto es debido a la reacción del NO con el anión superóxido para producir peroxinitrito. El peroxinitrito tiene la capacidad de oxidar macromoléculas o bien nitrar proteínas en residuos de tirosina, produciendo la pérdida de la función biológica de tales proteínas. La producción de nitrotirosinación tanto por dadores de NO (en todas las líneas celulares) como por activación de los receptores de estrógenos (en cuatro líneas de células endoteliales) en presencia de productores de daño oxidativo (H_2O_2 y fibras de péptido β -amiloide) condujo a la muerte celular afectando a proteínas involucradas en distintas funciones celulares como son la producción de energía (triosa fosfato isomerasa), integridad del citoesqueleto (TCPB, metavinculina), metabolismo de proteínas (mtHSP75, factor 2 de elongación transcripcional eucariota, proteosoma 26S) y protección antioxidante (peroxiredoxina 6). La presencia de nitrotirosinación asociada a depósitos de amiloide fue también demostrada en cortes histológicos de tejido cerebral de pacientes de EA tanto en el parénquima cerebral como en los vasos.

Todos estos datos se han presentado en un artículo que será publicado próximamente por la revista Brain (se adjunta el manuscrito y la carta de aceptación de publicación). En la sección de agradecimientos (“Acknowledgments”) se explicita la contribución de la Fundación Domingo Martínez en la realización de este trabajo. Parte de estos resultados fueron presentados en el tercer congreso internacional “Rapid responses to steroid

hormones”. El abstract del congreso se adjunta en esta memoria.

2. Los miocitos vasculares son productores de amiloide y contribuyen a los depósitos amiloideos vasculares cerebrales que concurren en la EA. Este proceso puede ser activado por estrés oxidativo. En el presente proyecto hemos evaluado la contribución del NO sobre la ruta amiloidogénica de la proteína precursora del amiloide (APP). A dosis de NO inferiores a 500 μ M hemos encontrado un efecto protector del NO por inhibición de la ruta amiloidogénica. Aunque no es experimentalmente posible cuantificar la producción final de amiloide, la inhibición por NO de la ruta amiloidogénica presenta interesantes perspectivas terapéuticas.

Las bases para el desarrollo de este apartado se incluyeron en un capítulo del libro “Alzheimer’s disease: cellular and molecular aspects of amyloid beta” de reciente publicación, cuya original se adjunta. En la sección de agradecimientos (“Acknowledgments”) se explicita la contribución de la Fundación Domingo Martínez en la realización de este trabajo.

3. El efecto relajante del NO sobre la musculatura vascular es producido por la apertura de los canales de maxi-potasio que hiperpolarizan al miocito vascular y lo hacen refractario al disparo de potenciales de acción que inducen contracción por entrada de calcio. En un principio planteamos la posibilidad de que el propio NO modulara la expresión de dichos canales como un mecanismo protector a largo plazo. Sin embargo hemos realizado experimentos que demuestran que la aplicación de dadores de NO durante 24 horas no produce cambios significativos en la actividad y expresión de los canales de maxi-potasio en distintos modelos celulares
4. El NO tiene otras funciones fisiológicas independientes de la relajación de los miocitos vasculares. Así existen distintas formas de la enzima productora de NO (NOS, nitric oxide synthase) todas ellas presentes en cerebro. Dentro del presente proyecto hemos elaborado una amplia revisión sobre la fisiología y la fisiopatología del NO en el cerebro que se envió para su publicación a la revista Progress in Neurobiology (se adjunta el manuscrito y el estado actual del proceso de revisión). En este trabajo se incluyó un

trabajo histológico realizado con cortes de corteza frontal de pacientes con EA e individuos controles, demostrándose una clara relación entre los depósitos de amiloide y la presencia de nitrotirosinación proteica en los pacientes de EA. En la sección de agradecimientos (“Acknowledgments”) se explicita la contribución de la Fundación Domingo Martínez en la realización de este trabajo.

Resumen

El óxido nítrico (NO) realiza otras funciones fisiológicas distintas a la relajación de la musculatura lisa vascular. En el presente proyecto nos hemos centrado en el estudio de las implicaciones patológicas de la producción de NO en un ambiente prooxidativo dentro de la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad que se caracteriza por la presencia de depósitos de péptido β -amiloide tanto en el parénquima cerebral como en la vasculatura cerebral. El péptido β -amiloide produce radicales libres siendo una fuente de anión superóxido. Este compuesto reacciona con mayor afinidad con el NO que con la superóxido dismutasa, atrapando todo el NO para producir peroxinitrito. El peroxinitrito es un potente oxidante per se a la vez que inhibe irreversiblemente la actividad de proteínas mediante la nitrotirosinación de proteínas.

Dentro del presente proyecto hemos observado que las células vasculares presentan altos niveles de nitrotirosinación en presencia de fibras de péptido β -amiloide. La nitrotirosinación de proteínas aumentaba en presencia de dadores de NO sintéticos o por el tratamiento con 17β -estradiol, el cual es conocido por su capacidad para activar a las sintasas de NO a través de los receptores alpha presentes en las caveolas de la membrana. Este aumento en la nitrotirosinación se correlacionó directamente con aumento de la muerte celular. Cuando la producción de NO se inhibió por inactivación de la enzima (con L-NNA) o por captura del NO (con PTIO) se observó una drástica disminución de la nitrotirosinación proteica concomitante con un aumento en la viabilidad celular. Las proteínas nitrotirosinadas están involucradas en distintas funciones celulares como son la producción de energía (triosa fosfato isomerasa), integridad del citoesqueleto (TCPB, metavinculina), metabolismo de proteínas (mtHSP75, factor 2 de elongación transcripcional eucariota, proteosoma 26S) y protección antioxidante (peroxiredoxina 6). La presencia de nitrotirosinación asociada a depósitos de amiloide fue también demostrada en cortes histológicos de tejido cerebral de pacientes de EA tanto en el parénquima cerebral como en los vasos.

Este trabajo de investigación contribuye experimentalmente a establecer las bases fisiopatológicas de la posible falta de protección por parte de los estrógenos en el tratamiento de procesos vasculares que cursan con daño oxidativo, principalmente en la angiopatía cerebral amiloidea que aparece en la EA.