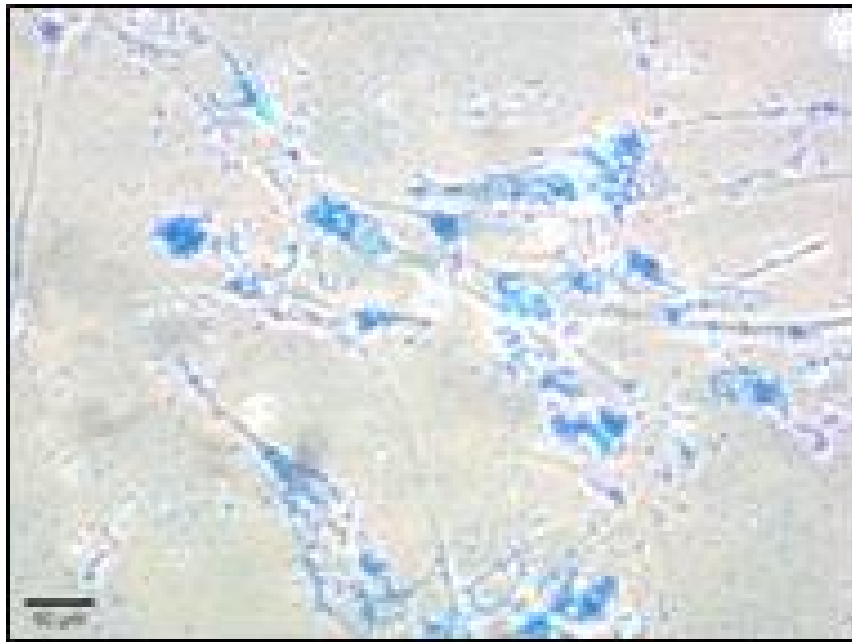


• **Título del proyecto**

Medicina de precisión para la distrofia neuroaxonal infantil (INAD)



Células INAD

• **Investigador Principal**

José Antonio Sánchez Alcázar, Catedrático de Biología Celular,
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo-CSIC-Universidad Pablo de Olavide,
Sevilla, España.



• Resumen del proyecto

La neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (NACH o NBIA en inglés) es un grupo de trastornos neurodegenerativos raros caracterizados por disfunción del sistema nervioso central y acumulación de hierro en ciertas áreas del cerebro que causa discapacidad progresiva de los pacientes. Se han detectado mutaciones asociadas a las NACHs en más de quince genes. Estos genes están involucrados en vías celulares aparentemente no relacionadas, como el metabolismo del hierro, el metabolismo de los lípidos, la síntesis de coenzima A y la autofagia. La neurodegeneración asociada a la fosfolipasa A2 del grupo VI (PLA2G6) (PLAN) es uno de los subtipos NACH más prevalentes. Clínicamente comprende tres fenotipos con características clínicas y radiológicas superpuestas: la distrofia neuroaxonal infantil (**INAD**), la distrofia neuroaxonal atípica (NAD atípica) y la distonía-parkinsonismo relacionada con PLA2G6. En la actualidad no existen tratamientos efectivos para esta enfermedad.

La PLA2G6 es una proteína responsable de hidrolizar glicerofosfolípidos para producir lisofosfolípidos y ácidos grasos libres. Su actividad es crucial en el mantenimiento de la homeostasis y la integridad de las membranas a través del reciclaje de los fosfolípidos oxidados. Aunque es una proteína expresada ubicuamente, los síntomas de PLAN son especialmente de afectación neurológica.

El objetivo general de este proyecto es comprender la patogénesis de INAD y encontrar tratamientos correctivos utilizando los fibroblastos y las células neuronales inducidas derivadas de los pacientes con INAD. Con este objetivo, el proyecto propone la caracterización de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad en los fibroblastos y las células neuronales inducidas derivadas de los pacientes con mutaciones PLA2G6 y la evaluación de la eficacia en la mejora de las alteraciones patológicas mediante una biblioteca de compuestos farmacológicos comerciales y aprobadas por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Food Drug Administration (FDA, EEUU). En una primera etapa, se realizará un cribado farmacológico en los fibroblastos INAD. Paralelamente, las células neuronales se generarán mediante reprogramación directa. Los compuestos más favorables en el cribado de fibroblastos se seleccionarán para su evaluación en las células neuronales inducidas.

Nuestro proyecto se enmarca en las principales prioridades de investigación en INAD ya que generará modelos celulares de la enfermedad y tiene como objetivo identificar compuestos farmacológicos comerciales para ser utilizados en ensayos clínicos.

•Objetivos

El objetivo general de este proyecto es caracterizar los mecanismos fisiopatológicos en los fibroblastos y células neuronales derivadas de pacientes con mutaciones en la PLA2G6 (INAD) y rescatar las alteraciones fisiopatológicas mediante una biblioteca de fármacos aprobados por la EMA y la FDA (incluidos los fármacos más comunes utilizados en el tratamiento de pacientes con NACH en la práctica clínica).

Hipótesis

Nuestra hipótesis propone que el tratamiento de los fibroblastos y células neuronales derivadas de pacientes con INAD con una amplia gama de opciones farmacológicas disponibles actualmente y el seguimiento de su efecto sobre los cambios fisiopatológicos ayudarán a una mejor elección terapéutica. El modelo también será útil para probar la eficacia de las nuevas opciones terapéuticas desarrolladas en el futuro. Los resultados preliminares de nuestro grupo han demostrado que los fibroblastos derivados de los pacientes que albergan mutaciones en PLA2G6 pueden reproducir muchas de las alteraciones patológicas encontradas en la enfermedad, como la peroxidación lipídica de las membranas celulares y la acumulación intracelular de hierro/lipofuscina (1). Además, los tratamientos específicos han sido capaces de eliminar la sobrecarga de hierro/lipofuscina y restaurar las alteraciones patológicas. Estos resultados nos animan a proponer nuestro modelo de cribado como una forma rápida y fácil de encontrar tratamientos para INAD y otras enfermedades neurodegenerativas asociadas con la peroxidación lipídica y la acumulación de hierro/lipofuscina.



Objetivos Específicos:

1) Caracterización de la fisiopatología de INAD en los fibroblastos derivados de los pacientes con mutaciones PLA2G6. Selección de las alteraciones celulares adecuadas para la evaluación del cribado farmacológico. 2) Cribado de alto rendimiento de medicamentos aprobados por la EMA y la FDA utilizando fibroblastos derivados de pacientes con INAD. 3) Generación de neuronas inducidas a partir de fibroblastos derivados de pacientes. 4) Los compuestos positivos en el cribado farmacológico en los fibroblastos serán evaluados en su capacidad para corregir las alteraciones patológicas en las neuronas INAD inducidas.

•Resultados esperados

La neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (NACH/NBIA) es un grupo de trastornos neurológicos hereditarios caracterizados por disfunción extrapiramidal progresiva (distonía, rigidez, coreoatetosis), acumulación de hierro en el cerebro y presencia de esferoides axonales, correspondientes a neuronas degeneradas, generalmente limitadas al sistema nervioso central (2, 3). Actualmente, no existen tratamientos efectivos para estos trastornos. Hasta el momento, se conocen más de quince genes establecidos con sus mutaciones causantes de los diferentes subtipos de NACH. Cada mutación causa diferentes variantes de la enfermedad con síntomas comunes. Entre ellas, las mutaciones en el gen de la fosfolipasa A2 del grupo 6 (PLA2G6) causan fosfolipasa Associated Neurodegeneration (PLAN) que es la segunda causa más frecuente de NACH. PLAN comprende tres fenotipos con características clínicas y radiológicas superpuestas: la distrofia neuroaxonal infantil (INAD), la distrofia neuroaxonal atípica (NAD atípica), que comienza unos años más tarde en la vida que INAD, y la distonía-parkinsonismo relacionada con PLA2G6 cuyo inicio ocurre en la segunda a tercera década de la vida (4, 5). Estos fenotipos se caracterizan patológicamente por la presencia de esferoides axonales y acumulación de hierro cerebral y clínicamente por disfunción motora y deterioro cognitivo. La PLA2G6 codifica la fosfolipasa A2 independiente del calcio 85/88-kd (iPLA2-VIA), una enzima que cataliza la liberación de ácidos grasos de los fosfolípidos. Su actividad es crucial para la homeostasis y la integridad de las membranas celulares a través del reciclaje de los fosfolípidos oxidados. Dentro del grupo PLA2s, se han identificado 4 grupos que albergan más de 20 proteínas. Específicamente, iPLA2-VIA se localiza en el citosol, las membranas celulares, incluidas las membranas mitocondriales y la envoltura nuclear. Aunque es una proteína expresada ubicuamente, los síntomas son especialmente de afectación neurológica. Esto se debe a que iPLA2-VIA es responsable de hasta el 70% de la actividad total de PLA2s en el cerebro.(4-6).

Se ha postulado que uno de los mecanismos que causan la enfermedad de INAD es la incapacidad de reciclar los fosfolípidos oxidados y dañados en las membranas celulares (6). Sin embargo, la conexión entre esta alteración y la deposición progresiva de hierro cerebral durante el curso de la enfermedad no se ha dilucidado completamente. El daño oxidativo, el aumento de la peroxidación lipídica de las membranas celulares que no se regeneran dentro del cerebro, junto con la acumulación intracelular de hierro, son los mecanismos causales más probables que conducen a la muerte neural. Sin embargo, la mayoría de los mecanismos fisiopatológicos que acompañan a la enfermedad son desconocidos (7).

Aunque hay modelos murinos de la enfermedad (8), las células derivadas de los pacientes con INAD pueden ser un modelo alternativo para la investigación básica y la evaluación de posibles terapias. Así, se ha demostrado que los fibroblastos derivados de los pacientes con INAD muestran un aumento de la peroxidación lipídica y alteraciones en el estado redox celular (6, 9). Además, los cribados farmacológicos en los fibroblastos pueden permitir la identificación de posibles tratamientos de forma personalizada. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo, apoyados en estudios previos en células derivadas de pacientes con otros subtipos de NACH (6, 9, 10) confirman que los fibroblastos INAD son un modelo adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares responsables de la enfermedad (1). Por otro lado, la reprogramación directa de fibroblastos derivados de pacientes a neuronas inducidas (células iN) permite investigar

la fisiopatología de la enfermedad directamente en las células más afectadas en los pacientes con INAD (11-13).

•Resultados preliminares

Los resultados previos de nuestro grupo han demostrado claramente que los fibroblastos derivados de los pacientes que albergan mutaciones en la PLA2G6 pueden reproducir muchas de las alteraciones patológicas celulares encontradas en la enfermedad, como el aumento de la peroxidación lipídica y la acumulación de hierro/lipofuscina (1). Además, los tratamientos específicos han sido capaces de prevenir la peroxidación lipídica y la sobrecarga de hierro (Figuras 1 y 2) y corregir las principales alteraciones patológicas celulares. Actualmente, hemos identificado **más de 12 compuestos positivos**.

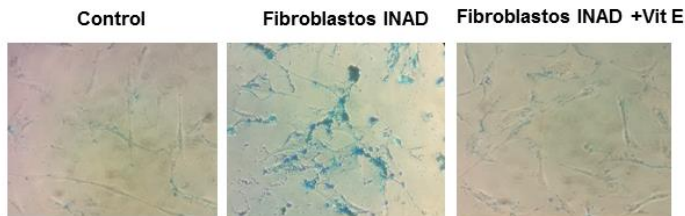


Figure 1. Tinción de Prussian Blue de fibroblastos Control e INAD. La acumulación de hierro en los fibroblastos INAD fue eliminada con el tratamiento con 50 μ M de vitamina E (Vit E).

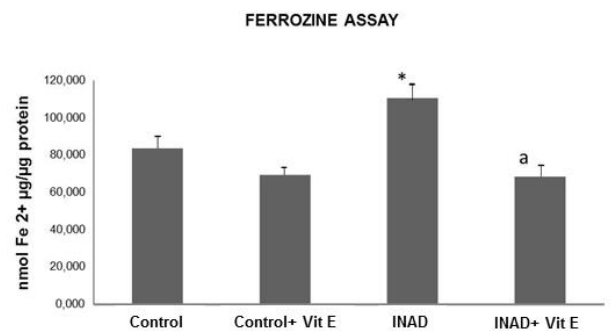


Figure 2. Ensayo de Ferrozine en extractos celulares de fibroblastos control e INAD tratados con 50 μ M de vitamina E (Vit E). *P<0,01, entre paciente yControl; ^aP< 0,01 entre paciented con y sin tratamiento.

Además, para dilucidar el papel de la peroxidación lipídica en la acumulación de hierro, evaluamos el efecto de la peroxidación inducida por peróxido de di-tert-butilo (tBHP) en los fibroblastos control. El tratamiento de los fibroblastos control con peróxido de di-tert-butilo aumentó la peroxidación lipídica, la acumulación de hierro y condujo a cambios morfológicos similares a la senescencia celular, exhibiendo un fenotipo similar a los fibroblastos mutantes INAD (1). La suplementación de células control con FeCl₂ también indujo sobrecarga de hierro y peroxidación lipídica. Estos resultados sugieren que la peroxidación lipídica per se induce la acumulación de hierro, y que la acumulación de hierro induce la peroxidación lipídica en un círculo vicioso (Figura 3) (1).

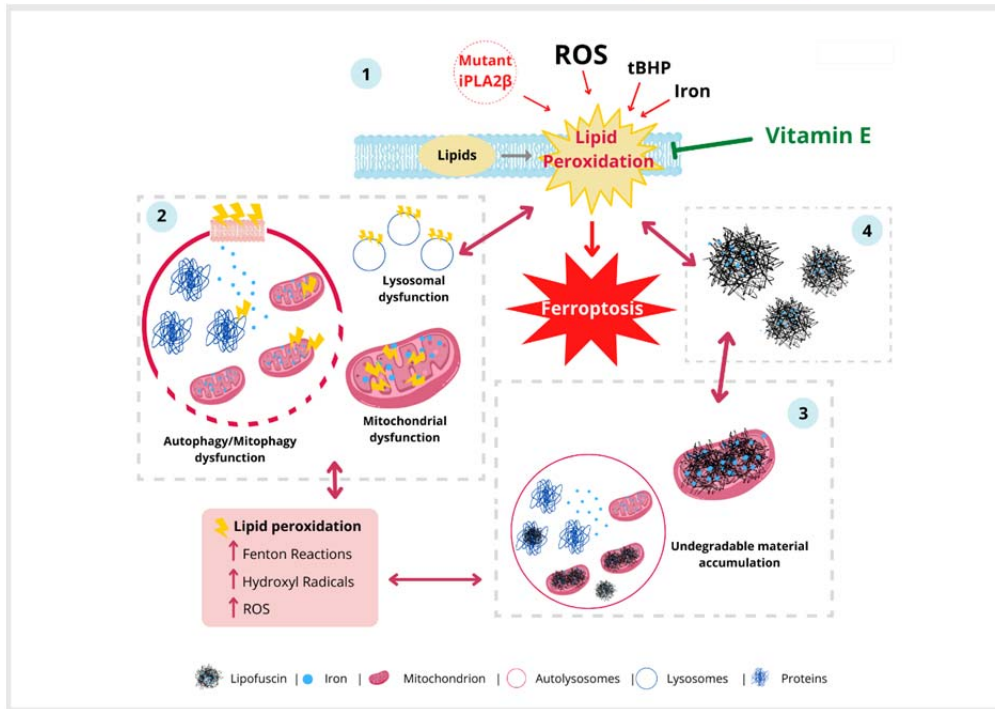


Figura 3- Acumulación de hierro/lipofuscina y peroxidación lipídica: un circuito vicioso en las enfermedades neurodegenerativas 1. La peroxidación lipídica en las mitocondrias, los lisosomas, el retículo endoplásmico y las membranas plasmáticas causada por las especies reactivas de oxígeno (ROS), tBHP (peróxido de di-terc-butilo), las mutaciones en la iPLA2 β , (fosfolipasa A2 grupo VI independiente del calcio) o hierro. 2. La peroxidación lipídica se ve reforzada por los ROS y la reacción Fenton que conduce a la disfunción de la autofagia, los lisosomas y las mitocondrias. 3. La agregación de proteínas peroxidadas y lípidos conduce a la lipofuscinogénesis. 4. Los gránulos de lipofuscina ricos en hierro aumentan la peroxidación lipídica. Eventualmente, las neuronas mueren por ferroptosis.

-Fundamento. Como consideración general podemos decir que actualmente no existen tratamientos curativos para INAD. Pretendemos utilizar al mismo tiempo dos plataformas, una con fibroblastos derivados de pacientes con INAD, y una segunda con neuronas inducidas generadas por reprogramación directa. Ambas plataformas podrán identificar de manera personalizada los mejores compuestos capaces de corregir las alteraciones patológicas asociadas a la mutación PLA2G6 específica en estudio. Los resultados preliminares de nuestro grupo sostienen la hipótesis de que los fibroblastos y las neuronas inducidas portadoras de mutaciones PLA2G6 pueden utilizarse como modelos para la identificación de nuevas opciones terapéuticas.

- Interpretación. Los compuestos positivos en los fibroblastos y células neuronales inducidas serán buenos candidatos para su evaluación en estudios con modelos animales y/o ensayos clínicos.

- Métodos

Fibroblastos INAD. Los cultivos de fibroblastos se han obtenido a partir de biopsias de piel de los pacientes de acuerdo con las Declaraciones de Helsinki de 1964, revisadas en 2001. Nuestra cohorte incluye 4 pacientes con mutaciones en la PLA2G6 con diagnóstico clínico y radiológico de INAD. Además, se han obtenido tres líneas celulares de fibroblastos control derivadas de individuos sanos de la ATCC (American Type Culture Collection). El proyecto ha sido autorizado por el Comité de Ética del Hospital Virgen Macarena y el Hospital Virgen del Rocío (Sevilla, España).



Tarea 1. Caracterización de los mecanismos fisiopatológicos de INAD en los fibroblastos derivados de los pacientes. Selección de las alteraciones celulares adecuadas para la evaluación del cribado farmacológico. La acumulación de hierro se ha postulado como una alteración patológica principal en las células NACH. Los experimentos preliminares de nuestro grupo han demostrado que los fibroblastos mutantes INAD presentan alteraciones morfológicas características acompañadas de acumulación de hierro/lipofuscina. Por lo tanto, la evaluación de los cambios en ambas alteraciones se utilizará como lecturas finales para las estrategias de cribado.

Morfología celular. La morfología celular se evaluará mediante microscopía óptica y se analizará utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, USA). **Prueba de detección de acumulación de hierro.** La acumulación de hierro será examinada por la reacción del azul de Prusia de Perls (14). La tinción de Perls se cuantificará en un lector de microplacas (estrella polar Omega) y mediante microscopía óptica. Las imágenes y el análisis de cuantificación de microscopía óptica se realizarán utilizando el software ImageJ. La acumulación de hierro se confirmará mediante ensayo de ferrozina, espectroscopia de absorción de llama y espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). **Acumulación de lipofuscina.** La acumulación de lipofuscina se evaluará mediante la tinción de Sudán Black B (SBB) y la detección de autofluorescencia como se ha descrito anteriormente (15). La cuantificación de la tinción SSB se realizará en un lector de microplacas (Polar star Omega, BMG Labtech) y mediante microscopía óptica. La detección de autofluorescencia se realizará mediante microscopía de fluorescencia.

Tarea 2. Cribado de fármacos aprobados por la EMA y FDA utilizando los fibroblastos derivados de los pacientes con INAD y estudio de la corrección de las alteraciones patológicas.

Tarea 2.1. Cribado de una biblioteca de 426 fármacos aprobados por la EMA y la FDA (Food Drug Administration, EEUU) de Selleck Chemicals (Houston, TX, EEUU) y una selección de compuestos habitualmente utilizados en el tratamiento de pacientes con NACH (quelantes del hierro como la deferiprona, antioxidantes como la coenzima Q₁₀ o la vitamina E, etc.), a diferentes concentraciones teniendo en cuenta la ED₅₀ (dosis o concentración que causa el 50% del efecto biológico máximo de interés). Consideraremos compuestos positivos aquellos que no son tóxicos y capaces de revertir la morfología celular y disminuir la acumulación de hierro y lipofuscina en los fibroblastos INAD en más del 75%.

Tarea 2.2. Confirmación de la eficacia de los principios activos seleccionados. Para confirmar el rescate de las alteraciones patológicas en los fibroblastos INAD, se realizarán diferentes ensayos en los fibroblastos control y mutantes con los compuestos positivos. Examinaremos el metabolismo del hierro, incluida la reserva de hierro total y lábil (LIP), la expresión y actividad de PLA2G6, la peroxidación lipídica de las membranas, la expresión de proteínas mitocondriales, el estrés oxidativo, la bioenergética celular, los niveles de muerte celular espontánea e inducida, y la activación de la mitofagia y la biogénesis mitocondrial.

Metabolismo del hierro. Para examinar el efecto de los compuestos seleccionados en el cribado inicial en los fibroblastos INAD, se estudiará la homeostasis del hierro. La incorporación de hierro radiomarcado, y la determinación total y LIP se llevarán a cabo como se ha descrito anteriormente (10, 16, 17). Los niveles de expresión de la proteína de unión a elementos sensibles al hierro 1 (IRP1) y receptor de transferrina 1 (TfR1) se determinarán mediante Western blotting. Los contenidos de ferritina H (FtH) y ferritina L (FtL) se determinarán en extractos solubles de fibroblastos mediante ELISA. La actividad de unión a IRP1 se determinará mediante un ensayo de cambio de movilidad en la separación electroforética (EMSA) como se ha descrito anteriormente (18).



Análisis bioenergético y del estrés oxidativo. La función de las mitocondrias y los niveles de estrés oxidativo se examinarán en los fibroblastos INAD. Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial y la citrato sintasa (CS) se determinarán en los fibroblastos permeabilizados utilizando métodos espectrofotométricos descritos anteriormente (19). Los ensayos bioenergéticos se realizarán utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24. La generación de superóxido mitocondrial en los fibroblastos se evaluará utilizando MitoSOX Red. Las proteínas oxidadas se detectarán utilizando el kit de detección de oxidación de proteínas Oxyblot (Chemicon International) siguiendo las instrucciones del fabricante. La peroxidación lipídica se evaluará midiendo la oxidación de C11-BODIPY581/591 (Molecular Probes). La peroxidación lipídica mitocondrial será evaluada por MitoPeDPP (Dojindo Molecular Technologies, Inc.).

Análisis de lípidos. Dado que el metabolismo lipídico se altera con frecuencia en pacientes con NACH, el análisis de ácidos grasos y acil-coenzima A en las células se realizará mediante técnicas de espectrometría de masas/cromatografía de gases (GC-MS) como se ha descrito anteriormente (20, 21).

Ensayos de autofagia y mitofagia en los fibroblastos que albergan mutaciones PLA2G6. La mitofagia se caracterizará mediante las siguientes técnicas: 1) Observación de autofagosomas por microscopía electrónica, 2) Aumento de la actividad lisosomal: ensayo de beta-galactosidasa, 3) Colocalización de marcadores mitocondriales como el citocromo c con marcadores lisosomales como cathepsina o Lysotracker (Invitrogen), 4) Colocalización de marcadores mitocondriales con marcadores autofagosómicos (LC3), 5) Expresión de genes (ATG) y proteínas implicadas en la mitofagia mediante Western blot y PCR en tiempo real, 6) El flujo autofágico se examinará mediante la incubación de fibroblastos con bafilomicina y la determinación de los niveles de CL3-II mediante Western blotting (22).

Ferritinofagia. La ferritinofagia se analizará siguiendo el recambio y la localización lisosomal de NCOA4, un receptor de carga de autofagia que se une a la ferritina y es necesario para la degradación lisosomal de esta proteína por los autofagosomas. Alternativamente, examinaremos los niveles de expresión de ferritina después del tratamiento con deferoxamina (DFO), un quelante del hierro que estimula la degradación de la ferritina (23).

Análisis molecular de las vías implicadas en la biogénesis mitocondrial como mecanismo compensatorio en respuesta a la activación de la mitofagia en fibroblastos portadores de mutaciones PLA2G6. La mitofagia debe ir acompañada de la activación de la biogénesis mitocondrial para compensar la pérdida mitocondrial. Sin embargo, la mitofagia extensa y persistente puede afectar la bioenergética celular, el flujo autofágico y la biogénesis mitocondrial y, finalmente, puede causar la muerte celular. Por lo tanto, examinaremos la masa mitocondrial (actividad de citrato sintasa y tinción de naranja de acridina) y los niveles de expresión de factores de biogénesis mitocondrial como el factor de transcripción mitocondrial Tfam, el factor respiratorio nuclear NRF-1 y NRF-2 y la proteína 1 α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1-alfa) por PCR en tiempo real y Western blotting.

Muerte celular espontánea e inducida. La apoptosis inducida se estudiará mediante el tratamiento de las células con camptotecina (un inhibidor de la topoisomerasa I), retirada del suero, estaurosporina (inhibidor de la proteína quinasa C) o suplementación con sales de hierro o H₂O₂. La apoptosis se evaluará mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia (24). La ferroptosis, una forma de muerte celular inducida por la peroxidación de fosfolípidos dependiente de hierro, se evaluará observando si la muerte celular se previene con inhibidores de la ferroptosis (quelantes del hierro, ferrostatina-1, liproxestatina-1) y midiendo los peróxidos lipídicos (ensayo C11-BODIPY581/591) y la cuantificación de malondialdehído mediante un kit colorimétrico (Abcam).



Expresión de transcritos y proteínas mutantes. Los cambios en los niveles de expresión de los transcritos y proteínas mutantes se evaluarán mediante PCR en tiempo real y Western blotting.

Tarea 3. Generación de neuronas inducidas (iNs) a partir de los fibroblastos derivados de pacientes con INAD. Las neuronas inducidas se generarán a partir de dos líneas celulares representativas de los fibroblastos INAD. Para la reprogramación directa, seguiremos los protocolos estándar descritos previamente en la literatura (11-13, 25).

Reprogramación directa de los fibroblastos de pacientes con INAD a células iNs: Utilizaremos vectores lentivirales que contengan factores de transcripción específicos del linaje neural. Veinticinco días después de la infección, las células neuronales se identificarán por la expresión de TAU y la proteína citoesquelética específica de la neurona MAP2. Las células DAPI+, MAP2+ y TAU+ se considerarán neuronas inducidas. El ensayo para la caracterización neuronal se realizará mediante inmunocitoquímica y RT-PCR cuantitativa (11-13). Los ensayos electrofisiológicos también confirmarán la excitabilidad de las neuronas inducidas (26).

Tarea 4. Los compuestos positivos en el cribado de fibroblastos se evaluarán en las células neuronales diferenciadas. Después de la reprogramación neuronal directa, se examinarán las alteraciones fisiopatológicas celulares (mediante los ensayos descritos en la tarea 1 y 2) y los cambios electrofisiológicos. A continuación, se evaluarán los compuestos positivos obtenidos en el cribado en los fibroblastos sobre su capacidad para restaurar las alteraciones patológicas en células neuronales mutantes.

Estadística. Los datos se evaluarán mediante ANOVA unidireccional y mediante la prueba t de Student, utilizando el programa de estadísticas IBM SPSS versión 20. El análisis de los resultados del cribado se realizará gracias a la integración de los resultados obtenidos de las herramientas de análisis de datos (Genedata Screener, Genedata). El análisis bioinformático de los resultados para determinar las puntuaciones Z se realizará como se describió anteriormente (27). En el cribado, los ensayos con un factor Z superior a 0,5 se considerarán suficientemente robustos.

•Impacto clínico/importancia de la investigación

Utilizaremos simultáneamente dos modelos biológicos para estudiar la enfermedad: cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con INAD y cultivos de neuronas inducidas generadas por reprogramación directa. Ambos modelos permitirán identificar los compuestos idóneos para corregir las alteraciones patológicas asociadas a la mutación PLA2G6 específica en estudio. Nuestro proyecto se enmarca en las principales prioridades de investigación del INAD porque generará modelos celulares de la enfermedad y tiene como objetivo identificar compuestos farmacológicos que puedan ser utilizados en ensayos clínicos controlados. Durante este proyecto, también intentaremos responder a las siguientes preguntas clave, con el objetivo de aclarar el papel de la peroxidación lipídica en la acumulación de hierro/lipofuscina y los procesos neurodegenerativos: ¿Cómo induce la peroxidación lipídica la acumulación de hierro? ¿Cómo afecta la peroxidación lipídica a la autofagia y a la renovación de los orgánulos celulares? ¿Cómo afecta la peroxidación lipídica a las mitocondrias? ¿Están ambos procesos interconectados?

•Cronograma con hitos anticipados y personal involucrado

		0-6 meses	6-12 meses	13-18 meses	19-24 meses
Tarea 1	Fisiopatología, ASR, persona contratada	X			
Tarea 2	Tarea 2.1 Cribado, MAC, MTR Tarea 2.2 Confirmación de compuestos positivos, MAC, MTR	X	X X	X	
Tarea 3	Neuronas inducidas, JASA, persona contratada	X	X	X	
Tarea 4	Evaluación de compuestos positivos en células neuronales, ASR, JASA, persona contratada			X	X

- Equipo de investigación. José A. Sánchez Alcázar, JASA; Mónica Álvarez Córdoba, MAC (PhD), Alejandra Suarez Carrillo, ASC (estudiante de doctorado), Marta Talaverón Rey, MTR (estudiante de doctorado) y persona contratada.

Hitos

Tareas	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses
Tarea 1	Identificar las alteraciones fisiopatológicas en fibroblastos			
Tarea 2		Identificar compuestos positivos en fibroblastos	Confirmación de los compuestos positivos	
Tarea 3			Generar neuronas inducidas	
Tarea 4				Los compuestos positivos serán evaluados en las neuronas

•Presupuesto

- Tabla de gastos (2 años):

Costes de fungible/2 años	
Cultivos celulares	9,000 €
Anticuerpos & Western blotting	3,218 €
PCR cuantitativa	1,215 €
Reactivos de biología molecular	6,572 €
Microscopía	2,144 €
Reactivos para ensayos bioquímicos	2,680 €
Cribado	4,525 €
Diferenciación neuronal	25,646 €
Total	55,000 €
Personal	
1 estudiante (graduado o licenciado) para realizar tesis doctoral..... 25,000 €/año (2 años)	50,000 €
TOTAL	
	105,000 €

- Justification

Para la realización de un trabajo científico de calidad que garantice su publicación en revistas científicas de alto impacto se requieren un mínimo de dos años de experimentación. Ello permitirá que el doctorando culmine el trabajo realizando su Tesis Doctoral.

El presupuesto solicitado se justifica de la siguiente manera: Personal: doctorando: 24 meses (50.000 €); Consumibles: Los consumibles cubren principalmente medios de cultivo celular, suero, suplementos, plásticos de cultivo celular, productos químicos, bioquímicos, reprogramación celular a neuronas y los gastos derivados de la utilización de los servicios de centrales del CABD.

-Grupo de investigación

José Antonio Sánchez Alcázar (JASA), Doctor, Licenciado en Biología y Medicina, especialista en Bioquímica Clínica, es Catedrático de la Universidad Pablo de Olavide e investigador principal del Centro Andaluz de Biología del Desarrollo y director del grupo PAIDI (Plan Andaluz de Investigación) BIO-336, "Desarrollo y Enfermedades Musculares". El grupo está especializado en técnicas de Biología Celular, con amplia experiencia en fisiopatología celular y



búsqueda de tratamientos en enfermedades raras y particularmente enfermedades neurodegenerativas. El grupo participa en la Acción TRANSAUTOPHAGY COST (Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología, CA15138).

La línea principal de investigación del grupo es la búsqueda de terapias personalizadas en las enfermedades raras genéticas. En la actualidad el grupo va a colaborar en la realización de dos ensayos clínicos en las enfermedades mitocondriales y el síndrome KAT6A en el Hospital Virgen Macarena de Sevilla.

Enlaces de Interés:

Página web del grupo;



<https://sanchezalcazarlab.com/>

<https://sanchezalcazarlab.com/>

<https://www.upo.es/upotec/catalogo/salud/medicina-de-precision-personalizada-en-las-enferme/>

Publicaciones científicas del grupo:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=sanchez+alcazar&sort=pubdate>

<https://www.researchgate.net/profile/Jose-Sanchez-Alcazar>

<https://www.upo.es/upotec/catalogo/salud/medicina-de-precision-personalizada-en-las-enferme/>

Dirección:

José Antonio Sánchez Alcázar
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo(CABD)-CSIC
Universidad Pablo de Olavide.
Carretera de Utrera Km 1, Sevilla 41013, Spain.
Phone: 34 954978071. FAX: 34 954349376. Email: jasanalc@upo.es;

Referencias

1. Villalon-Garcia, I., Alvarez-Cordoba, M., Povea-Cabello, S., Talaveron-Rey, M., Villanueva-Paz, M., Luzon-Hidalgo, R., Suarez-Rivero, J. M., Suarez-Carrillo, A., Munuera-Cabeza, M., Salas, J. J., Falcon-Moya, R., Rodriguez-Moreno, A., Armengol, J. A., and Sanchez-Alcazar, J. A. (2022) Vitamin E prevents lipid peroxidation and iron accumulation in PLA2G6-Associated Neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **165**, 105649
2. Gregory, A., Polster, B. J., and Hayflick, S. J. (2009) Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation. *Journal of medical genetics* **46**, 73-80
3. Hayflick, S. J., Westaway, S. K., Levinson, B., Zhou, B., Johnson, M. A., Ching, K. H., and Gitschier, J. (2003) Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome. *The New England journal of medicine* **348**, 33-40
4. Arber, C. E., Li, A., Houlden, H., and Wray, S. (2016) Review: Insights into molecular mechanisms of disease in neurodegeneration with brain iron accumulation: unifying theories. *Neuropathology and applied neurobiology* **42**, 220-241
5. Kinghorn, K. J., and Castillo-Quan, J. I. (2016) Mitochondrial dysfunction and defects in lipid homeostasis as therapeutic targets in neurodegeneration with brain iron accumulation. *Rare diseases* **4**, e1128616
6. Seleznev, K., Zhao, C., Zhang, X. H., Song, K., and Ma, Z. A. (2006) Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine. *The Journal of biological chemistry* **281**, 22275-22288
7. Gregory, A., and Hayflick, S. J. (2005) Neurodegeneration with brain iron accumulation. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* **43**, 286-296
8. Sumi-Akamaru, H., Beck, G., Kato, S., and Mochizuki, H. (2015) Neuroaxonal dystrophy in PLA2G6 knockout mice. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* **35**, 289-302
9. Kinghorn, K. J., Castillo-Quan, J. I., Bartolome, F., Angelova, P. R., Li, L., Pope, S., Cocheme, H. M., Khan, S., Asghari, S., Bhatia, K. P., Hardy, J., Abramov, A. Y., and Partridge, L. (2015) Loss of PLA2G6 leads to elevated mitochondrial lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction. *Brain : a journal of neurology* **138**, 1801-1816
10. Barbeito, A. G., Levade, T., Delisle, M. B., Ghetti, B., and Vidal, R. (2010) Abnormal iron metabolism in fibroblasts from a patient with the neurodegenerative disease hereditary ferritinopathy. *Molecular neurodegeneration* **5**, 50
11. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Bjorklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2011) Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10343-10348
12. Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D. A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., Björklund, A., Grealish, S., and Parmar, M. (2013) Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 7038-7043
13. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., and Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041
14. Dang, T. N., Bishop, G. M., Dringen, R., and Robinson, S. R. (2010) The putative heme transporter HCP1 is expressed in cultured astrocytes and contributes to the uptake of hemin. *Glia* **58**, 55-65
15. Georgakopoulou, E. A., Tsimaratou, K., Evangelou, K., Fernandez Marcos, P. J., Zoumpourlis, V., Trougakos, I. P., Kletsas, D., Bartek, J., Serrano, M., and Gorgoulis, V. G. (2013) Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryo-preserved and archival tissues. *Aging* **5**, 37-50



16. Campanella, A., Privitera, D., Guaraldo, M., Rovelli, E., Barzaghi, C., Garavaglia, B., Santambrogio, P., Cozzi, A., and Levi, S. (2012) Skin fibroblasts from pantothenate kinase-associated neurodegeneration patients show altered cellular oxidative status and have defective iron-handling properties. *Human molecular genetics* **21**, 4049-4059
17. Riemer, J., Hoepken, H. H., Czerwinska, H., Robinson, S. R., and Dringen, R. (2004) Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells. *Analytical biochemistry* **331**, 370-375
18. Cairo, G., Tacchini, L., Pogliaghi, G., Anzon, E., Tomasi, A., and Bernelli-Zazzera, A. (1995) Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem* **270**, 700-703
19. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., and Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **228**, 35-51
20. Haynes, C. A. (2011) Analysis of mammalian fatty acyl-coenzyme A species by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Biochimica et biophysica acta* **1811**, 663-668
21. Leoni, V., Strittmatter, L., Zorzi, G., Zibordi, F., Dusi, S., Garavaglia, B., Venco, P., Caccia, C., Souza, A. L., Deik, A., Clish, C. B., Rimoldi, M., Ciusani, E., Bertini, E., Nardocci, N., Mootha, V. K., and Tiranti, V. (2012) Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations. *Molecular genetics and metabolism* **105**, 463-471
22. Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell structure and function* **23**, 33-42
23. Aring, L., Choi, E. K., Kopera, H., Lanigan, T., Iwase, S., Klionsky, D. J., and Seo, Y. A. (2022) A neurodegeneration gene, WDR45, links impaired ferritinophagy to iron accumulation. *Journal of neurochemistry* **160**, 356-375
24. Sanchez-Alcazar, J. A., Khodjakov, A., and Schneider, E. (2001) Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res* **61**, 1038-1044
25. Drouin-Ouellet, J., Lau, S., Brattas, P. L., Rylander Ottosson, D., Piracs, K., Grassi, D. A., Collins, L. M., Vuono, R., Andersson Sjoland, A., Westergren-Thorsson, G., Graff, C., Minthon, L., Toresson, H., Barker, R. A., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2017) REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Mol Med* **9**, 1117-1131
26. Povea-Cabello, S., Villanueva-Paz, M., Villalon-Garcia, I., Talaveron-Rey, M., Alvarez-Cordoba, M., Suarez-Rivero, J. M., Montes, M. A., Rodriguez-Moreno, A., Andrade-Talavera, Y., Armengol, J. A., and Sanchez-Alcazar, J. A. (2022) Modeling Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes Syndrome Using Patient-Derived Induced Neurons Generated by Direct Reprogramming. *Cell Reprogram* **24**, 294-303
27. Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* **4**, 67-73



CV Investigador principal

A.1. Situación profesional actual

Organismo	Universidad Pablo de Olavide		
Dpto. / Centro	Fisiología, Anatomía y Biología Celular / Facultad de Ciencias Experimentales		
Dirección	Sastres 10A, 41620, Marchena		
Teléfono	(34) 646285371	Correo electrónico	jasanalc@upo.es
Categoría profesional	Catedrático de Universidad	Fecha inicio	2018
Espec. cód. UNESCO	240700 - Biología celular		
Palabras clave	Biología celular		

A.2. Formación académica (título, institución, fecha)

Licenciatura/Grado/Doctorado	Universidad	Año
Protección y Experimentación Animal para Investigadores en Ciencias Biomédicas. Categoría C.	Universidad de Granada	2014
Bioquímica, biología molecular y biomedicina	Universidad Complutense	1995
Bioquímica Clínica	Hospital 12 de Octubre de Madrid	1990
Medicina	Universidad de Sevilla	1986
Biología	Universidad de Sevilla	1980

Indicadores generales de calidad de la producción científica

Publicaciones

114 publicaciones,

En los últimos 5 años (2017-2022) he publicado 31 artículos

El índice de impacto medio en los últimos 6 años ha sido de 4,80.

Citaciones totales de mis publicaciones es de 10081 con un índice h=36 (SCOPUS).

Promedio de citas/años: durante los últimos 6 años (2017-2022): 1224

Además he publicados 12 capítulos de libro.

Congresos

144 comunicaciones a congresos, 52 de ellos de carácter internacional, 11 ponencias invitadas.

Línea principal de investigación

Nuestro grupo de investigación propone que la utilización de las técnicas de medicina de precisión o personalizada puede ser una alternativa para encontrar potenciales terapias en enfermedades raras genéticas. Para ello, proponemos que las propias células de los pacientes puedan utilizarse para realizar un cribado farmacológico personalizado para la identificación de posibles tratamientos. Hemos desarrollado tres plataformas para realizar medicina de precisión personalizada en las enfermedades raras: plataforma Braincure para enfermedades raras neurodegenerativas con acumulación cerebral de hierro; plataforma Mitocure para enfermedades mitocondriales; y la plataforma Myocure para las miopatías congénitas.