

Ciclo de Metodología Científica II - 2016
Departamento de Educación Médica
Facultad de Medicina-Universidad de la República



TERAPIAS REDOX

DIRIGIDAS A LA MITOCONDRIA

Aquino, Noelia
Castillo, Iris
Cimarra, Carolina
Ifrán, Estefanía
Sosa, Federico

Orientadores: Sebastián Carballal y Valeria Valez
Departamento de Bioquímica-Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)
Facultad de Medicina-Universidad de la República

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. MITOCONDRIA	3
2.1 Estructura y función	3
3. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS	4
3.1 Especies reactivas del oxígeno	4
3.2 Especies reactivas del nitrógeno	6
3.3 Funciones de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno	6
4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	8
4.1 Antioxidantes endógenos	8
4.1.1 Antioxidantes enzimáticos	8
4.1.2 Antioxidantes de bajo peso molecular	9
4.1.3 Otros mecanismos antioxidantes	9
5. DAÑO OXIDATIVO MITOCONDRIAL	9
6. TERAPIAS REDOX	13
6.1 Terapias redox no dirigidas	13
6.2 Terapias redox dirigidas a la mitocondria	14
6.2.1 Cationes lipofílicos	16
6.2.2 Derivados catiónicos plastoquinona	24
6.2.3 Péptidos	25
6.2.4 Nanotecnología	25
6.2.5 Porfirinas de Manganeso	26
7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	26
8. AGRADECIMIENTOS	27
9. REFERENCIAS	28

1. RESUMEN

La homeostasis redox es un protagonista clave para el buen funcionamiento celular, una alteración de éste a favor de las especies reactivas da lugar al estrés oxidativo, que conduce a daño de biomoléculas y trastorno en la señalización redox, las cuales están implicadas en desarrollo y progresión de enfermedades. Las mitocondrias juegan un rol esencial en el mantenimiento de esta homeostasis, ya que en este organelo es donde se originan la mayor cantidad de especies reactivas, procedente de la cadena de transporte de electrones (CTE). Se ha visto que la disfunción de la mitocondria está en íntima relación con diferentes patologías pudiendo ser el estrés oxidativo causa o consecuencia éstas, siendo los factores involucrados el daño oxidativo, la alteración en la homeostasis del Ca^{+2} y la alteración de la síntesis del ATP. Debido a esto se ha hecho necesario el desarrollo de tratamientos antioxidantes, en este trabajo se exponen diferentes terapias redox, dirigidas y no dirigidas a la mitocondria, haciendo especial énfasis en el MitoQ, una terapia dirigida que ha mostrado efectos beneficiosos *in vivo* y en ensayos clínicos, y su aplicación en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Palabras clave: estrés oxidativo, señalización redox, disfunción mitocondrial, antioxidantes terapia redox, MitoQ.

2. MITOCONDRIA

2.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las mitocondrias son los centros productores de energía en las células. El rol de un determinado tejido en el metabolismo aeróbico y sus requerimientos energéticos se reflejan en el número y el grado de actividad de sus mitocondrias. Las mitocondrias tienen dos membranas, la membrana mitocondrial externa que es permeable a pequeñas moléculas e iones, que se mueven por unos canales transmembrana denominados porinas. La membrana mitocondrial interna (MMI) forma numerosos pliegues o crestas que se extienden hacia el interior del organelo permitiendo aumentar la superficie, es impermeable a la mayoría de las moléculas, incluidos protones, las únicas especies que la cruzan lo hacen por transportadores específicos, aloja los componentes de la cadena respiratoria y la ATP sintasa. El espacio comprendido entre ambas membranas se llama espacio intermembrana, mientras que la membrana interna delimita a la matriz mitocondrial, que aloja el sistema genético mitocondrial, el complejo de la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo de Krebs, de la ruta de β -oxidación de ácidos grasos y la ruta de oxidación de los aminoácidos.

Las mitocondrias tienen su propio genoma, ADN circular doble cadena (ADNmt), cada mitocondria tiene unas cinco copias de este genoma. Hay 37 genes en el cromosoma mitocondrial humano, 13 codifican subunidades de proteínas de la cadena respiratoria, los restantes codifican moléculas de ARNt y ARNr. La gran mayoría de proteínas mitocondriales, 1500 tipos diferentes, están codificadas por genes nucleares, se sintetizan en ribosomas citoplasmáticos, se importan y organizan dentro de la mitocondria (1).

Las mitocondrias desempeñan muchos roles, el principal de ellos es la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa. Además participa en la homeostasis del calcio, en diferentes vías metabólicas (ciclo de Krebs, oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de centros ferrosulfurados y hemo, metabolismo de aminoácidos), muerte celular programada o apoptosis, producción y consumo de especies reactivas de oxígeno (ERO), diferenciación celular, sistema inmune innato y termogénesis.

La fosforilación oxidativa es un proceso de múltiples pasos que tiene lugar en la MMI, y es la culminación del metabolismo productor de energía de organismos aerobios. La cadena de transporte de electrones está constituida por cuatro complejos supramoleculares que catalizan la transferencia de electrones desde transportadores electrónicos específicos (NADH, FADH₂), para reducir el oxígeno molecular (O₂) que es el aceptor final, acoplado al bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, esto genera una diferencia de carga y de concentración de protones a ambos lados de la MMI. De esta manera se conserva la mayor parte de la energía de la transferencia electrónica en forma de gradiente electroquímico, esta energía se denomina fuerza protón motriz e impulsa la síntesis de ATP por la ATP sintasa.

3. GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS

Dentro del concepto de especies reactivas se incluyen moléculas como radicales libres y peróxidos. A bajas concentraciones estas especies reactivas juegan un papel importante como mediadores de regulación en procesos de señalización, sin embargo, a concentraciones moderadas o altas, pueden llegar a ser dañinas para el organismo debido a su capacidad para inactivar moléculas determinantes del funcionamiento celular.

3.1 ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

La exposición de los organismos vivos a ERO tales como radical anión superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (•OH) está asociada al desarrollo del metabolismo aeróbico. La mitocondria se cree que es la principal fuente intracelular de O₂^{•-} y H₂O₂ a través de reacciones de componentes de la CTE con el oxígeno molecular. La mitocondria en condiciones fisiológicas, realiza la reducción directa del oxígeno molecular a

agua mediante la transferencia de cuatro electrones a nivel de la citocromo oxidasa, en un porcentaje mayor al 98 %. Existen sin embargo al menos dos sitios en los cuales se puede producir fuga de electrones de la CTE y producirse un pequeño porcentaje (1-2 %) de reducción parcial de oxígeno a $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (2) (Fig. 1).

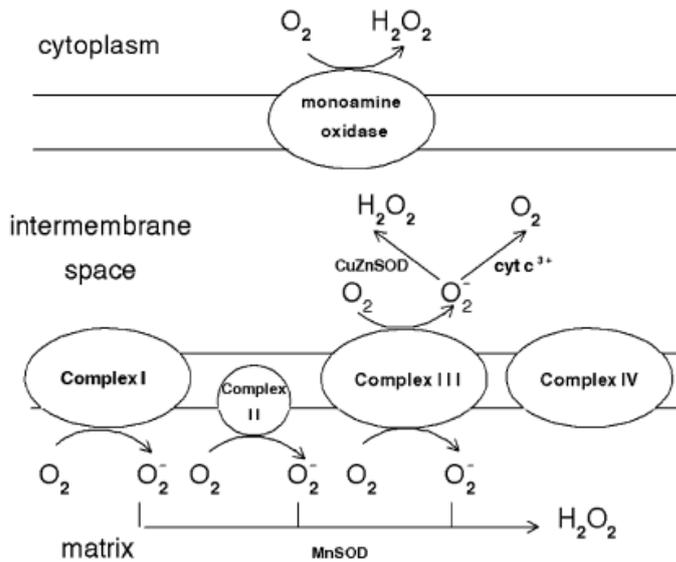


Figura 1. Sitios de la formación de $O_2^{\cdot-}$ en la cadena respiratoria. Figura extraída de Turrens, J. *Physiol* 2003 (3).

En el complejo I de la cadena respiratoria, los centros ferro-sulfurados o la flavina radical, reducen al oxígeno formando $O_2^{\cdot-}$ hacia la matriz mitocondrial. En el complejo III, el radical ubisemiquinona forma $O_2^{\cdot-}$ hacia ambos lados de la MMI. El $O_2^{\cdot-}$ *in vivo* tiene una vida media del orden de milisegundos y se dismuta a H_2O_2 y O_2 en una reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) con una rápida constante de reacción ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (4), o por vía espontánea no enzimática ($k = 2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (5). El $O_2^{\cdot-}$ tiene un pKa de 4.8 por lo que a pH fisiológico se encuentra principalmente en su forma aniónica, lo cual limita su capacidad para difundir a través de membranas biológicas. Su difusión depende de canales iónicos de membrana, este ion tiene especificidad espacial y puede ser restringido dentro de ciertos organelos incluyendo la mitocondria. El H_2O_2 se forma como producto de la reducción monovalente del $O_2^{\cdot-}$ o por la reducción divalente del O_2 . Aunque no es un radical libre, el H_2O_2 es un marcador biológico de estrés oxidativo muy importante ya que puede atravesar las membranas celulares libremente y puede actuar como mensajero intracelular en vías redox (6). A partir de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 se forma $\cdot OH$ mediante las reacciones de Haber-Weiss y Fenton las cuales requieren metales de transición como catalizadores (7). El $\cdot OH$ presenta una elevada reactividad química y poder oxidante, reaccionando con biomoléculas generalmente a

velocidades controladas por difusión. Debido a su elevada reactividad presenta una vida media muy corta (8). Existen otras fuentes de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 a tenerse en cuenta como las enzimas piruvato deshidrogenasa y α -cetoglutarato deshidrogenasa, peroxidasas, NADPH oxidasa en la membrana de leucocitos, mieloperoxidasas, xantina oxidasas, ciclooxigenasas, lipoxigenasas, citocromo p450 monooxigenasa y NOS desacoplada, por lo tanto otros compartimentos intracelulares diferentes a las mitocondrias también pueden ser generadores de ERO como la membrana plasmática, peroxisomas y retículo endoplasmático (6).

3.2 ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO

Además de las ERO, en las mitocondrias se pueden formar especies reactivas del nitrógeno (ERN) a partir de reacciones con el óxido nítrico ($^{\cdot}NO$) uno de ellos es el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) un fuerte oxidante y agente nitrante producto de la reacción del $O_2^{\cdot-}$ con el $^{\cdot}NO$. Tanto los ERO y ERN son producto del metabolismo aeróbico y por lo tanto actúan como sensores de alteraciones intracelulares de la concentración de O_2 , esto les permite actuar como moléculas señalizadoras implicadas en diversas funciones celulares como la muerte celular programada, regulación de la respuesta al estrés y proliferación celular.

El $^{\cdot}NO$ es una molécula gaseosa importante en la señalización celular, es un radical libre altamente reactivo y libremente difusible (pasivamente) a través de las membranas, puede actuar con muchos componentes intracelulares a distancias considerables desde su sitio de síntesis (6). Es sintetizado en los organismos vivos a partir de L-arginina por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS), la cual se han caracterizado diferentes isoformas: neuronal (NOS1), inducible (NOS2) y constitutiva endotelial (NOS3) (9), además se ha reportado una NOS localizada en la mitocondria (mtNOS) (10).

3.3 FUNCIONES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO

Las especies reactivas anteriormente nombradas cumplen múltiples funciones fisiológicas de suma importancia en el organismo. Las ERO y las ERN modulan muchas enzimas así como receptores de membrana, canales iónicos, quinasas lipídicas, transportadores fosfatasa y varios factores de transcripción como NF- κ B y Nrf-2. Además regulan citoquinas pro inflamatorias como Interleuquina-6 y factor de necrosis tumoral (TNF- α) controlando la respuesta inflamatoria y funciones leucocitarias (adhesión, migración y fagocitosis), y regulan procesos cruciales a nivel celular como la apoptosis y autofagia (6). Las ERO también participan como moléculas de señalización y en mecanismos adaptativos celulares, en el caso del $O_2^{\cdot-}$ éste interviene en la señalización redox durante la detección de hipoxia, diferenciación celular e inmunidad innata (1,6). Un mecanismo importante de señalización es la modificación de

proteínas redox, especialmente centros ferrosulfurados o residuos de cisteína. Un blanco que ha sido descrito es la NADH deshidrogenasa (complejo I de la CTE), la cual tiene muchos centros ferrosulfurados, además la desestabilización de centros ferrosulfurados en la aconitasa por el $O_2^{\cdot-}$ inhibe su actividad enzimática limitando así la respiración (6). Las ERO participan junto a factores tróficos en procesos como proliferación celular, supervivencia y reparación (11), la reducción de niveles de ERO por adición o sobreexpresión de proteínas antioxidantes inhiben la proliferación tanto de células musculares lisas vasculares como células tumorales, esta inhibición de la producción de ERO genera detención de la célula en la fase G1 (12). En las células del sistema inmune, las ERO tienen también una función microbicida. Las células fagocíticas (monocitos, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos) producen $O_2^{\cdot-}$ importante para su función microbicida (13). Un ejemplo que demuestra la importancia de dicha función es la enfermedad granulomatosa crónica, la cual se caracteriza por un defecto en la fagocitosis, especialmente la NADPH oxidasa que posee una alteración funcional en algunas de sus subunidades, por lo que estos individuos no logran controlar ciertas infecciones bacterianas y por hongos (14). Otro mecanismo microbicida es el utilizado por los neutrófilos, que utilizan la mieloperoxidasa para oxidar iones Cl^- y formar ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante por dos electrones que participa en reacciones de oxidación y cloración de varios blancos biológicos, resultando en un agente antibacteriano muy poderoso (13). Las ERO también se encuentran implicadas en la dinámica mitocondrial. Existen numerosas pruebas de que el proceso de fisión y el aumento de la generación de ERO están relacionadas, sin embargo, no está claro si las ERO son causa o consecuencia de la fisión mitocondrial. La fisión es necesaria para la sobreproducción de ERO inducida por un nivel de glucosa elevado y aumento de la respiración, deduciendo que las ERO son por ende consecuencia de la fisión mitocondrial. En cambio, Makino *et al.* evidenció mediante pruebas en células endoteliales de ratón que, los atrapadores ("scavengers") de ERO impiden la fisión mitocondrial inducida por glucosa, lo que sugiere que un aumento de ERO desencadena fisión en estas condiciones (6). Por otro lado, el $^{\cdot}NO$ cumple una serie de funciones relacionadas con la homeostasis del sistema vascular como la regulación del tono de los vasos, inhibición de la agregación plaquetaria, inhibición de la adhesión y trans migración leucocitaria, así como la ordenación de la proliferación y migración de las células musculares lisas, entre otras (15). La NOS mitocondrial es sensible a cambios de la concentración de calcio en la matriz mitocondrial y juega un papel muy importante en la modulación del consumo de O_2 mitocondrial, el $^{\cdot}NO$ puede inhibir dicho consumo mediante la inhibición de la citocromo c oxidasa (complejo IV de la CTE) por lo tanto induciendo la producción de ERO; también inhibe el complejo I, una acción que tiene consecuencias en el proceso de fosforilación oxidativa y el estado redox mitocondrial (6).

4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Para preservar una homeostasis redox bien coordinada y balanceada dentro de la mitocondria, el cuerpo humano programa un mecanismo contra el estrés oxidativo mediante un sistema antioxidante (16). Los mecanismos antioxidantes del organismo no son perfectos para prevenir los daños generados por los radicales libres, por lo que existen sistemas que reparan los daños en el ADN, degradan proteínas dañadas o lípidos, entre otros (13).

Este sistema antioxidante está constituido por un grupo endógeno dirigido por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos (moléculas de bajo peso molecular), y otro exógeno aportado por los alimentos (6,16).

4.1 ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS

4.1.1 Antioxidantes enzimáticos

Dentro de los enzimáticos mitocondriales se encuentran: manganeso superóxido dismutasa (MnSOD o SOD2), glutarredoxina mitocondrial (Grx3), glutatión peroxidasa (GPx), el sistema tiorredoxina 2 (Trx2) y la peroxirredoxina 3. Estos sistemas antioxidantes funcionan para detoxificar las ERO y regular procesos redox-sensibles, son esenciales para funciones celulares fundamentales, desarrollo embrionario y función cardiovascular adecuada (16). Otros sistemas antioxidantes enzimáticos no específicos de la mitocondria constituyen un importante mecanismo defensivo y son mediadores de señales, como las peroxirredoxinas (Prxs) y sistemas tiorredoxinas (Trx), glutatión/glutarredoxinas (1 y 2) y catalasa (17). Esta última junto con la GPx, son capaces de convertir H_2O_2 en H_2O . Existen otras enzimas antioxidantes como la hemoxigenasa 1 (HO-1) que metaboliza el hemo a biliverdina, hierro y monóxido de carbono, que se activa en condiciones de estrés oxidativo (hipertermia, hipoxia, metales pesados) (6).

El antioxidante más conocido es la enzima SOD, tres isoformas han sido identificadas. SOD cobre-zinc (CuZn-SOD o SOD1), SOD manganeso (MnSOD), SOD extracelular (ecSOD) (18).

La MnSOD está localizada en la matriz mitocondrial. Además de su función de dismutar al $O_2^{\cdot-}$, la MnSOD puede también funcionar como un regulador de señalización en la protección adaptativa inducida por estrés a través de vías anti-apoptóticas. MnSOD impacta en la actividad de factores de transcripción como NF- κ B, HIF-1, AP-1 y p53, los cuales regulan la transformación celular, proliferación y angiogénesis. Su expresión es esencial para la supervivencia. La Trx2 tiene muchas funciones celulares, la deficiencia de la misma lleva a la liberación del citocromo c desde la mitocondria y activación de las caspasas 3 y 9 (16).

4.1.2 Antioxidantes de bajo peso molecular

El tripéptido glutatión (GSH) es el principal antioxidante tiol y responsable del balance redox, se encuentra en múltiples compartimientos celulares incluida la mitocondria. Dentro de sus funciones, participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, cofactor de enzimas detoxificantes contra estrés oxidativo (por ej. GPx), scavenger directo de oxígeno singlete y $\cdot\text{OH}$, detoxificador de H_2O_2 y peróxidos lipídicos a través de la acción enzimática de GPx, y regenera antioxidantes como α -Tocoferol y ácido ascórbico a sus formas activas. La glutatión reductasa regenera el glutatión oxidado (GSSG) a GSH (6). En cuanto a otras moléculas de bajo peso molecular se encuentran el α -Tocoferol, Ácido ascórbico y ubiquinona los cuales son importantes para minimizar la reacción en cadena de la lipoperoxidación de lipoproteínas, especialmente en membranas plasmáticas. El ácido lipoico y la acetilcisteína también forman parte de este grupo (6).

4.1.3 Otros mecanismos antioxidantes Otro método que tiene el organismo para evitar la formación de radicales libres, es manteniendo la mayor cantidad posible de iones hierro y cobre dentro de proteínas de almacenamiento o transporte, ya que estos metales son necesarios para la formación de $\cdot\text{OH}$ por reacción de Fenton. El hierro se almacena mediante la ferritina y se transporta por la proteína transferrina, en cambio el cobre se transporta por la proteína ceruloplasmina (13).

5. DAÑO OXIDATIVO MITOCONDRIAL

El concepto de “Estrés Oxidativo” fue definido por Helmut Sies, como una condición de desbalance entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros, llevando a daño oxidativo a nivel de biomoléculas y un trastorno en la señalización redox (19). Este desbalance ha sido asociado al desarrollo y progresión de enfermedades como desórdenes autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (16). Las ERO son especialmente dañinas para las mitocondrias, éstas son importantes determinantes de salud y enfermedad. La disrupción de las funciones mitocondriales, del ensamblaje y del reemplazo mitocondrial contribuyen a la generación de diversas patologías, surgiendo la necesidad de terapias (1).

La disfunción mitocondrial se define como la alteración de cualquiera de los papeles funcionales de las mitocondrias, no respondiendo a las necesidades celulares de cualquier momento del desarrollo o de la actividad celular normal. La disfunción mitocondrial se puede dividir en dos tipos: primaria y secundaria (1). La disfunción primaria se caracteriza por una mutación en un gen del ADNmt, o en un gen nuclear que codifica para alguna proteína

mitocondrial, o por una mutación inducida por una toxina que actúa selectivamente en la mitocondria, estas enfermedades mitocondriales son clínicamente heterogéneas (1). Las mutaciones en el ADNmt son de herencia mitocondrial materna, en cambio mutaciones en el ADN nuclear son de herencia mendeliana. El fenotipo clínico de una mutación en el ADNmt depende de varios factores: las múltiples mitocondrias por célula, la proporción de genomas mitocondriales sanos y mutados (heteroplasmia), el umbral energético mínimo que depende de cada mutación y de cada tejido, y la susceptibilidad de los diferentes órganos, lo cual explica que las afectaciones más frecuentes sean encefalomiopatías (Dra. Rodríguez M., entrevista personal, 18 de agosto de 2016)¹.

Un ejemplo de este tipo de disfunción es el Síndrome MELAS (*Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*), esta enfermedad se genera por una mutación en la posición 3243(1) del gen mitocondrial MT-TL1 (*mitochondrially encoded tRNA leucine 1, UUA/G*), este codifica para un ARN de transferencia en humanos que transfiere el aminoácido leucina a la cadena polipeptídica en crecimiento durante la traducción. Este síndrome está asociado además, con diabetes mellitus y sordera. Esta disfunción mitocondrial primaria lleva al ensamblaje defectuoso de los complejos de la CTE y, en consecuencia, a defectos del metabolismo energético en el sistema neuromuscular (1,20). Otra enfermedad dada por disfunción primaria mitocondrial es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (NOHL) o atrofia óptica de Leber, es una degeneración de las células ganglionares de la retina y sus axones, heredada mitocondrialmente y que lleva a la pérdida aguda o subaguda de la visión central. Afecta predominantemente a varones adultos jóvenes. Las mutaciones son en los genes MT-ND1, MT-ND4, MT-ND4L y MT-ND6, los cuales codifican para una región altamente conservada de la NADH deshidrogenasa, por lo que el metabolismo energético está alterado.

Un ejemplo de disfunción mitocondrial primaria por disfunción de un gen nuclear que codifica proteínas mitocondriales, es el defecto neonatal en el metabolismo energético debido a la mutación en un gen nuclear que codifica para NDUFAF3, un factor de ensamblaje para el complejo I de la CTE.

Además, las mutaciones de genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales pueden también irrumpir varios aspectos de la mitocondria distintos de la fosforilación oxidativa, como el ensamblaje, dinámica y función metabólica (1,20).

¹ La Dra. Marianela Rodríguez es Prof. Adj. del Dpto. de Neonatología del Hospital de Clínicas. Posee amplia experiencia en el área de enfermedades mitocondriales. Coordinamos un seminario en el cual la Dra. Rodríguez expuso parte de su trabajo de investigación relacionado con el tema de esta monografía.

Por otro lado, la disfunción mitocondrial secundaria es causada por eventos patológicos que se originan fuera de la mitocondria. Por ejemplo durante el daño por isquemia/reperfusión, donde se produce la interrupción y subsecuente reflujo sanguíneo al tejido, lo cual lleva a disrupción mitocondrial secundaria extensa y consecuente daño tisular. Otros casos donde el daño mitocondrial secundario juega un rol significativo incluyen la sepsis, neurodegeneración, síndrome metabólico, trasplante de órganos, cáncer, enfermedades autoinmunes y diabetes (1,20).

Por lo anteriormente dicho, las mitocondrias son un punto importante para la intervención terapéutica, incluso cuando el daño a las mismas no constituye el evento patológico inicial (1). La molécula de ADNmt acumula más daño oxidativo que el ADN nuclear debido a su proximidad a la fuente de liberación de ERO, sus sistemas de reparación menos sofisticados, la ausencia de histonas que lo protegen físicamente de ataques exógenos, aunque se están investigando proteínas implicadas en el mantenimiento del genoma mitocondrial, una de estas es la proteína “factor de transcripción mitocondrial A”, una proteína histona, miembro de la familia de proteínas de alta movilidad, es el primer factor de transcripción identificado que se une al ADNmt y es esencial para su mantenimiento.

Las proteínas de la mitocondria también sufren daño, debido a la presencia de centros hierro-azufre en su estructura que son susceptibles a la inactivación oxidante, también residuos de tiol son vulnerables a la S-nitrosilación por ERN, en este sentido se sabe que algunas proteínas mitocondriales son alteradas por ERO y ERN tales como la enzima aconitasa (bajo condiciones de envejecimiento) (6). Además, las proteínas de integración de los complejos de la CTE pueden ser afectadas por las ERO y ERN. El daño al complejo I aumenta la producción de ERO generando un círculo vicioso en la disfunción mitocondrial, es importante tener en cuenta que los daños en este complejo tienen un impacto más fuerte en la función mitocondrial con respecto de los otros daños causados en otros complejos. Por último se sabe que los fosfolípidos que integran las membranas mitocondriales son ricos en ácidos grasos insaturados que son extremadamente vulnerables a la peroxidación lipídica por ERO. Uno de los más afectados es la cardiolipina, componente esencial de la MMI, que está constituido exclusivamente por ácidos grasos poliinsaturados. Este daño a la MMI por ERO es particularmente relevante, no sólo porque esta membrana contiene complejos de CTE, sino también debido a una característica especial que es el elevado potencial de membrana, necesario para el mantenimiento de sus propiedades eléctricas. Por otro lado la gran extensión de la MMI contiene ácidos grasos saturados pasibles de daño oxidativo (1,20). Cuando la integridad y la función de la MMI se ve afectada por el daño oxidativo, el gradiente de H^+ se disipa a través de la fuga de los mismos, comprometiendo además la fosforilación oxidativa (6). Existen tres aspectos de daño

mitocondrial que contribuyen a las patologías mitocondriales primarias y secundarias: el daño oxidativo, la alteración en la homeostasis del calcio y la alteración en la síntesis de ATP (20,21). La síntesis de ATP mitocondrial es alterada por daño a la CTE, a la membrana interna o a la maquinaria de síntesis de ATP, contribuyendo a la muerte y disfunción celular. El aporte de ATP mitocondrial defectuoso lleva también a la alteración de la homeostasis del calcio, por alteración de la actividad de la bomba de calcio ATPasa tanto en el retículo endoplásmico/sarcoplásmico como en la membrana plasmática, aumentando así los niveles de calcio citosólico por encima del rango de señalización normal (1-2 μM). La mitocondria capta calcio en un mecanismo protector, pero las concentraciones elevadas sostenidas conducen a acumulación crónica y dañina de calcio dentro de la mitocondria (1,20).

El daño oxidativo, la síntesis alterada de ATP y la alteración de la homeostasis de calcio, frecuentemente ocurren juntas, y como cada uno de estos daños por sí mismo lleva a los otros dos, entonces se establece un círculo vicioso. Finalmente estas tres alteraciones inducen la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), el cual consiste en la formación de un poro en la membrana interna que produce edema y alteración de la función del organelo. El ambiente tóxico generado por daño oxidativo, pérdida de la homeostasis del calcio, síntesis alterada de ATP e inducción del PTPm ocurre en muchos desórdenes mitocondriales primarios y secundarios; así, las intervenciones terapéuticas para mejorar estos procesos son aplicables a varias indicaciones diferentes (1,20).

Tuvimos la oportunidad de tener una instancia de encuentro con la Dra. Marianela Rodríguez, la cual ha investigado casos de enfermedades mitocondriales en nuestro país. De acuerdo a la información aportada por la Dra. Rodríguez, la incidencia mundial de estas enfermedades es de 0.5 a 2 casos cada 10.000 personas. En el Uruguay en el año 2012 se reportaron 4820 nacimientos, por lo que se puede esperar la existencia de 4 casos por año, los casos pueden aparecer en neonatos como en personas jóvenes. En esta instancia también surgió el concepto de que la disfunción mitocondrial como mecanismo clave en la patogénesis de diversas enfermedades no es nuevo, en 1962 se publicó el primer reporte de una enfermedad que estaba relacionada a disfunción mitocondrial, donde se asocia la presencia una enfermedad hipermetabólica de origen no tiroideo con un defecto en el mantenimiento del control respiratorio mitocondrial (22). Posteriormente en 1988 se da a conocer el vínculo entre las alteraciones del genoma mitocondrial con una enfermedad mitocondrial, dónde lesiones del ADNmt del músculo generan alteraciones musculares (23). Por otra parte, en el mismo año se publicó la relación entre la mutación del ADNmt asociado a la neuropatía óptica de Leber (24).

6. TERAPIAS REDOX

De lo planteado hasta ahora se desprende que el $O_2^{\cdot-}$ y los oxidantes y especies reactivas derivadas del mismo cumplen roles relevantes en el daño oxidativo mitocondrial que conducen a la génesis y progresión de diversas enfermedades. Esta constatación ha impulsado el desarrollo de terapias redox. A continuación mencionaremos algunas de las terapias redox no dirigidas y luego nos centraremos en aquellas que son dirigidas de forma sitio-específica a la mitocondria.

6.1 TERAPIAS REDOX NO DIRIGIDAS

Existen terapias antioxidantes que no son específicas para actuar en la mitocondria.

Algunos de los sistemas enzimáticos antioxidantes están bajo control transcripcional, siendo capaces de inducirse por estímulos fisiológicos, como el caso de la glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas y la superóxido dismutasa (MnSOD), con lo cual en los últimos años se ha visto que la capacidad antioxidante enzimática puede ser modulada por estímulos fisiológicos o farmacológicamente, lo que está abriendo nuevas posibilidades en prevención y tratamiento de procesos asociados al estrés oxidativo.

En los últimos años los estudios se han focalizado en la aplicación de antioxidantes como terapia potencial para el tratamiento en diferentes patologías donde está involucrado el estrés oxidativo. En este sentido se han empleado diferentes antioxidantes como vitaminas (A, E y C), β -caroteno, selenio, ubiquinona, inducción del factor de transcripción NRF-2, ácido lipoico, N-acetilcisteína (NAC), Trolox y Resveratrol, algunos de estos fueron evaluados *in vitro*, *in vivo* y otros valorados en ensayos clínicos con el objetivo de disminuir el estrés oxidativo (6). Estos compuestos han sido analizados en estudios pre-clínicos controlados en modelos de enfermedad, la aplicación de moléculas antioxidantes provenientes de la dieta como el ácido ascórbico, α -tocoferol o polifenoles han tenido resultados satisfactorios (17). En pacientes con deficiencia de coenzima Q, el suplemento dietético de ésta mostró efectos beneficiosos, aunque no un efecto curativo (21). El uso de antioxidantes naturales en poblaciones pequeñas y controladas por vía oral mostraron efectos beneficiosos en la función endotelial, pero cuando estos estudios son trasladados a grandes poblaciones no han mostrado resultados contundentes (25). Siguiendo esta línea, varios estudios no han arrojado resultados alentadores como terapias antioxidantes a gran escala en seres humanos. Dentro de las causas que puede explicar esto se encuentra la dificultad de encontrar la dosis correcta, en algunos estudios se administraron dosis insuficientes (26) y otras veces excesivas donde se observó efectos pro-oxidantes (27). Otro

motivo que puede explicar esta falta de respuesta positiva es la elección de la población en la que se aplican, en un estudio en el que se administró suplemento de vitamina E para disminuir los eventos clínicos asociados a la enfermedad cardiovascular se vio que no tuvo impacto, en cambio en ratones con deficiencia de vitamina E si se observó un efecto protector (28). Por otra parte los antioxidantes pueden actuar como tal o pro-oxidantes en función del microambiente, lo cual fue demostrado mediante la administración de β -caroteno en pacientes fumadores, donde se observó que a bajas tensiones de O_2 tenía efecto antioxidante y con altas tensiones de O_2 , efecto pro-oxidante (29).

Otro factor que influye en los resultados discordantes de estos tratamientos es que no están dirigidos a la principal fuente de generación de ERO. Sería lógico pensar que el direccionamiento específico de antioxidantes a la mitocondria es una estrategia terapéutica más eficaz con resultados prometedores.

6.2 TERAPIAS REDOX DIRIGIDAS A LA MITOCONDRIA

La distribución de drogas en compartimentos subcelulares específicos constituye una estrategia promisoriosa para mejorar la eficacia terapéutica, acumulando la droga en blancos específicos y disminuyendo sus efectos secundarios. Esta estrategia depende de la naturaleza particular del compartimento celular en cuestión. Dada la creciente evidencia en la implicancia de la mitocondria en diferentes patologías, actualmente se ha avanzado mucho en el estudio de moléculas sintéticas con potente capacidad antioxidante dirigidas específicamente a la mitocondria, para restablecer la homeostasis redox y bioenergética mitocondrial. Dado que el transporte de drogas a la matriz mitocondrial se encuentra obstaculizado por la difusión dificultosa a través de la MMI, se deben utilizar transportadores específicos, los cuales deben reunir ciertas características: i) capacidad para unir la droga farmacológicamente activa o prodroga, ii) un sistema de transporte eficiente hasta el sitio de acción, iii) especificidad y selectividad por el compartimento mitocondrial y iv) liberación del fármaco una vez dentro de la mitocondria (6).

Esta estrategia debe entonces tener en cuenta las propiedades físico-químicas de la molécula transportadora (carga eléctrica, hidrofilia, tamaño, masa) y las del compartimento mitocondrial, y a su vez toma ventaja de dos propiedades del organelo, el gran potencial de membrana a través de la MMI y la maquinaria de importación de proteínas a la mitocondria (30). Moléculas pequeñas han sido dirigidas eficientemente a la mitocondria *in vivo* mediante diferentes métodos: encapsulados en liposomas, conjugados a cationes lipofílicos, e incorporadas a péptidos que se dirigen selectivamente a la mitocondria, entre otros. Hasta el momento las moléculas empleadas implican en su mayoría antioxidantes como sustratos o coenzimas de la

CTE, como citocromo c, b2, succinato, y además otros compuestos como vitamina B1 y proteínas proapoptóticas como la familia Bax/Bcl-2 y p53 (Fig. 2) (6). A continuación haremos un breve repaso de las diferentes estrategias estudiadas como terapias redox dirigidas de forma específica a la mitocondria, centrándonos en el mito-ubiquinol (MitoQ).

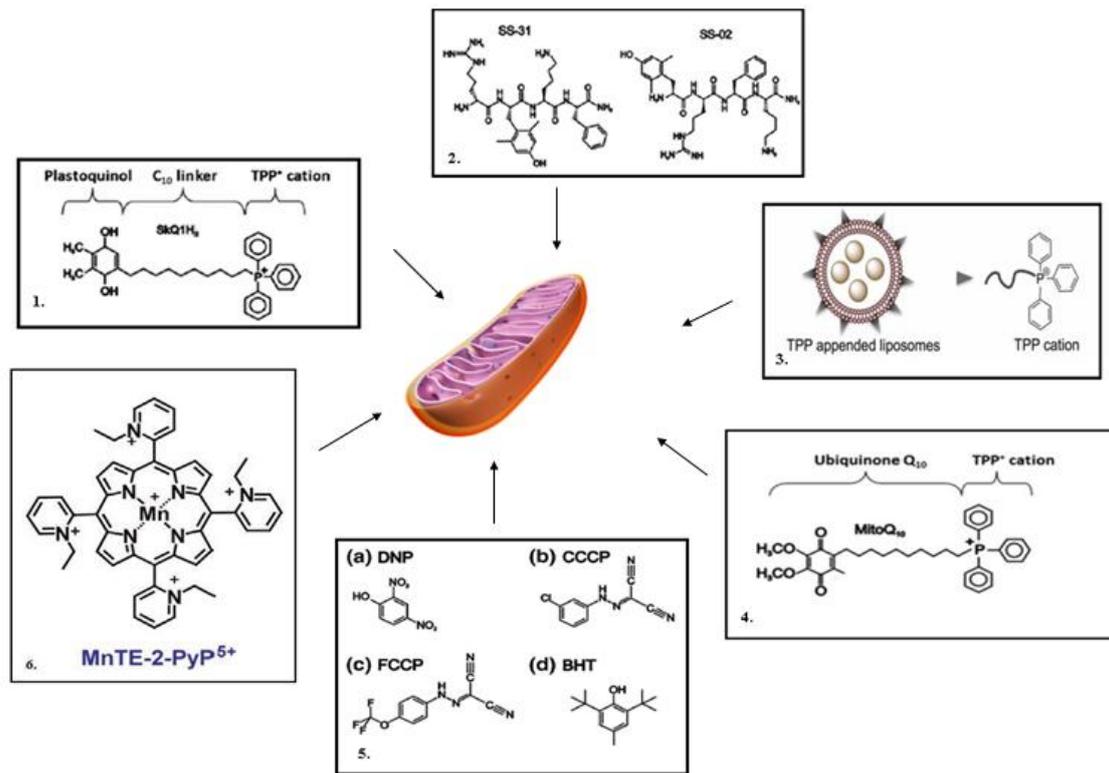


Figura 2. Terapias dirigidas a la mitocondria. 1-Plastoquinona(6), 2-Peptidos(6), 3-Nanotecnología (26), 4-Cationes Lipofílicos(6), 5-Desacoplantes (31), 6-Porfirinas de Manganeso (32).

6.2.1 Cationes Lipofílicos

Los cationes lipofílicos como derivados del trifenilfosfonio (TPP⁺) se acumulan en la matriz mitocondrial, tomando como ventaja el potencial electroquímico transmembrana de la mitocondria, y atraviesan fácilmente la bicapa lipídica debido a que la energía de activación necesaria para atravesarla es baja (33). El gran gradiente electroquímico, del potencial de membrana plasmático (-30 a -60 mV) al potencial de la MMI (-150 a -180 mV) provee una potente fuerza para la orientación selectiva de los cationes lipofílicos (6). Este proceso puede ser expresado por la ecuación de Nernst en que la absorción aumenta aproximadamente 10 veces por cada 60 mV de potencial de membrana, lo que conduce a una acumulación importante dentro de las mitocondrias, la concentración en la matriz mitocondrial es 100-1000 veces mayor que en el citoplasma (Fig. 3) (34). Este potencial altamente negativo no se encuentra en ningún

otro compartimento celular, permitiendo la acumulación selectiva en las mitocondrias, teniendo en cuenta también que no hay vías de salida activa, y el catión no es metabolizado o inmediatamente tóxico para la célula(30).

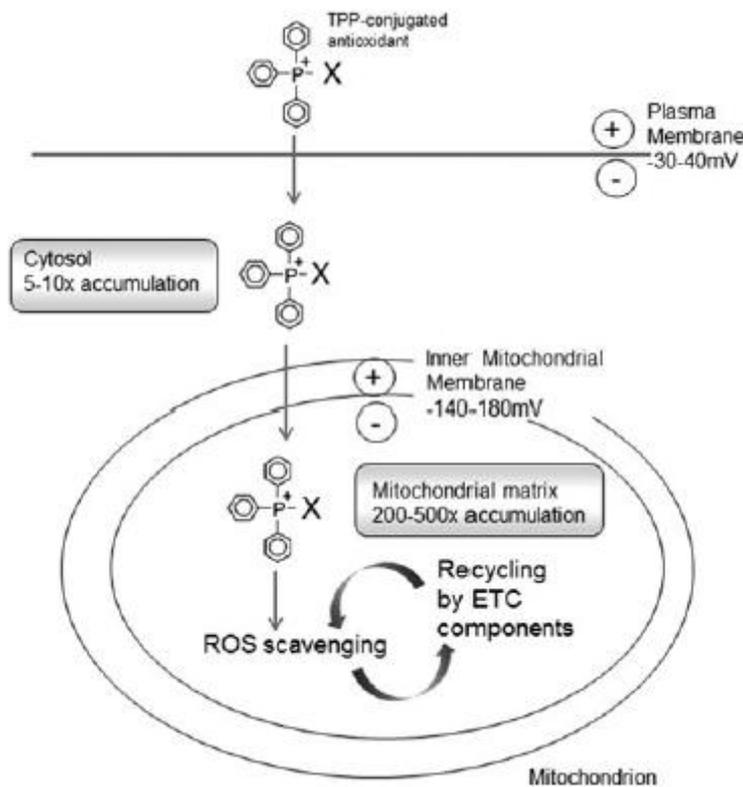


Figura 3. La unión covalente del catión trifetilfosfonio a un antioxidante (X) lleva a que la molécula se acumule 5-10 veces en el citosol, debido a la existencia del potencial de membrana plasmática en el orden de -140 a -180 mV. Extraído de Apostolova N, Antioxidants and redox signaling, 2015 (6).

Basado en la comprensión de que los cationes lipofílicos se dirigen específicamente a la mitocondria, es lógico considerar la conjugación de moléculas con actividad biológica conocida a un catión lipofílico para dirigirlas específicamente a la mitocondria (35). El envío de agentes farmacológicos dentro de la célula mediante cationes lipofílicos fue demostrado por primera vez con la rodamina 123 unido al agente anticanceroso cisplatino (36), muchas células cancerosas tienen un potencial de membrana mitocondrial mayor que las células normales, permitiendo un ingreso selectivo de este compuesto (34).

Los cationes lipofílicos utilizados son el trifetilfosfonio (TPP^+), la rodamina 123, flupirtina, MKT-077, y antraciclina. El TPP^+ y el TPMP^+ (forma metilada) son los más ampliamente utilizados y estudiados. Estos compuestos una vez dentro de la matriz mitocondrial se posicionan principalmente en la superficie de la MMI orientada hacia la matriz mitocondrial. La medida con la que el TPP^+ se ancla a la MMI depende de la hidrofobicidad de la molécula y la

longitud del puente de carbono que conecta al TPP⁺ con la molécula antioxidante: cuanto mayor es su longitud, la velocidad de absorción debería de ser mayor por el mayor grado de asociación a la membrana y la profundidad de penetración del antioxidante a la membrana (Fig. 4).

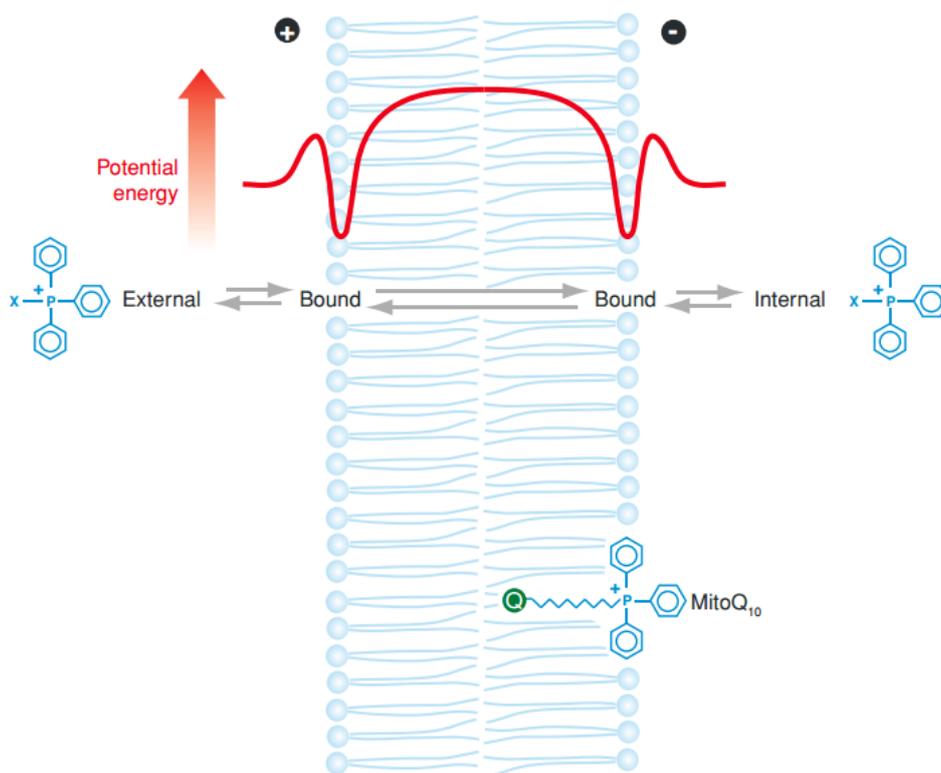


Figura 4. Entrada de cationes lipofílicos a la bicapa lipídica. Extraída de Murphy M, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2007 (33).

Muchos componentes han sido generados mediante la conjugación con TPP⁺, los cuales son antioxidantes como la ubiquinona, tocoferol, ácido lipoico, resveratrol, nitrones, plastoquinona, y TEMPOL (Fig. 5). Estos moduladores redox, Mito-derivados, han demostrado disminuir una gran variedad de especies reactivas, y se han propuesto para el control de la señalización redox en la mitocondria y prevenir la peroxidación lipídica. Aun así, estos compuestos presentan ciertas desventajas: i) capacidad limitada, ya que solo moléculas de bajo peso molecular y eléctricamente neutras pueden ser transportadas, ii) sublocalización, debido a su localización en la matriz, más específicamente en la superficie de la MMI y, iii) toxicidad, ya que altas concentraciones pueden despolarizar el potencial de membrana y comprometer la viabilidad celular.(6)

MitoQ

El primer antioxidante dirigido a la mitocondria estudiado fue el **MitoE₂**, formado por la fracción de α -tocoferol de la Vitamina E y el catión TPP⁺ unidos por una cadena de dos carbonos. Se ha visto que el α -tocoferol es efectivo para prevenir la peroxidación lipídica. Este enfoque se aplicó al ubiquinol, uniéndolo a TPP⁺ (**mitoquinona, MitoQ**), este conjugado es el más extensamente evaluado y mejor entendido (33).

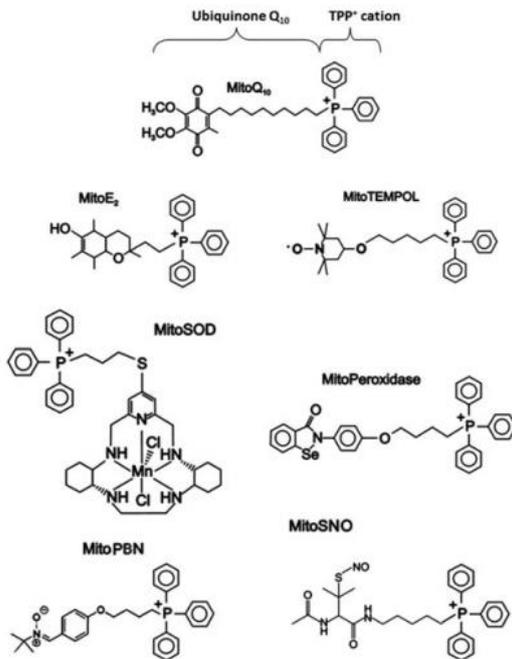


Figura 5. Mitoderivados: estructura química de los antioxidantes dirigidos a la mitocondria basados en la conjugación con cationes lipofílicos TPP⁺. Extraído de Apostolova N, Antioxidants and redox signaling, 2015 (6)

Dentro de la mitocondria, el MitoQ se acumula en la superficie de la MMI hacia la matriz, donde es reducido por el complejo II de la CTE a la forma activa del ubiquinol **MitoQH₂**. La propiedad antioxidante de la forma ubiquinol del MitoQ está basada en la oxidación a ubiquinona, la cual es rápidamente re-reducida por el complejo II, reciclando y recuperando su eficiencia antioxidante, esta capacidad de recuperar su forma activa luego de neutralizar especies reactivas es un factor crítico para la eficiencia de muchos antioxidantes. Esta reducción a su forma activa es esencial para su función como agente reductor, y todos sus efectos probablemente se deban a la acumulación del antioxidante en forma de ubiquinol, esta forma mostró ser un antioxidante efectivo (6,33).

Como se mencionó previamente una cadena alquílica larga que une el compuesto al catión lipofílico, es más efectiva para que se acumule dentro de la mitocondria, en este contexto, MitoQ₁₀ que posee 10 átomos de carbono en su cadena alquílica ha demostrado un desempeño

óptimo (6). Se crearon y examinaron una serie de MitoQ con diferente número de carbonos (3, 5, 10, 15) en su cadena alquílica. Se vio que los compuestos de cadena más corta que el MitoQ₁₀ son menos efectivos, debido en parte a la reducción más lenta, como consecuencia tal vez de la falta de acceso a los sitios activos de reductasas en la cadena respiratoria (33). La forma ubiquinona del MitoQ reacciona directamente con las ERO como el O₂^{•-}. La constante de velocidad reportada para la reacción de MitoQ con O₂^{•-} en agua es de 2.0 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹ y en metanol es 4.2 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹ y tal como ocurre con otros ubiquinoles, su reacción con H₂O₂ es considerada despreciable. Además, el MitoQ reacciona rápido con el ONOO⁻, acción particularmente efectiva contra la lipoperoxidación, la cual se vio es una característica crucial del daño oxidativo mitocondrial (6,33).

La toxicidad es una de las cuestiones a examinar para determinar si estos compuestos pueden actuar como antioxidantes en las células. La extensa acumulación de estos cationes lipofílicos dentro de mitocondrias aisladas en concentraciones de milimolar puede perturbar la integridad de la membrana, la respiración y síntesis de ATP, consecuencia de su acumulación en la superficie interna de la MMI. Siguiendo esta idea, los TPP⁺ más hidrófobos alteran la función mitocondrial a concentraciones más bajas, y el grado de disrupción se correlaciona con la cantidad de compuesto absorbido a la membrana interna (33).

Los efectos no específicos de MitoQ se evaluaron utilizando un compuesto control decylTPP, el cual es similar en hidrofobicidad que el MitoQ pero carece del ubiquinol. Se vio que la disrupción mitocondrial con MitoQ y decylTPP ocurre a concentraciones similares. Estos efectos no específicos limitan la cantidad de antioxidante dirigido que puede ser utilizado, por lo que es esencial que el compuesto antioxidante sea efectivo a concentraciones por debajo de las que se altera la función. Además hay reportados inhibiciones más específicas por parte de los cationes lipofílicos, bajas concentraciones de TPP⁺ puede inhibir el intercambiador mitocondrial Na⁺/Ca⁺² y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa. Sin embargo, reemplazando un grupo fenol del TPP⁺ con un grupo metilo se disminuye en gran cantidad estas inhibiciones, y no hay evidencia que el decylTPP o el MitoQ afecte estos procesos (33).

Al pasar de mitocondrias aisladas a células, los antioxidantes se acumulan 5-10 veces más dentro del citosol en relación con el medio extracelular por el potencial de membrana plasmático. En consecuencia, una concentración dada de antioxidante dirigido añadida a la incubación altera a las mitocondrias en las células más que en mitocondrias aisladas (33). El MitoQ también puede actuar como un pro-oxidante al desprotonarse en agua y facilitar la formación de O₂^{•-}. Esta vía de producción es insignificante si el ubiquinol se mantiene dentro de la fase lipídica (33) y depende en gran medida de la concentración empleada.. Datos más recientes han demostrado que MitoQ altera la respiración mitocondrial de una manera

dependiente de la concentración (100 a 300 nM) y que este efecto se debe principalmente a una acción pro-oxidante de MitoQ (6).

MitoQ₁₀ y MitoE₂ han sido utilizados en un amplio rango de modelos mitocondriales y celulares, donde demostraron tener efectos protectores contra el daño oxidativo. En muchos casos, estos disminuyen los niveles de ERO citoplasmáticos evaluado con la fluorescencia del diclorofluoresceína citosólico, los aumentos de ésta son interpretados como aumento en la producción de H₂O₂, se podría sugerir que MitoQ₁₀ disminuye la salida de H₂O₂ mitocondrial, aunque este mecanismo no está del todo claro, tal vez sea por un efecto en pasos anteriores en la generación de H₂O₂. En un estudio se determinó que el MitoQ₁₀ no disminuyó la producción de O₂^{•-} medido por la oxidación de dihidroetidio, pero sí previno la peroxidación lipídica. Hay otros mecanismos por los cuales MitoQ₁₀ afecta el metabolismo de las ERO, la acumulación de cationes lipofílicos disminuye el potencial de membrana mitocondrial, disminuyendo así la producción de ERO, por el transporte reverso de electrones (33). La acción protectora del MitoQ₁₀ también se ha demostrado en otros blancos del daño inducido por ERO, como el ADNmt, estudios en fibroblastos dérmicos demostraron que disminuye el daño al ADNmt inducido por acción de rayos ultravioletas y H₂O₂. Además se ha estudiado los efectos antiinflamatorios del MitoQ, en modelos de células endoteliales, el efecto conocido de protección contra el estrés oxidativo fue acompañado por una supresión de la liberación de citoquinas proinflamatorias y un aumento de la producción del antiinflamatorio interleuquina 10. Una gran cantidad de evidencia demuestra que los antioxidantes son capaces de modular específicamente vías de supervivencia y muerte celular, y en concreto la función mitocondrial. Por otra parte en células HeLa y fibroblastos, MitoQ ha demostrado inhibir eficientemente la fisión mitocondrial, lo que demuestra la participación en otros procesos mitocondriales como la dinámica mitocondrial. Sin embargo, es necesaria más investigación para determinar el principal mecanismo de acción. Los efectos protectores van a depender del tipo de célula, del número de mitocondrias en las células, y la medida en la que las células dependen de la fosforilación oxidativa (6).

En resumen, la evidencia actual indica que MitoQ₁₀ actúa predominantemente como un antioxidante a través de la prevención de la peroxidación de lípidos de la MMI. Aún se requiere más experimentación para determinar si este modelo se aplica a todos los tipos de células y formas de estrés oxidativo (33). Si bien es evidente que MitoQ es una herramienta de investigación útil en mitocondrias y células aisladas, para funcionar como una terapia el compuesto debe alcanzar y acumularse en las mitocondrias de las células de pacientes, preferiblemente tras la administración oral. Como los cationes lipofílicos atraviesan fácilmente las bicapas lipídicas, pueden ser capaces de cruzar eficientemente del sistema digestivo al

torrente sanguíneo y desde allí alcanzar la mayoría de los tejidos, incluidos el sistema nervioso central a través de la barrera hemato-encefálica (37). Se ha visto que tras la administración intravenosa de TPMP⁺, hay una distribución rápida en corazón, cerebro, músculo e hígado. Un avance importante en esta área fue el descubrimiento de que los compuestos derivados del TPP⁺ son biodisponibles por administración vía oral en ratones, demostrado por la alimentación a estos con 500 µM de TPMP⁺, MitoE y MitoQ en el agua de beber, y se evidenció absorción en plasma y luego en corazón, cerebro, hígado y músculo, con una cantidad de compuesto acumulado ligeramente inferior para el MitoQ, tal vez debido a su mayor hidrofobicidad. A su vez, para ser terapéuticamente útiles deben ser retirados a una velocidad razonable, sin acumularse de manera irreversible; se observó que tienen una tasa de eliminación relativamente rápida, y que esta fue similar en todos los órganos estudiados, siendo importante la reversibilidad del tratamiento (38).

La toxicidad de los cationes lipofílicos que se encuentran en las mitocondrias y células, evidenciada *in vitro*, también se reproducen *in vivo* y esto probablemente sea el factor principal que limita la cantidad de compuesto que se pueda administrar sin resultar peligroso (37). En evaluaciones de toxicidad en ratones, se observó que el TPMP⁺ y MitoE fueron bien tolerados a dosis de 30 mg y 60 mg/kg/día respectivamente administrados por el agua potable, y la dosis máxima tolerada i.v. fue 6, 10 y 20 mg/kg para TPMP⁺, MitoE y MitoQ, respectivamente. Un aspecto interesante radica en que estas dosis fueron similares a pesar de las muy diferentes cadenas laterales e hidrofobicidad, lo cual implica que la toxicidad de estos compuestos es determinada por el catión lipofílico y no por sus cadenas laterales (38).

El siguiente paso es determinar si la cantidad de MitoQ acumulado es suficiente para actuar como antioxidante *in vivo*. Durante un estudio se administró 500µM de MitoQ₁₀ en el agua de ratones por dos semanas, luego se aisló el corazón expuesto a una injuria de isquemia/reperfusión en un sistema de perfusión Langendorff, se observó protección de la función cardíaca, daño tisular y función mitocondrial, en comparación con TPMP⁺ y ubiquinol de cadena corta (Q₃OH) el cual tiene el mismo efecto que el MitoQ pero no se acumula selectivamente en la mitocondria, lo que indica que el efecto del MitoQ es debido a una acumulación selectiva en la mitocondria y la protección contra el daño oxidativo, en lugar de una simple consecuencia de la acumulación de cationes lipofílicos o un aumento de la actividad antioxidante citosólica. El mecanismo antioxidante más probable para la protección observada por MitoQ en estos experimentos es la inhibición en la peroxidación lipídica de la MMI (39).

MitoQ ha mostrado ser beneficioso en modelos de animales de enfermedad cardiovascular y metabólica, incluido injuria cardíaca por isquemia/reperfusión, diabetes, sepsis, daño endotelial por nitroglicerina, hipertensión, daño renal en Diabetes tipo I, entre otras (6). Estudios en

ratones demostraron que la administración de MitoQ puede preservar la función mitocondrial y atenuar el desarrollo de algunas características del síndrome metabólico, y mostró un efecto protector de la función renal ante una injuria isquémica (40,41). Además se ha visto que revirtió la disfunción endotelial, y fue cardioprotector ante doxorrubicina (un agente quimioterápico), e incluso se ha estudiado como potencial intervención terapéutica en conjunción con fármacos antihipertensivos para atenuar la hipertrofia ventricular izquierda. MitoQ ha demostrado beneficios en patologías del sistema nervioso central, disminución significativa de la apoptosis neuronal y del estrés oxidativo en ratas (6). Ha demostrado ser un potencial tratamiento en enfermedades neurológicas como la esclerosis lateral amiotrófica, la ataxia espinocerebelosa tipo 1, la enfermedad de Parkinson e incluso la enfermedad de Alzheimer (42–45).

Los resultados positivos en modelos animales condujeron al desarrollo de MitoQ₁₀ como un producto farmacéutico y que se evaluó en ensayos de fase II en los seres humanos. Fue utilizado por primera vez para determinar si podría ralentizar la progresión de la enfermedad de Parkinson en el ensayo PROTECT (www.clinicaltrials.gov: NCT00329056). Se administró de manera randomizada MitoQ₁₀ en dosis de 40mg, 80mg y placebo, durante 12 meses. En este estudio no se vio beneficios clínicos, pero sí se comprobó su seguridad y tolerancia (46). El segundo ensayo en humanos con MitoQ₁₀ fue el estudio CLEAR en paciente con hepatitis crónica por virus de hepatitis C (www.clinicaltrials.gov: NCT00433108). Los participantes recibieron dosis de 40 mg, 80 mg, o placebo durante 28 días. Ambos grupos de tratamiento mostraron una disminución significativa en el suero de alanina transaminasa, lo que sugiere que MitoQ₁₀ puede reducir el daño hepático debido a la inflamación asociada con la infección por el virus de la hepatitis C. Más importante aún, este estudio fue el primer informe de un beneficio clínico del uso de antioxidantes dirigidos a las mitocondrias en los seres humanos. Este resultado, junto con los datos de seguridad del mismo año para MitoQ₁₀ del estudio de la enfermedad de Parkinson, sugirió que valía la pena investigar MitoQ₁₀ en enfermedades hepáticas crónicas que implican el daño oxidativo mitocondrial (35). Por lo tanto, se puso en marcha un estudio de fase IIB en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, el ensayo MARVEL (www.clinicaltrials.gov: NCT01167088), aunque no pudo completarse dado la falta de participantes. Dos estudios comenzaron en el año 2015, uno en pacientes con enfermedad renal crónica y los efectos en la función vascular (www.clinicaltrials.gov: NCT02364648), el otro es sobre la eficacia de la suplementación con MitoQ para las funciones fisiológicas (vasculares, motoras y cognitivas) en adultos de mediana y avanzada edad (www.clinicaltrials.gov: NCT02597023).

En general, estos hallazgos hasta la fecha sugieren que administrar por vía oral antioxidantes dirigidos a la mitocondria por la conjugación de un catión lipofílico puede ser aplicable a la

amplia gama de patologías humanas que implican daño oxidativo mitocondrial. Con suerte, los estudios en marcha y próximos indicarán si MitoQ₁₀ y/o compuestos relacionados pueden disminuir daño oxidativo mitocondrial en una serie de enfermedades, y si esto mejora el resultado para el paciente (35).

MitoQ y esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La ELA es un desorden neurodegenerativo caracterizado por una degeneración progresiva de las motoneuronas superiores e inferiores, resultando en una parálisis muscular, grave atrofia de los músculos, e insuficiencia respiratoria con pronóstico mortal. La supervivencia de la ELA se encuentra entre 2 a 5 años partir de la aparición de síntomas. El 10% de los casos son vinculados a herencia familiar, siendo de etiología esporádica en el 90% restante (47). El estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial tanto en neuronas como en la glía han sido implicadas como protagonistas clave en la patogenia de esta enfermedad (42). Estudios de modelos de ratones transgénicos demostraron que los astrocitos SOD1^{G93A} (mutación de SOD1 hereditaria vinculada a ELA) muestran altos niveles de O₂^{•-} y daño nitro-oxidativo, esta disfunción mitocondrial disminuye la capacidad de mantener la supervivencia de las neuronas motoras, siendo este un factor clave en la progresión de la enfermedad ELA (48). Se estudiaron ratones transgénicos con la mutación SOD1^{G93A}, a los cuales se les administró 500 µM de MitoQ vía oral en el agua una vez manifestados los síntomas, lo cual ocurrió a los 90 días (para que sea un escenario extrapolable a humanos con diagnóstico de ELA), y durante 20 días. Se encontró que el MitoQ protegió la función mitocondrial en médula espinal y músculo cuádriceps, disminuyendo el daño nitro-oxidativo en el sistema nervioso y la pérdida de motoneuronas y astrogliosis (aumento anormal de esta glía en respuesta al daño neuronal). Además, se observó que preserva la integridad de la placa motora del músculo extensor largo de los dedos, aumenta la fuerza de agarre de los miembros posteriores al final de la enfermedad (solamente en hembras), y prolonga la supervivencia tanto en machos como hembras (42). En conclusión, el tratamiento con MitoQ de astrocitos SOD1^{G93A} reduce el estrés nitro-oxidativo y la disfunción mitocondrial en esta célula y de esta forma reduce su toxicidad hacia las motoneuronas en co-cultivos (42,48). Estos resultados sugieren que la reducción del daño nitrooxidativo en la mitocondria retrasa la progresión de la enfermedad y los signos patológicos, ofreciendo una terapia alternativa alentadora para el tratamiento de la ELA (42).

6.2.2 Derivados Catiónicos Plastoquinona (SkQs)

Los derivados plastoquinona catiónicos son compuestos combinados con fracciones de fosfonio o rodamina cargadas positivamente, conectadas a la plastoquinona mediante cadenas de 5 o 10

átomos de carbono. La plastoquinona es una quinona que ejerce su función en la CTE del cloroplasto, y se comporta como un mejor antioxidante que la ubiquinona. El compuesto prototípico es el SkQ1 (plastoquinonil deciltrifenilfosfonio). Se estima que la concentración de SkQ1 en la cara interna de la MMI es $1,3 \times 10^8$ veces mayor que en el espacio extracelular, explicado por la ecuación de Nernst y el coeficiente de distribución membrana/agua que es 13.000:1 para SkQ1; la formación de un complejo entre este compuesto catiónico con la cardiolipina podría aumentar aún más su acumulación (6,49). La plastoquinona, en su forma reducida, interrumpe efectivamente la cadena de lipoperoxidación (50). En mitocondrias aisladas SkQ1 actuó como un potente antioxidante a concentración nanomolar protegiendo a la cardiolipina contra la oxidación por $\cdot\text{OH}$. Dicha oxidación sería capaz de iniciar apoptosis, y al bloquearla, SkQ1 puede prevenir la muerte celular. En líneas de cultivos celulares humanos, se determinó que concentraciones muy pequeñas (en el rango nanomolar) de SkQ previnieron la apoptosis inducida por ERO. Con estos resultados se podría esperar un rol de los SkQs en el tratamiento de patologías relacionadas con la senescencia y en la extensión del período saludable de vida (49). Además, se probó que SkQ1 también es un antioxidante reciclable ya que puede ser reducido por el complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y que en la mitocondria SkQ1 estaría principalmente en su forma reducida (49,51). A concentración micromolar SkQ1 mostró un fuerte efecto prooxidante, al igual que MitoQ, aunque la “ventana” entre concentraciones antioxidantes y prooxidantes fue marcadamente más amplia que para MitoQ (49). Efectos de estos compuestos *in vivo* y *ex vivo* fueron estudiados en cuanto a enfermedades relacionadas con ERO y la edad, desarrollo de tumores, patología ocular relacionada con la edad, y supervivencia y senescencia, con resultados alentadores (52–56).

6.2.3 Péptidos

Existen dos tipos de vehículos mitocondriales basados en péptidos: los Szeto-Schiller (SS) y los Péptidos Penetrantes en la mitocondria (MPP). Los péptidos SS son tetra péptidos hidrófilos altamente polares con tres cargas positivas a pH fisiológico, en su estructura se alternan aminoácidos aromáticos como la dimetiltirosina y fenilalanina con residuos catiónicos como la arginina y lisina, ésta alternancia en su estructura permite que estos péptidos se acumulen de 1000 a 5000 veces en la mitocondria y se localicen en la MMI en forma independiente del potencial de membrana. Además penetran en diversos tipos de células sin necesidad de transportadores específicos (57). Según la posición de los diferentes aminoácidos podemos encontrar diferentes variedades estructurales de estos péptidos: H-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (SS-02); H-D-Arg-Dmt-Lys-Phe-NH₂ (SS-31) y H-Phe-D-Arg-Phe-Lys-NH₂ (ss-20). Los

péptidos que tienen tirosina o dimetiltirosina (SS-31 y SS-02) pueden proteger eficientemente a la mitocondria del daño producido por H_2O_2 y $ONOO^-$ e inhibir la peroxidación de LDL actuando como antioxidantes (58). En condiciones patológicas como la isquemia, se ha determinado que el péptido SS-31 evita la oxidación de la cardiolipina por el citocromo c, permitiéndole a éste seguir funcionando como transportador de electrones, evitando la progresión a la apoptosis (59). En la enfermedad de Alzheimer SS-31 protege a las mitocondrias y las sinapsis de la toxicidad del Beta Amiloide ($A\beta$), presunto agente causal de esta enfermedad (60). La absorción de estos péptidos depende de la concentración, no es saturable y no requiere energía, son pequeños, fáciles de sintetizar, resistentes a las peptidasas gracias a la presencia del residuo D en el N-terminal (58).

Por otro lado, los MPP, son péptidos pequeños con carga positiva y lipofílicos, si bien resta aún dilucidar el mecanismo específico de entrada a la mitocondria, se sabe que estos péptidos MPP penetran en la mitocondria dependiendo del gradiente de potencial de membrana. Los MPP que tienen ciclohexilalanina se captan más en la mitocondria que los que poseen fenilalanina, por lo tanto, pequeños cambios en su estructura generan diferente concentración mitocondrial. Su síntesis es sencilla y son biocompatibles, lo que los convierte en un buen blanco como vehículos mitocondriales (61).

6.2.4 Nanotecnología

Los nanotransportadores están compuestos de materiales biodegradables y biocompatibles, tales como polímeros de lípidos auto-ensamblados, los cuales son capaces de llevar moléculas con actividades farmacológicas tales como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, o fármacos de bajo peso molecular y profármacos. Estos vehículos de distribución basados en nanopartículas (NP) necesitan ser diseñados con el tamaño preciso, la superficie lipofílica, carga apropiada, y fracciones con direccionamiento específicos en la superficie (26). Uno de los compuestos más estudiados dentro de los nano-vehículos son las vesículas liposomales a base de decualinio, denominados DQAsomes, los cuales penetran en las células a través del proceso de endocitosis y, una vez dentro de las células, escapa del compartimiento endosomal a través de la desestabilización de las membranas endosomales. Se ha postulado que estas partículas de entrega son atraídas por las mitocondrias por interacciones electrostáticas, después de lo cual se fusionan con la MME (62). La entrega mitocondrial de DQAsome cargado con el antioxidante curcumina ha sido utilizado *in vitro* en modelos de pulmón, demostrando eficacia en el direccionamiento específico a la mitocondria y actividad antioxidante. Estos resultados permiten proyectar tratamientos prometedores dirigidos a la injuria pulmonar aguda (62). Recientemente se creó otro nanotransportador llamado MITO-porter, que es capaz de transportar partículas con

diferentes propiedades electroquímicas mediante endocitosis y entrega mitocondrial mediante fusión de membrana (6). Un estudio realizado en un modelo de hígado de ratón demostró la disminución de la lesión por isquemia reperusión mediante la administración de CoQ10 transportada por MITO-porter. También confirmaron que la modificación de la superficie del MITO-Porter con el agregado de la octa-arginina R8 contribuyó a la acumulación hepática y direccionamiento mitocondrial (63).

6.2.5 Porfirinas de Manganeso

Las porfirinas de manganeso (MnP) son metaloporfirinas que se han desarrollado para mimetizar cinética y termodinámicamente la catálisis de dismutación de $O_2^{\cdot-}$ por la SOD mitocondrial (MnSOD) (6,32). Están compuestas por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales y un átomo de manganeso en el centro, unido mediante cuatro enlaces de coordinación. Esta estructura preserva la integridad del sitio metálico, el cual es el sitio redox activo. Debido a sus múltiples cargas catiónicas e hidrofobicidad de sus sustituyentes, se acumulan en la matriz mitocondrial (32).

Las MnP reducen y oxidan $O_2^{\cdot-}$ con una constante de velocidad cercana o idéntica a la SOD. Además reaccionan con un amplio espectro de especies reactivas como el $ONOO^-$, $^{\cdot}NO$, radical anión carbonato ($CO_3^{\cdot-}$), hipoclorito (ClO^-), H_2O_2 , con reductores celulares como el GSH, con proteínas de señalización y factores de transcripción. Muchas de estas reacciones no son catalíticas, pero pueden serlo *in vivo*, dependiendo del ambiente redox (32). Pueden actuar tanto como antioxidantes o prooxidantes. Los miméticos SOD pueden considerarse parte de la defensa antioxidante sólo cuando están acoplados a un sistema que remueva el H_2O_2 (32). Se ha observado efectividad de estos compuestos en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer (principalmente en combinación con radioterapia y quimioterapia), diabetes, enfermedades e injurias del sistema nervioso central, y radioprotección en estudios de imagen.(6,64). En un estudio con ratones $SOD1^{G93A}$ se les administró la MnP AEOL 10150 (manganeso [III] tetrakis [N-N'-dietilimidazolium-2-yl] porfirina) al inicio de los síntomas, y se observó un aumento de la supervivencia (65). Las MnTDE-2-Imp⁵⁺ pasaron la fase I de seguridad/toxicidad de ensayos clínicos en pacientes con ELA, y se han puesto en marcha ensayos clínicos en fase I-II con MnTE-2-Pyp⁵⁺ en pacientes con cáncer de cabeza y cuello para radioprotección (32).

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En esta revisión se expusieron diferentes terapias dirigidas a la mitocondria, ya que es ésta la principal fuente de ERO y principal blanco de daño oxidativo.

Concluimos, que dentro de las terapias redox, el direccionamiento específico a la mitocondria brinda beneficios más claros y mejora la eficacia terapéutica. Dentro de estas, MitoQ ha sido la terapia redox que ha mostrado resultados más prometedores, es el más extensamente evaluado y mejor entendido. MitoQ₁₀ y MitoE₂ han sido utilizados en un amplio rango de modelos mitocondriales y celulares, donde demostraron tener efectos protectores contra el daño oxidativo, y los resultados positivos en modelos animales condujeron al desarrollo de MitoQ₁₀ como un producto farmacéutico y que se evaluó en ensayos de fase II en seres humanos (33,63). Además, se ha demostrado la participación de MitoQ en otros procesos mitocondriales como la dinámica mitocondrial y actividad antiinflamatoria (6).

Si bien las otras terapias dirigidas a la mitocondria son efectivas en cuanto al direccionamiento, y algunas en la actividad antioxidante *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, la mayoría no se encuentra en fase clínica. El desarrollo de la investigación en humanos de estos compuestos supone un escenario alentador para el futuro. Sin embargo, en la literatura a la fecha el MitoQ es la terapia dirigida a la mitocondria más avanzada desde el punto de vista de la investigación y de la terapéutica.

8. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Marianela Rodríguez por su disposición e información brindada acerca de actualizaciones sobre enfermedades mitocondriales.

9. REFERENCIAS

1. Smith RAJ, Hartley RC, Cocheme HM, Murphy MP. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(6):341–52.
2. Chance, B.; Sies, H.; Boveris A. Hydroperoxide Metabolism in Mammalian Organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527–605.
3. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;2(522):335–44.
4. Klug D, Rabani J, Fridovich I. A Direct Demonstration of the Catalytic Action of Superoxide Dismutase through the Use of Pulse Radiolysis. *Journay Biol Chem.* 1972;247(15):4839–42.
5. Fridovich I. Superoxide Dismutases. *Journay Biol Chem.* 1989;264(14):7761–4.
6. Apostolova N, Victor VM. Molecular Strategies for Targeting Antioxidants to Mitochondria: Therapeutic Implications. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(8):686–729.
7. Sánchez GM. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Rev Cuba Farm.* 2005;39(3).
8. Pryor W a. OXY-RADICALS AND RELATED and Reactions. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:657–67.
9. Molina, A., Calderón, E., Sierra, E., Cortés, C., Gaona, F., Clemente M. PAPEL PATOFISIOLÓGICO DEL ÓXIDO NÍTRICO MITOCONDRIAL. *Mensaje Bioquímico.* 2004;28:27–43.
10. Lopez-Figueroa M, Caamaño C, Morano M , Rønn L, Akil H WS. Direct Evidence of Nitric Oxide Presence within Mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:129–33.
11. Diana V. Castillo-Padilla SR-AR. Interacción entre factores neurotróficos y especies reactivas de oxígeno en los mecanismos de muerte y proliferación celular. *Arch Neurocién.* 2011;16(1):26–32.
12. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo Y Do. Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling. *Mol Cells.* 2011;32:491–509.
13. Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems : Source , Biochemistry , and Role in Human Disease. *Am J Med.* 1991;91:14–22.
14. Ramírez-vargas NG, Berrón-ruiz LR, Berrón-pérez R, Blancas-galicia L. Diagnóstico de enfermedad granulomatosa crónica; pacientes y portadoras. 2011;58(2):120–5.
15. Acosta AG, Vermolen JÁ, Andara CV, Pirela VB, Arias FB. Mecanismos moleculares. *Arch Venez Farmacol y Ter.* 2006;25(2):54–9.
16. Chen Y, Zhang H, Zhou H, Ji W, Min W. Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. *Cancers (Basel).* 2016 Mar 25;8(4):40.
17. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism : a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016;7(6):1–12.
18. Walters JW, Amos D, Ray K, Santanam N. ScienceDirect Mitochondrial redox status as a target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;27:50–5.
19. H. S. Oxidative Stress. H S, editor. Londres: Academic Press; 1985. 1-8 p.
20. Luna-ortiz P, Flores-chávez P, Martínez-rosas M, Núm JB, Sección C. Las mitocondrias como blanco terapéutico. 2014;37(4):283–96.
21. Smith RAJ, Hartley RC, Cochemé HM, Murphy MP. Mitochondrial

- pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(6):341–52.
22. Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B. a Case of Severe Hypermetabolism of Nonthyroid Origin With a Defect in the Maintenance of Mitochondrial Respiratory Control: a Correlated Clinical, Biochemical, and Morphological Study. *J Clin Invest.* 1962;41(9):1776–804.
 23. Holt I J, Harding AE MHJ. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 1988;331:717–9.
 24. Wallace DC, Singh G LM. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber’s hereditary optic neuropathy. *Science (80-).* 1988;242:1427–30.
 25. Medicina F De, Radi R. Evolución del concepto de “ Estrés Oxidativo ”: medio siglo de aportes de la. 2014;1(2):9–22.
 26. Pathak, Rakesh K., Kolishetti, N. DS. Targeted Nanoparticles in Mitochondrial Medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2016;315–29.
 27. Herbert KE, Mistry N. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. 1998;392(April):1998.
 28. Suarna C, Wu BJ, Choy K, Mori T, Croft K, Cynshi O, et al. Protective effect of vitamin E supplements on experimental atherosclerosis is modest and depends on preexisting vitamin E deficiency. 2006;41:722–30.
 29. Omaye ST, Krinsky NI, Mayne ST, Liebler DC, Bidlackh- WR. β Carotene : Friend or Foe ? 1. 1997;4:163–74.
 30. Murphy MP. Selective targeting of bioactive compounds to mitochondria. 1997;7799:326–30.
 31. Gruber J, Fong S, Chen C, Yoong S, Pastorin G, Schaffer S, et al. Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing. *Biotechnol Adv.* 2013;31(5):563–92.
 32. Batinic-haberle I, Tovmasyan A, Spasojevic I. Redox Biology An educational overview of the chemistry , biochemistry and therapeutic aspects of Mn porphyrins – From superoxide dismutation to H₂O₂-driven pathways. *Redox Biol.* 2015;1–23.
 33. Murphy MP, Smith RAJ. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. 2007;
 34. Murphy, M. , Smith R. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 41. 2000;41:235–50.
 35. Smith RAJ, Hartley RC, Murphy MP, Al SET. Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics. 2011;15(12).
 36. Teicher,B. , Holden,S. , Cathcart K. Efficacy of Pt(Rh-123) as a Radiosensitizer with Fractionated x Rays. *Radialion Oncol Biol Phys.,* 1987;13(February):1217–24.
 37. Kelso GF, James AM, Ross MF, Cocheme HM, Trnka J, Mahendiran T, et al. Mitochondrial targeting of quinones : Therapeutic implications. 2007;94–102.
 38. Smith RAJ, Porteous CM, Gane AM, Murphy MP. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. 2003;100(9):5407–12.
 39. Adlam V, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RAJ, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 2005;19:1088–95.
 40. Fouret G, Tolika E, Lecomte J, Bonafos B, Aoun M, Murphy MP, et al. The mitochondrial-targeted antioxidant, MitoQ, increases liver mitochondrial cardiolipin content in obesogenic diet-fed rats. *Biochim Biophys Acta -*

- Bioenerg. 2015;1847(10):1025–35.
41. Dare AJ, Bolton EA, Pettigrew GJ, Bradley JA, Saeb-parsy K, Murphy MP. Redox Biology Protection against renal ischemia – reperfusion injury in vivo by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ. *Redox Biol.* 2015;5:163–8.
 42. Miquel E, Cassina A, Martínez-palma L, Souza JM, Bolatto C, Rodríguez-bottero S, et al. Neuroprotective effects of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2014;70:204–13.
 43. Stucki DM, Ruegsegger C, Steiner S, Radecke J, Murphy MP, Zuber B, et al. Mitochondrial impairments contribute to Spinocerebellar ataxia type 1 progression and can be ameliorated by the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:427–40.
 44. Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of parkinson’s disease: Preclinical and clinical outcomes. *BBA - Mol Basis Dis.* 2013;
 45. Mcmanus MJ, Murphy MP, Franklin JL. The Mitochondria-Targeted Antioxidant MitoQ Prevents Loss of Spatial Memory Retention and Early Neuropathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer ’ s Disease. *Neurobiol Dis.* 2011;31(44):15703–15.
 46. Investigators TPSGQ. A Randomized Clinical Trial of High-Dosage Coenzyme Q10 in Early Parkinson Disease No Evidence of Benefit. *JAMA Neurol.* 2015;71(5):543–52.
 47. Tsitkanou S, Russell AP, Della Gatta P. Skeletal Muscle Satellite Cells , Mitochondria , and MicroRNAs : Their Involvement in the Pathogenesis of ALS. *Front Physiology.* 2016;7(September):1–9.
 48. Cassina P, Cassina A, Pehar M, Castellanos R, Gandelman M, Leo D, et al. Mitochondrial Dysfunction in SOD1 G93A -Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration : Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *J Neurosci.* 2008;28(16):4115–22.
 49. Antonenko YN, Avetisyan A V, Bakeeva LE, Chernyak B V, Chertkov VA. Mitochondria-Targeted Plastoquinone Derivatives as Tools to Interrupt Execution of the Aging Program . 1 . Cationic Plastoquinone Derivatives : Synthesis and in vitro Studies. *Biokhimiya.* 2008;73(12):1273–87.
 50. Omarova EO, Antonenko YN. Inhibition of Oxidative Hemolysis in Erythrocytes by Mitochondria-Targeted Antioxidants of SkQ Series. *Biokhimiya.* 2014;79(2):139–45.
 51. Skulachev VP, Antonenko YN, Cherepanov DA, Chernyak B V, Izyumov DS, Khailova LS, et al. *Biochimica et Biophysica Acta* Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs). *BBA - Bioenerg.* 2010;1797(6-7):878–89.
 52. Bakeeva LE, Barskov I V, Egorov M V, Isaev NK, Kapelko VI, Kazachenko A V. Mitochondria-Targeted Plastoquinone Derivatives as Tools to Interrupt Execution of the Aging Program . 2 . Treatment of Some ROS- and Age-Related Diseases (Heart Arrhythmia , Heart Infarctions , Kidney Ischemia , and Stroke) . *Biokhimiya.* 2008;73(12):1288–99.
 53. Agapova LS, Chernyak B V, Domnina L V, Dugina VB, Efimenko AY, Fetisova EK, et al. Mitochondria Targeted Plastoquinone Derivatives as Tools to Interrupt Execution of the Aging Program . 3 . Inhibitory Effect of SkQ1 on Tumor

- Development from p53 Deficient Cells. *Tumor Dev from p53*. 2008;73(12):1622–40.
54. Neroev V V, Archipova MM, Bakeeva LE, Fursova AZ, Grigorian EN. Mitochondria-Targeted Plastoquinone Derivatives as Tools to Interrupt Execution of the Aging Program . 4 . Age-Related Eye Disease . SkQ1 Returns Vision to Blind Animals. *Biokhimiya*. 2008;73(12):1641–54.
 55. Anisimov VN, Bakeeva LE, Egormin PA, Filenko OF, Isakova EF, Manskikh VN. Mitochondria-Targeted Plastoquinone Derivatives as Tools to Interrupt Execution of the Aging Program . 5 . SkQ1 Prolongs Lifespan and Prevents Development of Traits of Senescence. *Biokhimiya*. 2008;73(12):1655–70.
 56. Skulachev VP, Anisimov VN, Antonenko YN, Bakeeva LE, Chernyak B V, Elichev VP, et al. *Biochimica et Biophysica Acta* An attempt to prevent senescence : A mitochondrial approach. *BBA - Bioenerg*. 2009;1787(5):437–61.
 57. Szeto HH, Schiller PW. *Novel Therapies Targeting Inner Mitochondrial Membrane — From Discovery to Clinical Development*. Springer. 2011;28:2669–79.
 58. Szeto HH. Cell-permeable , Mitochondrial-targeted , Peptide Antioxidants. *AAPS J*. 2006;8(2):277–83.
 59. Birk A V, Chao WM, Bracken C, Warren JD, Szeto HH. Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/ cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. *Br J Pharmacol*. 2013;171:2017–28.
 60. Reddy PH, Tripathi R, Troung Q, Tirumala K, Reddy TP, Anekonda V, et al. *Biochimica et Biophysica Acta* Abnormal mitochondrial dynamics and synaptic degeneration as early events in Alzheimer ' s disease: Implications to mitochondria-targeted antioxidant therapeutics. *BBA - Mol Basis Dis*. 2012;1822:639–49.
 61. Horton KL, Stewart KM, Fonseca SB, Guo Q, Kelley SO. Mitochondria-Penetrating Peptides. *Chem Biol*. 2008;15:375–82.
 62. Zupanc S, Kocbek P, Zariwala MG, Renshaw D, Gul MO, Elsaid Z, et al. Design and Development of Novel Mitochondrial Targeted Nanocarriers, DQAsomes for Curcumin Inhalation. *Mol Pharm*. 2014;
 63. Yamada Y, Nakamura K, Abe J, Hyodo M, Haga S, Ozaki M, et al. Mitochondrial delivery of Coenzyme Q 10 via systemic administration using a MITO-Porter prevents ischemia / reperfusion injury in the mouse liver. *J Control Release*. 2015;213:86–95.
 64. Tovmasyan A., Sheng H., Weitner T., Arulpragasam A., Lu M. WD. Design, Mechanism of Action, Bioavailability and Therapeutic Effects of Mn Porphyrin-based Redox Modulators. *Med Princ Pr*. 2013;22(2):103–30.
 65. Crow JP, Calingasan NY, Chen J, Hill JL, Beal MF. Manganese Porphyrin Given at Symptom Onset Markedly Extends Survival of ALS Mice. *Am Neurol Assoc*. 2005;58(2):258–65.