



TESIS DOCTORAL

PAPEL DE QBA EN ENVEJECIMIENTO Y NEURODEGENERACIÓN

MARTA PAREDES BARQUERO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Con la conformidad de las directoras:

Dra. Mireia Niso Santano

Dra. Guadalupe Martínez Chacón

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y codirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2023

Este proyecto de investigación ha sido realizado gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

1. Financiación adicional asociada a la ayuda RYC-2016-20883 financiada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por El FSE invierte en tu futuro.



2. Proyecto RTI2018-099259-A-I00 financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa



Marta Paredes Barquero ha sido beneficiaria de una beca del Plan Propio de Iniciación a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación de la Universidad de Extremadura (01/02/2019-28/02/2023).

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
ACRÓNIMOS.....	12
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ÍNDICE DE TABLAS	20
INTRODUCCIÓN	23
1.ENVEJECIMIENTO	23
1.1.ALTERACIONES EPIGENÉTICAS.....	24
1.2.ALTERACIÓN DE LA MACROAUTOFAGIA	25
1.3.PÉRDIDA DE PROTEOSTASIS	27
1.4.DESREGULACIÓN DE LA DETECCIÓN DE NUTRIENTES	28
1.5.DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL	29
1.6.SENESCENCIA CELULAR	30
2.SÍNDROME DE PROGERIA DE HUTCHINSON-GILFORD COMO MODELO DE ENVEJECIMIENTO.....	31
3.ENFERMEDADES ASOCIADAS AL ENVEJECIMIENTO	32
3.1.ENFERMEDAD DE HUNTINGTON	33
4.HERRAMIENTAS TERAPÉUTICAS: PRODUCTOS NATURALES.....	35
4.1.QBA.....	35
OBJETIVOS.....	41
OBJECTIVES	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1.CULTIVOS CELULARES.....	47
1.1.LÍNEAS CELULARES	47
1.2.CULTIVOS PRIMARIOS	48
1.3.MANTENIMIENTO CELULAR.....	49
1.4.MÉTODOS DE CULTIVO	50
1.4.1. Descongelación/congelación	50
1.4.2. Pase y siembra celular.....	51
1.4.3.Tratamientos	53
2.MODELOS MURINOS	54
2.1.PROCEDIMIENTO	54
2.2.MODELOS ANIMALES UTILIZADOS.....	54
2.2.1.Ratones ICR.....	54
2.2.2.Ratones R6/1	55
2.2.3.Ratones <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	56
3.DETECCIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING	59
3.1.LISADO DE CÉLULAS	59
3.1.1.Lisado total.....	60
3.1.2.Lisado fraccionado.....	60
3.2.LISADO DE ÓRGANOS	61
3.3.CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	61
3.4.ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	62
3.5.TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS	63
3.5.1.Análisis por Filter Trap.....	63

3.5.2. <i>Transferencia en húmedo</i>	64
3.5.3. <i>Transferencia en semi-seco</i>	65
3.6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS	65
3.7. REVELADO	67
4. TRANSFECCIÓN CELULAR.....	67
5. SILENCIAMIENTO GÉNICO.....	68
6. TÉCNICAS DE IMAGEN	69
6.1. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	69
6.2. MICROSCOPIA CONFOCAL	70
6.3. PROCESADO DE LAS IMÁGENES	70
6.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	71
6.5. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	71
7. TÉCNICAS CON ARN	71
7.1. EXTRACCIÓN DE ARN.....	71
7.2. SÍNTESIS DE ADN CODIFICANTE	72
7.3. PCR CUANTITATIVA.....	73
8. CITOMETRÍA DE FLUJO	73
9. ANÁLISIS PULSE-CHASE.....	74
10. ANÁLISIS METABÓLICO.....	76
11. ANÁLISIS DE SENESCENCIA	78
11.1. ANÁLISIS SENOMÓRFICOS.....	78
11.2. ANÁLISIS DE SENOPREVENCIÓN.....	79
11.3. TINCIÓN CON β -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA.....	80
12. ANÁLISIS DE PROTEOSTASIS	81
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	82
RESULTADOS	85
1. QBA INDUCE AUTOFAGIA <i>IN VITRO</i>	85
2. QBA INDUCE AUTOFAGIA <i>IN VIVO</i>.....	89
3. PAPEL DE SIRT1 EN LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA POR QBA.....	92
4. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE OTRAS SIRTUINAS POR QBA.....	95
5. IMPACTO DE QBA SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL	96
6. QBA REDUCE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR 6-OHDA	101
7. EFECTO DE QBA SOBRE LOS AGREGADOS Y PROTEOSTASIS <i>IN VITRO</i>.....	104
8. EFECTO DE QBA SOBRE LOS AGREGADOS <i>IN VIVO</i>.....	113
9. EFECTO DE QBA SOBRE LA SENESCENCIA.....	117
10. EFECTO DE QBA SOBRE EL ENVEJECIMIENTO	123
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIONES	142
CONCLUSIONS	145
BIBLIOGRAFÍA.....	148

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso fisiológico en el que se produce una pérdida gradual de las capacidades del organismo llevando aparejado un mayor riesgo de padecer patologías asociadas a la edad. Un proceso muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular es el mecanismo de autofagia, encargado de la eliminación de proteínas dañadas u orgánulos defectuosos. Este proceso se deteriora con la edad y su desequilibrio está relacionado con numerosas patologías, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas. Uno de los retos en el estudio del envejecimiento es la búsqueda de compuestos cuya actividad promueva la longevidad y/o retarde el envejecimiento y la aparición de enfermedades asociadas a la edad. QBA, el ácido graso mayoritario y exclusivo de la jalea real, ha ganado interés en los últimos años debido a sus propiedades fisiológicas y farmacológicas. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han permitido dilucidar el papel de QBA como inductor de autofagia y su capacidad para incrementar la longevidad de diferentes especies. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en estudiar el impacto de QBA en diferentes procesos celulares implicados en el envejecimiento y la neurodegeneración. Nuestros resultados muestran la capacidad de QBA de inducir autofagia, tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de la vía de SIRT1. Además, mejora la función mitocondrial, reduce la toxicidad inducida por 6-OHDA y contribuye en la eliminación de agregados proteicos. Finalmente, y pese a que no parece tener un efecto sobre la senescencia celular, si ejerce su efecto sobre ratones con envejecimiento prematuro.

Palabras clave: Envejecimiento, neurodegeneración, QBA.

ABSTRACT

Aging is a physiological process in which there is a gradual loss of the body's capacities, leading to an increased risk of age-related diseases. A very important process in the maintenance of cellular homeostasis is the autophagy mechanism, which is responsible for the elimination of damaged proteins or defective organelles. This process deteriorates with age and its imbalance is linked to numerous pathologies, including neurodegenerative diseases. One of the challenges in the study of ageing is the search for compounds whose activity promotes longevity and/or slows ageing and the onset of age-related diseases. QBA, the major fatty acid unique to royal jelly, has gained interest in recent years due to its physiological and pharmacological properties. Previous work carried out in our laboratory has elucidated the role of QBA as an autophagy inducer and its capacity to increase longevity in different species. In this PhD thesis we have focused on studying the impact of QBA on different cellular processes involved in ageing and neurodegeneration. Our results show the ability of QBA to induce autophagy, both in vitro and in vivo, through the SIRT1 pathway. In addition, it improves mitochondrial function, reduces 6-OHDA-induced toxicity and contributes to the elimination of protein aggregates. Finally, although it does not appear to have an effect on cellular senescence, it does have an effect on mice with premature ageing.

Keywords: Aging, neurodegeneration, QBA.

ACRÓNIMOS

10-H₂DA: Ácido 10-hidroxi-trans-2-decenoico

10-HDA: Ácido 10-hidroxicanoico

3-MA: 3-Metiladenina

6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNmt: ADN mitocondrial

AMC: Autofagia mediada por chaperonas

AMPK: del inglés "*AMP-activated protein kinase*"

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATGs: del inglés "*autophagy related genes*"

ATP: del inglés "*adenosine triphosphate*"

BAF.A1: Bafilomicina A1

BCA: del inglés "*bicinchoninic acid*"

BECN1: Beclina 1

BHE: Barrera hematoencefálica

BSA: del inglés "*bovine serum albumin*"

CAPS: del inglés "*N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid*"

CCCP: del inglés "*carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone*"

Cox-IV: Ciclooxygenasa IV

CQ: Cloroquina

DAPI: 4-6-diamidino-2-fenilindol

DEPC: del inglés "*diethyl pyrocarbonate*"

DMEM: del inglés "*Dulbeccos modified eagles medium*"

DMF: N,N-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfoxido

Doxo: Doxorubicin

EA: Enfermedad de Alzheimer

EBSS: del inglés "*Earle's balanced salt solution*"

ECL: del inglés "*Enhanced chemiluminescent by luminol*"

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacetato

EH: Enfermedad de Huntington

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EN: Enfermedades neurodegenerativas

EP: Enfermedad de Parkinson

ER: Retículo endoplásmico

FBS: del inglés "*fetal bovine serum*"

FCCP: Carbonyl-cyanide-*p*-trifluorometoxyphenylhydrazone

FITC: del inglés "*fluorescein isothiocyanate*"

FOXO: del inglés "*forkhead box O*"

FTA: del inglés "*filter trap assay*"

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: del inglés "*Green fluorescent protein*"

HATs: Histonas acetiltransferasas

HDACs: Histonas deacetilasas

HEPES: del inglés "*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid*"

HGPS: Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford

Ho: Hoechst 33342

HRP: del inglés "*horseradish peroxidase*"

HTT: Huntingtina

IF: Inmunofluorescencia

IGF-1: del inglés "*insulin-like growth factor 1*"

IP: Ioduro de propidio

JR: Jalea real

KD: del inglés "*knockdown*"

LAMPs: del inglés "*Lysosomal associated membrane proteins*"

LC3: del inglés "*microtubule-associated protein 1 light chain 3*"

LMNA: Lamina A/C

LTR: del inglés "*Lysotracker red*"

MET: Microscopía electrónica de transmisión

MFN1: Mitofusina 1

MG-132: Carbobenzoxi-L-leucil-L-leucil-L-leucinal, Z-LLL-CHO

mHTT: Huntingtina mutada
MTOC: del inglés “*microtubule-organizing center*”
mTOR: del inglés “*mammalian target of rapamycin*”
MTORC1: del inglés “*mammalian target of rapamycin kinase complex 1*”
NBR1: del inglés “NBR1 autophagy cargo receptor”
NF- κ B: del inglés “*nuclear factor kappa B*”
NP- 40: del inglés “*nonylphenoxypoly-ethoxy-ethanol*”
Nrf2: del inglés “*nuclear factor erythroid 2-related factor*”
OCR: del inglés “*oxygen consumption rate*”
OPTN: Optineurina
Palbo: Palbociclib
PARP: Poli(ADP-ribosa) polimerasa
PBS: del inglés “*phosphate buffer saline*”
PCR: del inglés “*polymerase chain reaction*”
PE: Fosfatidiletanolamin
PFA: Paraformaldehido
PGC1 α : del inglés “*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*”
PHB: Prohibitina 1
PI3KC3/VPS34: Fosfatidil inositol-3-quinasa de clase 3
PINK1: del inglés “*PTEN-induced kinase 1*”
PVDF: del inglés “*polivinil difluoruro*”
QBA: del inglés “*queen bee acid*”
Rapa: Rapamicina
RE: Retículo endoplásmico
ROS: del inglés “*reactive oxygen species*”
RSV: Resveratrol
SA- β -Gal: Beta galactosidasa asociada a la senescencia

SAPS: del inglés “senescence-associated secretory phenotype”
SDS-PAGE: del inglés “*SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*”
SDS: del inglés “sodium dodecil sulfate”
SiRNA: del inglés “*small interfering RNA*”
SIRT5: Sirtuinas desacetilasas dependientes de NAD
SNAREs: del inglés “*soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptors*”
SODs: Superóxido dismutasas
SQSTM1/p62: del inglés “*sequestosome 1*”
SUP: Sistema ubiquitin-proteosoma
T a : Temperatura
TBS: del inglés “*Tris buffer saline*”
TCA: del inglés “trichloroacetic acid”
TFEB: del inglés “*transcription factor EB*”
TGM: Tris glicina metanol
TIMM23: del inglés “*translocase of inner mitochondrial membrane 23*”
TOMM20: del inglés “*translocase of outer mitochondrial membrane 20*”
TTBS: del inglés “*Tween-tris buffer saline*”
UAR: Unidades arbitrarias relativas
UB: Ubiquitina
ULK1: del inglés “*Unc-51 like autophagy activating kinase 1*”
UV: Luz ultravioleta
VDAC1: del inglés “*voltage dependent anion channel 1*”
WB: del inglés “*western blotting*”
WT: silvestre, del inglés “*wild type*”
 Λ : Longitud de onda

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

ILUSTRACIÓN 1. LOS SIGNOS DEL ENVEJECIMIENTO. (3)	23
ILUSTRACIÓN 2. ESQUEMA DEL PROCESO DE AUTOFAGIA. MODIFICADA DE (12)	27
ILUSTRACIÓN 3. PROTEÍNAS IMPLICADAS EN EL MANTENIMIENTO DE LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL (27)	30
ILUSTRACIÓN 4. REPRESENTACIÓN DE LA MUTACIÓN QUE OCURRE EN EL SÍNDROME DE PROGERIA DE HUTCHINSON-GILFORD (40)	32
ILUSTRACIÓN 5. COLAPSO DE LA PROTEOSTASIS EN EH (79)	35
ILUSTRACIÓN 6. COMPOSICIÓN DE LA JALEA REAL (84)	36
ILUSTRACIÓN 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE QBA (10-H ₂ DA) (87)	37
ILUSTRACIÓN 8. PRINCIPALES ENFERMEDADES SOBRE LAS QUE SE HA VISTO QUE QBA EJERCE SUS FUNCIONES (96)	38
ILUSTRACIÓN 9. CULTIVO PRIMARIO DE FIBROBLASTOS DE OREJA DE RATÓN	49
ILUSTRACIÓN 10. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA INYECCIÓN INTRAPERITONEAL REALIZADA EN RATONES ICR. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	54
ILUSTRACIÓN 11. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL EN EL AGUA DE BEBIDA DEL TRATAMIENTO REALIZADO EN RATONES ICR. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	55
ILUSTRACIÓN 12. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL EN EL AGUA DE BEBIDA DEL TRATAMIENTO REALIZADO EN RATONES R6/1. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	55
ILUSTRACIÓN 13. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA ADMINISTRACIÓN ORAL EN EL ALIMENTO DEL TRATAMIENTO REALIZADO EN RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} . SE MUESTRAN FOTOS REPRESENTATIVAS DE LOS FENOTIPOS QUE COMIENZAN A PRESENTAR LOS RATONES HOMOCIGOTOS (LAKIS) QUE PRESENTAN LA MUTACIÓN <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} , A PARTIR DE LAS 12 SEMANAS DE EDAD, COMO SON PARAFIMOSIS EN EL CASO DE LOS MACHOS, DEFORMACIÓN DE LA COLUMNA VERTEBRAL, PROBLEMAS EN LOS OJOS O PÉRDIDA DE PELO ENTRE OTROS. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	56
ILUSTRACIÓN 14. CONDICIONES DEL PROTOCOLO DE PCR PARA EL GENOTIPADO DE LOS RATONES <i>LMNA</i>	58
ILUSTRACIÓN 15. RESULTADO DE LA PCR PARA EL GENOTIPADO DE LOS RATONES <i>LMNA</i>	58
ILUSTRACIÓN 16. FOTOGRAFÍA REPRESENTATIVA DE LA REALIZACIÓN DE LA MEDIDA DE FUERZA EN LOS RATONES UTILIZANDO UN TENSÍOMETRO	59
ILUSTRACIÓN 17. A) FOTOGRAFÍA DEL APARATO BIO-DOT®. B) ESQUEMA DEL MONTAJE DEL APARATO BIO-DOT®	63
ILUSTRACIÓN 18. A) ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA FORMA CORRECTA PARA AJUSTAR LOS TORNILLOS Y CERRAR EL APARATO BIO-DOT®. B) POSICIONES DE LA VÁLVULA DE VACÍO A LO LARGO DEL PROCESO	64
ILUSTRACIÓN 19. CONDICIONES DE TRABAJO DEL TERMOCICLADOR T100	72
ILUSTRACIÓN 20. CONDICIONES DE TRABAJO DE LA MÁQUINA DE PCR <i>APPLIED BIOSYSTEM 7500</i>	73
ILUSTRACIÓN 21. ESQUEMA RESUMEN DE LOS PASOS REALIZADOS DURANTE EL ANÁLISIS "PULSE-CHASE". ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	76
ILUSTRACIÓN 22. PERFIL DEL SEAHORSE XF CELL MITO STRESS TEST. FUENTE: HTTPS://WWW.AGILENT.COM/EN/PRODUCT/CELL-ANALYSIS/REAL-TIME-CELL-METABOLIC-ANALYSIS/XF-ASSAY-KITS-REAGENTS-CELL-ASSAY-MEDIA/SEAHORSE-XF-CELL-MITO-STRESS-TEST-KIT-740885	77
ILUSTRACIÓN 23. REPRESENTACIÓN DE UN POCILLO DEL CARTUCHO, CON LOS CUATRO PUERTOS QUE PRESENTA Y LOS VOLÚMENES QUE SE AÑADEN A CADA UNO DE ELLOS	78
ILUSTRACIÓN 24. A) CRONOGRAMA DE REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS SENOMÓRFICO. B) DISTRIBUCIÓN DE UNA PLACA DE 6 POCILLOS PARA EL ANÁLISIS SENOMÓRFICO. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	79
ILUSTRACIÓN 25. A) CRONOGRAMA DE REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE SENOPREVENCIÓN. B) DISTRIBUCIÓN DE UNA PLACA DE 6 POCILLOS PARA EL ANÁLISIS DE SENOPREVENCIÓN. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	79
ILUSTRACIÓN 26. ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TINCIÓN CON X-GAL/DMF. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	80
ILUSTRACIÓN 27. ESQUEMA DE LA PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA LA TINCIÓN CON X-GAL/DMF. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	80
ILUSTRACIÓN 28. CRONOGRAMA DE REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE PROTEOSTASIS. ELABORACIÓN PROPIA CON <i>BIORENDER</i>	81

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. 1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA DURANTE 2 Y 4 HORAS, IN VITRO.	85
FIGURA 1. 2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA A 25 Y 50 μ M, IN VITRO.	86
FIGURA 1. 3. DETERMINACIÓN DEL FLUJO AUTOFÁGICO INDUCIDO POR QBA, IN VITRO.	87
FIGURA 1. 4. DETERMINACIÓN DE LA COLOCALIZACIÓN DE P62 Y LC3 TRAS LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA MEDIADA POR QBA.	88
FIGURA 1. 5. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS DE VIDA MEDIA LARGA POR QBA.	88
FIGURA 2. 1. INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA POR QBA, IN VIVO, A TIEMPOS CORTOS.	90
FIGURA 3. 1. EFECTO DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE SIRT1 SOBRE LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA POR QBA.	92
FIGURA 3. 2. IMPLICACIÓN DE SIRT1 EN LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR QBA, TRAS LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SIRT1, EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO.	93
FIGURA 3. 3. IMPLICACIÓN DE SIRT1 EN LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR QBA, TRAS LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE SIRT1, EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA MURINO.	94
FIGURA 3. 4. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE SIRT1 EN LA MODULACIÓN DE OTRAS PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	95
FIGURA 4. 1. MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE OTRAS SIRTUINAS POR QBA.	96
FIGURA 5. 1. ANÁLISIS DE LA MORFOLOGÍA DE MITOCONDRIAS TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	97
FIGURA 5. 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE QBA EN LOS NIVELES DE DISTINTAS PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA MITOCONDRIA.	98
FIGURA 5. 3. ANÁLISIS DEL ESTADO DEL METABOLISMO MITOCONDRIAL TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	99
FIGURA 5. 4. DETERMINACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE MITOFAGIA POR QBA.	101
FIGURA 6. 1. ANÁLISIS DEL EFECTO DE QBA SOBRE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR 6-OHDA, EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO.	102
FIGURA 6. 2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE QBA SOBRE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR 6-OHDA, EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA MURINO.	102
FIGURA 6. 3. EFECTO DE QBA EN LA MUERTE CELULAR TRAS EL TRATAMIENTO CON 6-OHDA.	103
FIGURA 7. 1. EFECTO DE QBA SOBRE LOS AGREGADOS, UTILIZANDO UNA LÍNEA CELULAR DEFECTIVA EN AUTOFAGIA, IN VITRO.	104
FIGURA 7. 2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE QBA SOBRE LOS NIVELES DE LC3 Y P62, TRAS EL BLOQUEO DE LA AUTOFAGIA Y LA GENERACIÓN DE AGREGADOS, IN VITRO.	106
FIGURA 7. 3. ESTUDIO DEL EFECTO DE QBA EN LOS NIVELES DE UBIQUITINACIÓN EN LA FRACCIÓN SOLUBLE E INSOLUBLE, TRAS LA INDUCCIÓN DE AGREGADOS, IN VITRO.	107
FIGURA 7. 4. ANÁLISIS DEL EFECTO DE QBA SOBRE LOS NIVELES DE OTRAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA ELIMINACIÓN DE AGREGADOS, IN VITRO.	108
FIGURA 7. 5. EFECTO DE QBA SOBRE LOS AGREGADOS INDUCIDOS POR PUROMICINA, IN VITRO.	109
FIGURA 7. 6. ESTUDIO DEL NÚMERO DE PUNTOS UB+ POR CÉLULA TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA Y LA GENERACIÓN DE AGREGADOS CON PUROMICINA, IN VITRO.	110
FIGURA 7. 7. GENERACIÓN DE AGREGADOS POR EGFP-HTT-Q74, IN VITRO.	111
FIGURA 7. 8. EFECTO DE QBA SOBRE LOS AGREGADOS GENERADOS CON EGFP-HTT-Q74, IN VITRO.	112
FIGURA 7. 9. RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA TRAS UN CHOQUE TÉRMICO, AL TRATAR LAS CÉLULAS CON QBA, IN VITRO.	113
FIGURA 8. 1. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE AGREGADOS EN LA FRACCIÓN INSOLUBLE EN CEREBRO TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	114
FIGURA 8. 2. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE CEREBRO TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	115
FIGURA 8. 3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA DE LA FRACCIÓN SOLUBLE EN CEREBRO TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	116
FIGURA 8. 4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE NRF2 EN LA PARTE SOLUBLE DE CEREBRO TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	117
FIGURA 9. 1. EFECTO DE QBA SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL EN CÉLULAS SENESCENTES.	118
FIGURA 9. 2. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA TINCIÓN CON β -GALACTOSIDASA EN UN EXPERIMENTO SENOMÓRFICO EN CÉLULAS HUMANAS TRAS SU TRATAMIENTO CON QBA.	120
FIGURA 9. 3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE SASP EN CÉLULAS SENESCENTES TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA POR PCR CUANTITATIVA.	120
FIGURA 9. 4. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA TINCIÓN CON β -GALACTOSIDASA EN UN EXPERIMENTO SENOMÓRFICO EN CÉLULAS DE RATÓN TRAS SU TRATAMIENTO CON QBA.	121
FIGURA 9. 5. IMÁGENES REPRESENTATIVAS DE LA TINCIÓN CON β -GALACTOSIDASA EN UN EXPERIMENTO DE SENOPREVENCIÓN TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	122
FIGURA 10. 1. EFECTO DE QBA SOBRE LA LONGEVIDAD EN RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	123
FIGURA 10. 2. EFECTO DE QBA SOBRE EL PESO DE RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	124

FIGURA 10. 3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA EN CORAZÓN DE RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRATADOS CON QBA.	125
FIGURA 10. 4. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA EN HÍGADO DE RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRATADOS CON QBA.	127
FIGURA 10. 5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS DE AUTOFAGIA EN MÚSCULO DE RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRATADOS CON QBA.....	128
FIGURA 10. 6. DETERMINACIÓN DE LA FUERZA DE AGARRE DE LOS RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	129
FIGURA 10. 7. MEDIDA DE LA GLUCOSA EN SANGRE EN RATONES <i>LMNA</i> ^{G609G/G609G} TRAS EL TRATAMIENTO CON QBA.	130

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPUESTOS INDUCTORES O INHIBIDORES DE DIFERENTES PROCESOS.	53
TABLA 2. SECUENCIA DE LOS PRIMERS UTILIZADOS PARA EL GENOTIPADO DE LOS RATONES <i>LMNA</i>	57
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS Y DILUCIONES DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS ESPECÍFICOS PARA CADA PROTEÍNA ESTUDIADA.	66

INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento

El envejecimiento es un proceso fisiológico que conlleva un descenso progresivo e irreversible de las funciones fisiológicas, lo que lleva aparejado a su vez un mayor riesgo de padecer diferentes patologías asociadas a la edad, como puede ser la osteoporosis, diabetes tipo 2, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, cáncer, fallo renal o hepático, disfunción en el sistema inmune así como enfermedades neurodegenerativas (EN) (1,2). Se trata de un gran problema a nivel mundial. Se estima que para el año 2050, el número de personas mayores de 60 años alcance los 2 billones, en todo el mundo (1).

La identificación y categorización de los rasgos distintivos, tanto celulares como moleculares, del envejecimiento ha ido evolucionando a lo largo de los años.

El envejecimiento es un proceso complejo que debe entenderse como un todo, ya que todos los rasgos distintivos que lo caracterizan son interdependientes y están interrelacionados entre si (3). Además, estos rasgos son comunes a muchas de las enfermedades asociadas a la edad, por lo que es muy interesante comprenderlos para poder encontrar terapias que nos permitan ralentizarlos y/o detenerlos.

De los doce rasgos distintivos que se consideran a día de hoy, en este trabajo se abordan solo algunos de ellos.

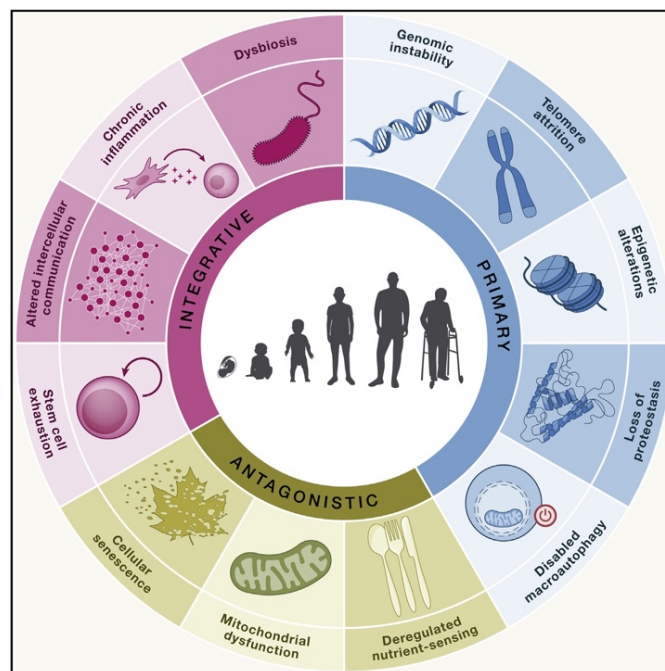


Ilustración 1. Los signos del envejecimiento. (3)

1.1.Alteraciones epigenéticas

Una gran variedad de cambios epigenéticos contribuye al envejecimiento, entre los que se encuentran alteraciones en la metilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de las histonas, remodelación de la cromatina, cambios en el ARN o la regulación del ARN no codificante (4).

Estas modificaciones epigenéticas se pueden revertir con ayuda de reguladores epigenéticos, convirtiéndolos en objetivos prometedores para las estrategias de intervención contra el envejecimiento (5).

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas, metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones o ubiquitinaciones entre otras, pueden activar o silenciar la expresión de genes y regular el proceso de envejecimiento (5). Las acetilaciones son las más comunes y son las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetilasas (HDACs) las encargadas de regularlas, de forma antagónica, y así mantener el equilibrio (6).

Las histonas deacetilasas son muy importantes ya que su actividad conlleva una relajación sustancial de la cromatina y una mayor vulnerabilidad a daño en el ADN (4). Hay 18 HDACs diferentes clasificadas en cuatro clases. Las más interesantes son HDAC6, una histona perteneciente a la Clase IIb y las histonas pertenecientes a la Clase III, también conocidas como sirtuinas (7).

HDAC6 tiene un papel fundamental en la interacción con proteínas poliubiquitinadas para su degradación por el proteosoma y así evitar la acumulación de proteínas mal plegadas y también regulando la autofagia mediante la deacetilación de proteínas relacionadas con la autofagia (7).

Por otro lado, las sirtuinas regulan la deacetilación de los residuos de lisina de forma dependiente de los niveles de NAD⁺ (8). Entre los miembros de la familia de las sirtuinas, SIRT1 (regulador silencioso de información 1) puede estar localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma. En el núcleo, SIRT1 funciona como una proteína histona deacetilasa, con un papel en muchas vías de señalización celular, como la de respuesta al daño en el ADN o factores de respuesta a estrés, interactuando con sustratos proteicos como los factores de transcripción FOXO (del inglés “*forkhead box O*”) y PGC1 α (del inglés “*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*”), el factor nuclear NF- κ B (del inglés “*nuclear factor kappa B*”) o el supresor tumoral p53 (9).

Todos los cambios que ejerce SIRT1 sobre las proteínas van a ayuda a la célula a

sobrevivir bajo condiciones de estrés; además de promover la longevidad (5,10).

En cuanto a las otras sirtuinas, SIRT2 tiene funciones protectoras frente a neurodegeneración y puede funcionar como deacetilasa de microtúbulos. SIRT3, SIRT4 y SIRT5 se encargan de regular vías metabólicas (11). La sobreexpresión de SIRT3 puede mediar los efectos beneficiosos de la restricción dietética en la longevidad (3) y SIRT3 y SIRT4 pueden coordinarse para mantener los niveles de NAD mitocondriales, protegiendo a las células de la muerte celular (11). De manera similar, la pérdida de SIRT6 acelera el envejecimiento mientras que su sobreexpresión prolonga la vida, inhibiendo la senescencia (3,5).

1.2.Alteración de la macroautofagia

El término macroautofagia (al que a partir de ahora denominaremos autofagia) engloba un conjunto de procesos celulares muy conservados que ocurren de forma constante, a nivel basal, en todas las células, y previene la acumulación de proteínas dañadas y orgánulos. Desempeña, por tanto, un papel fundamental en el control de calidad de los componentes citoplasmáticos y en el mantenimiento de la homeostasis celular (12,13) pero además, también desempeña una función crítica en diversos procesos como la diferenciación y el desarrollo, el envejecimiento y el sistema inmune (12).

Este proceso de autofagia también funciona como un mecanismo de supervivencia, pudiendo ser activado por señales intra y extracelulares, incluyendo estrés oxidativo, estrés del retículo endoplásmico, privación de nutrientes, glucosa, suero o aminoácidos, hipoxia o la ausencia de factores de crecimiento (12,14). Por eso, el desequilibrio autofágico se ha relacionado con numerosas patologías incluyendo enfermedades infecciosas, enfermedades cardíacas, diabetes, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (13).

Durante mucho tiempo se ha considerado que la autofagia es un proceso no específico de degradación. Sin embargo, ahora sabemos que puede dirigirse y reconocer de forma distintiva diferentes cargos específicos a degradar como ciertas proteínas, agregados, ribosomas, mitocondrias etc. (12).

Se han descrito tres tipos de vías autofágicas que difieren en sus rutas hacia los lisosomas: macroautofagia (o autofagia propiamente dicha), siendo la más predominante, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (AMC) (14).

La macroautofagia comienza con la biogénesis de un fagóforo, un fragmento aislado de

membrana, que puede provenir del retículo endoplásmico (RE), la membrana externa mitocondrial o el aparato de Golgi entre otros orgánulos. La biogénesis del fagóforo se inicia con la activación del complejo ULK1 (del inglés *unc-51 like kinase 1*), por la inactivación del complejo MTORC1 (del inglés *mammalian target of rapamycin kinase complex 1*) y AMPK (del inglés *AMP-activated protein kinase*). ULK1 va a activar al complejo fosfatidil-inositol 3 quinasa de la clase III (PI3KCIII/VPS34) y a reclutar proteínas adaptadoras entre las que se encuentra BECN-1 (beclina 1). Después de la iniciación, el fagóforo comienza su elongación. En la elongación están implicadas proteínas receptoras SNAREs (del inglés “*soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor attachment protein receptors*”) a las que se van a unir complejos de proteínas ATG (del inglés “*autophagy related genes*”) y la proteína LC3 (del inglés *microtubule-associated protein 1 light-chain 3*). LC3 es procesado en su extremo C terminal, convirtiéndose en LC3-I. Posteriormente, este LC3-I es conjugado con fosfatidiletanolamina (PE) para convertirse en LC3-II, el cual está asociado tanto a la membrana interna como externa del fagóforo. LC3 va a reclutar y se va a unir a proteínas adaptadoras como SQSTM1/p62 (del inglés “*sequestosome 1*”) y NBR1 (del inglés “*NBR1 autophagy cargo receptor*”), que van a permitir atrapar diferentes estructuras celulares, agregados proteicos o microorganismos conforme se va cerrando el fagóforo. El cierre del fagóforo da lugar al autofagosoma, el cual va a contener los productos a degradar. La maduración del autofagosoma implica la liberación de todas las proteínas ATG de la membrana externa y el reclutamiento de la maquinaria necesaria para la fusión con los lisosomas. Dicha fusión va a dar lugar a los autofagolisosomas permitir y va a permitir la degradación y reciclaje de su membrana interna, así como de las moléculas y proteínas contenidas en su interior (12,15–18).

Por otro lado, la microautofagia consiste en el secuestro en el propio lisosoma de una parte del citoplasma para su degradación. Tanto la macro como la microautofagia degradan de forma no selectiva proteínas lípidos y orgánulos. Por el contrario, AMC sólo degrada proteínas, convirtiéndola en una autofagia selectiva, que deben llevar una secuencia específica que actúa como señal y que es reconocida por unas chaperonas moleculares (14).

El bloqueo, deterioro o deficiencia de la autofagia puede ocurrir por una depleción de los principales genes implicados en el proceso como pueden ser ATG5, ATG7 o BECN1 (15,19), un bloqueo en alguna de las partes del proceso utilizando compuestos químicos o una desregulación por algún otro motivo y pueden provocar, por ejemplo, la

acumulación de agregados proteicos y orgánulos disfuncionales o un aumento de la inflamación por una reducción de la eliminación de patógenos y esto dar lugar a diferentes enfermedades (3).

Pero de la misma manera que la autofagia puede ser inhibida, también puede ser estimulada, ya sea sobre-expresando alguno de los genes implicados en el proceso o mediante compuestos o sustancias que simulen las condiciones naturales mediante las cuales la autofagia se activa en las células. Se ha visto que esta estimulación puede aumentar la salud y esperanza de vida de diferentes organismos modelo.

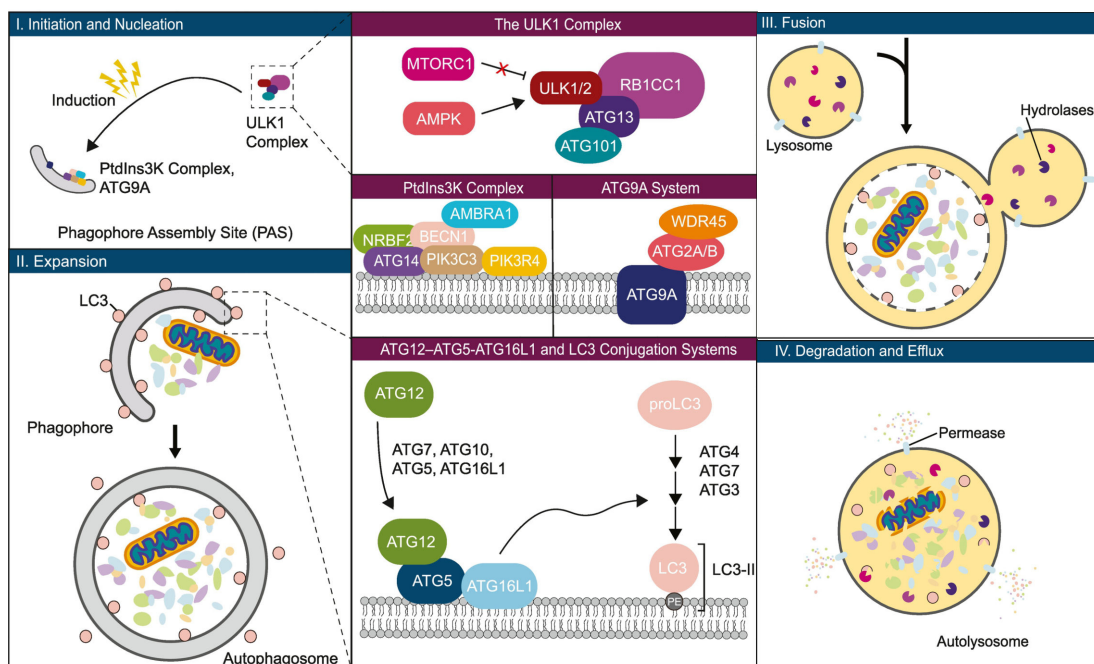


Ilustración 2. Esquema del proceso de autofagia. Modificada de (12).

1.3. Pérdida de proteostasis

El envejecimiento y otras enfermedades relacionadas con la edad están asociadas a una pérdida de la homeostasis proteica o proteostasis (3). La proteostasis implica mecanismos para la estabilización de proteínas correctamente plegadas, sobretodo la familia de proteínas de choque térmico (HSP), y mecanismos para la degradación de proteínas mal plegadas, defectuosas o marcadas mediante ubiquitinación para su eliminación, ya sea por el sistema ubiquitin-proteasoma (SUP) o mediante lisosomas (macroautofagia) (20). Esto va a permitir que no se produzca la acumulación de estas, evitando así la formación de agregados proteicos (3). Los agregados proteicos suelen ser insolubles y metabólicamente estables (21). La degradación selectiva de agregados proteicos mediante autofagia se denomina agregofagia (22).

Como la actividad de estos dos sistemas proteolíticos implicados en el control de calidad de las proteínas se deteriora con la edad, el aumento de la actividad del proteasoma mediante la inhibición de deubiquitilasa o mediante activadores del proteasoma como tal, van a favorecer la eliminación de proteínas tóxicas de las células (20). Ambos mecanismos están muy interrelacionados ya que la ubiquitinación de las proteínas a degradar no solo va a marcarlas para su reconocimiento y eliminación por el sistema UPS sino que va a permitir que, aquellas que no puedan ser degradadas por este mecanismo sean eliminadas por autofagia (22). Cuando el proteasoma está inhibido, HDAC6 es capaz de interactuar con los agregados proteicos, los cuales se encuentran poliubiquitinados y con proteínas motoras como dineínas. Gracias a su capacidad de acetilasa y con la ayuda de SIRT2, HDAC6 va a deacetilar a α -tubulina, la cual está acetilada en la lisina 40. α -tubulina es uno de los componentes de los microtúbulos a través de los cuales se va a producir el transporte retrógrado de los agregados hacia el MTOC (del inglés "*microtubule-organizing center*") para su eliminación de forma independiente del proteasoma. HDAC6 también está implicado en la degradación de proteínas de forma dependiente del proteasoma (7).

1.4.Desregulación de la detección de nutrientes

La red de detección de nutrientes es esencial en la regulación del envejecimiento. Esta red está muy conservada e incluye ligandos extracelulares, varios receptores y diferentes cascadas intracelulares. Esta red es un regulador central de la actividad celular, incluyendo autofagia, biogénesis mitocondrial y ribosomal, síntesis de proteínas, metabolismo de lípidos o actividad del proteasoma, entre otras (3,23).

Su actividad va a depender del nivel de estrés y la cantidad de nutrientes de los que se dispongan. Se producirá una activación del anabolismo si hay nutrientes presentes y los niveles de estrés son bajos, activándose la vía de señalización de insulina así como IGF-1 (del inglés "*insulin-like growth factor 1*"), (conocida como vía IIS) y el complejo mTOR (del inglés "*mammalian target of rapamycin*"), que responden a la presencia de glucosa o aminoácidos. En el caso de que los niveles de estrés estén elevados y los niveles de nutrientes bajos, es decir, que esté activado el catabolismo, AMPK y las sirtuinas van a detectar AMP y NAD^+ , respectivamente, induciéndose una respuesta celular. Finalmente, las estrinas, unas proteínas inducibles mediante estrés que modulan vías de detección de nutrientes como las de AMPK o mTOR, están emergiendo como reguladores metabólicos a través de la vía del complejo 2 de mTOR

con Akt1 (3,24,25).

Una disminución en las vías IIS y mTOR y un aumento en las vías de AMPK y SIRT1 se ha asociado con una mayor longevidad (25).

1.5. Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana presentes en la mayoría de células eucariotas, con diferentes formas, tamaños y número (26). Constantemente se están dividiendo, fusionando y modificando su tamaño y forma, por lo que forman una red dinámica para mantener su integridad y cantidad (27). Las mitocondrias tienen multitud de funciones incluida la producción de energía mediante el metabolismo oxidativo, la inducción de apoptosis, la producción de ROS (del inglés “*reactive oxygen species*”), señalización, regulación y almacenamiento del calcio (28); siendo indispensables para el metabolismo celular y las actividades fisiológicas (29).

Es importante que se mantenga un equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial y un potencial de membrana mitocondrial positivo ($\Delta\psi_m$), entre 120 y 200 mV, para el correcto funcionamiento y la supervivencia celular, sobre todo en aquellas células que necesitan grandes cantidades de energía (27).

La pérdida de la integridad mitocondrial suele ir acompañada de una despolarización de la membrana. Cuando la membrana está despolarizada, se produce una acumulación en la misma de la proteína PINK1 (del inglés “PTEN-induced kinase 1”) ya que esta es incapaz de transportarse a través de los complejos de translocasas de las membranas externa e interna, TOMM20 (del inglés “*translocase of outer mitochondrial membrane 20*”) y TIMM23 (del inglés “*translocase of inner mitochondrial membrane 23*”) respectivamente. La acumulación de PINK1 en la membrana mitocondrial externa provoca su autofosforilación y al reclutamiento y ubiquitinación de otras proteínas como Parkina y varios sustratos suyos, VDAC1 (del inglés “*voltage dependent anion channel 1*”) o Mitofusina 1 (MFN1) entre otros. Todas estas proteínas ubiquitinadas van a ser reconocidas por diferentes receptores de autofagia como p62 u optineurina (OPTN), que a su vez se unen a LC3 de la membrana de los autofagolisosomas permitiendo, por tanto, su degradación (30–32). Este tipo específico de eliminación de mitocondrias por autofagia se denomina mitofagia (28).

Este proceso de mitofagia permite eliminar mitocondrias disfuncionales, dañadas o envejecidas así como un exceso de las mismas, para mantener su número y el metabolismo energético, reconociendo diferentes componentes mitocondriales (26,29).

Con la edad, se producen una serie de defectos interconectados que pueden afectar a la actividad de las mitocondrias; la función mitocondrial se deteriora debido a la acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt), se produce una deficiencia energética, un aumento de la producción de ROS o una disminución en la mitofagia que provoca la acumulación de mitocondrias disfuncionales (3). Los cambios en las dinámicas mitocondriales pueden afectar a la permeabilidad de las membranas, provocando inflamación y muerte celular. Esto junto a la disminución de los niveles de autofagia y mitofagia con la edad puede resultar en la acumulación de mitocondrias disfuncionales, un estrés oxidativo acusado y un aumento de la apoptosis celular (27). Es por eso que la desregulación de la mitofagia, está muy relacionada con muchos procesos fisiológicos y patológicos como el envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas y el cáncer (26) y por ese motivo las células poseen múltiples mecanismos de control de calidad para el correcto mantenimiento de las mismas.

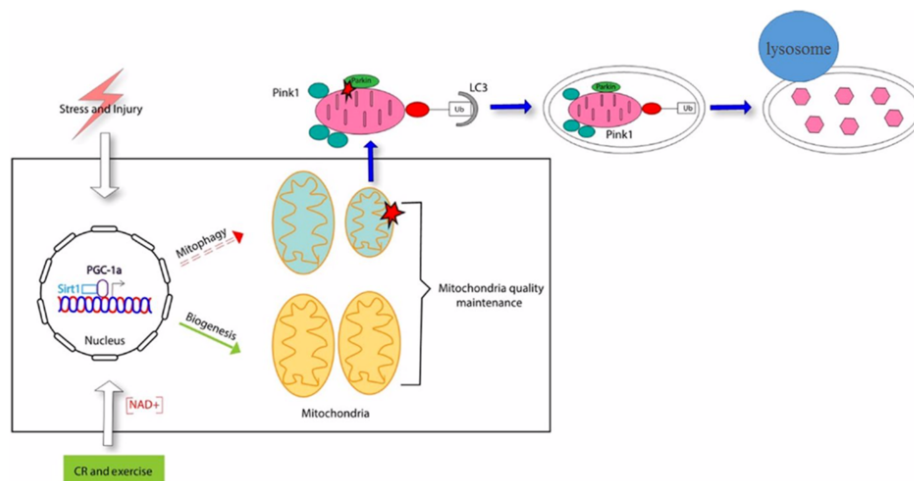


Ilustración 3. Proteínas implicadas en el mantenimiento de la biogénesis mitocondrial (27).

1.6.Senescencia celular

La senescencia celular consiste en un arresto o detención estable del ciclo celular que limita la proliferación celular. Suele ocurrir como respuesta a un estrés intra o extracelular excesivo (33,34), entre los que podemos encontrar el acortamiento de los telómeros (resultado de un gran número de divisiones celulares), señales oncogénicas, daño mitocondrial, estrés oxidativo, daño en el ADN o un desequilibrio de nutrientes (3). El arresto celular que sufren las células se considera irreversible ya que no se conocen estímulos fisiológicos que permitan a las células senescentes volver a entrar en el ciclo celular. Es más, estas células van a sufrir una serie de cambios como una alteración en su tamaño y forma, en comparación con las células proliferativas, además de la

secreción de numerosas citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas que, en conjunto, reciben el nombre de “SASP (del inglés “senescence-associated secretory phenotype”) (33,35). El SASP es muy importante, especialmente justo después de la inducción de senescencia para asegurar un arresto eficiente del crecimiento, impidiendo la propagación del daño a la siguiente generación celular, excluyendo una posible transformación maligna (34) y, eventualmente, para la estimulación del sistema inmune para favorecer la eliminación de las células senescentes (36). Aun así, se ha visto que las células senescentes pueden acumularse a lo largo de la vida y, con la edad, tener un impacto en la fisiología normal de los tejidos, provocándoles un deterioro funcional progresivo (33). La mayor evidencia del papel de las células senescentes sobre el envejecimiento es que, su eliminación continuada, ya sea genética o farmacológica, prolonga la esperanza de vida y la longevidad en ratones, además de ser terapéutico en muchas enfermedades (3).

2.Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford como modelo de envejecimiento

El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS o progeria) es un trastorno genético esporádico y extremadamente raro que ocurre en niños, afectando a 1 de cada 18 millones. Este tipo de trastornos reciben el nombre de laminopatías. Se caracteriza por un envejecimiento prematuro, pérdida de grasa subcutánea, alopecia, rigidez articular, aterosclerosis y una aceleración en las enfermedades cardiovasculares, incluida una calcificación vascular excesiva. La mayoría de los pacientes de HGPS son portadores de una mutación heterocigota autosómica dominante no hereditaria de un único nucleótido en el exón 11 del gen *Lamina A/C (LMNA)* (GGC → GGT; p.G608G en humanos; p.G609G en ratones) que codifica para las proteínas lamina A y lamina C. Lamina A y lamina C son los componentes principales de la lamina nuclear. Esta mutación en el gen *LMNA* da lugar a un corte aberrante que provoca la producción de progerina, una forma truncada de lamina A que está permanentemente farnesilada y metilada. La progerina se acumula en la membrana nuclear, alterando su estructura y función, desorganiza la cromatina e induce daño en el ADN. Todo esto culmina en una senescencia prematura y muerte celular (37–44).

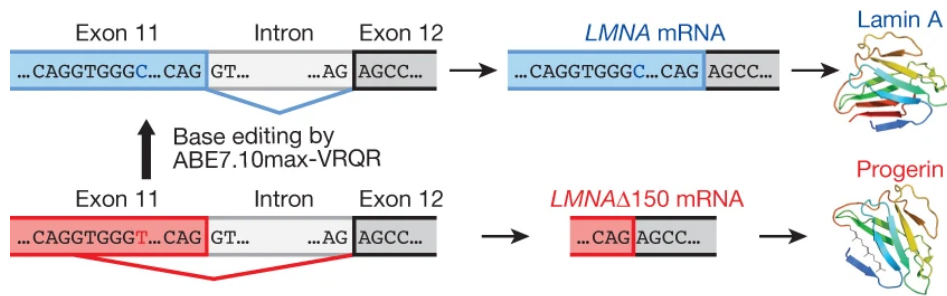


Ilustración 4. Representación de la mutación que ocurre en el Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (40).

Desde el descubrimiento de los mecanismos patogénicos que producen la enfermedad, se han propuesto distintas estrategias terapéuticas para abordar la enfermedad a diferentes niveles: a nivel proteico (reduciendo los niveles de progerina), a nivel del ARN (evitando errores en el procesamiento del ARN), y a nivel del ADN (intentando corregir la mutación) (45).

En la mayoría de las enfermedades asociadas con la edad se produce una disminución de diferentes funciones, entre las que se encuentra la autofagia, lo que provoca a su vez la acumulación de productos de deshecho (46,47). Se ha descrito que los ratones con progeria presentan una activación de la autofagia basal, que está relacionada con una inhibición de mTOR (48). Además, la inducción de autofagia mediante la inactivación de mTOR mediada por rapamicina disminuye la cantidad de progerina (49), y contrarresta los defectos cardíacos y musculares que estos ratones presentan, llegando incluso a mejorar su supervivencia (50). Por otro lado, se ha mostrado que resveratrol aumenta la actividad deacetilasa de SIRT1 y mejora su interacción, no solo con lamina A sino con progerina, contribuyendo a su degradación (51).

Por tanto, modular el proceso de autofagia puede ser una potencial estrategia terapéutica frente a esta enfermedad.

3. Enfermedades asociadas al envejecimiento

Las enfermedades neurodegenerativas son un importante problema de salud para la población mundial que envejece (52). El envejecimiento está asociado con un deterioro físico que conlleva un mayor riesgo de enfermedad y muerte. Entre los factores de riesgo que pueden provocar neurodegeneración, como las alteraciones metabólicas (53) o el envejecimiento es este último, con diferencia, el que mayor efecto tiene. La genética humana y los factores ambientales determinan el progreso de las

enfermedades neurodegenerativas. Se puede pensar, por tanto, que las enfermedades neurodegenerativas son una manifestación del envejecimiento, sin embargo, es al contrario, el envejecimiento es un importante factor de riesgo en la neurodegeneración (54).

Las enfermedades neurodegenerativas afectan a diferentes poblaciones de neuronas en el sistema nervioso central (55). Entre las enfermedades neurodegenerativas se encuentran la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH) (53,55,56). En todas ellas se produce una acumulación crónica y progresiva de proteínas nocivas y propensas a la agregación, tanto en el cerebro y la médula espinal. En condiciones normales, estos agregados proteicos son ubiquitinados para su inmediata degradación pero una alteración en los sistemas de eliminación, ya sea por alteraciones genéticas, envejecimiento o estilo de vida, provoca su acumulación haciendo que las neuronas sean incapaces de funcionar correctamente y comiencen a degenerarse (55–57).

EA y EP son las enfermedades neurodegenerativas más comunes, mientras que ELA y EH son menos frecuentes pero todas ellas comparten varias similitudes en sus mecanismos (53).

3.1. Enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es un trastorno genético, autosómico-dominante que provoca movimientos involuntarios, cambios en el comportamiento, disfunción cognitiva y demencia. La enfermedad se produce debido a una expansión patogénica de repeticiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG), en el exón 1 del gen de la Huntingtina (HTT). Cuando las repeticiones CAG superan las 35, el gen codifica la proteína HTT mutada (mHTT) que tiene una cola de poliglutaminas en el extremo N-terminal que es muy propensa a agregarse. Estos agregados son tóxicos para las neuronas lo que desemboca en una degeneración temprana que afecta a la función de distintas partes del sistema nervioso, especialmente al estriado y la corteza (27,53,55–58).

La proteína HTT es una proteína de 348 kDa que tiene la capacidad de interactuar con diferentes proteínas estabilizando distintos complejos proteicos implicados en la regulación transcripcional (59), el tráfico axonal de vesículas, autofagosomas y mitocondrias (60–62) la exportación/importación nuclear y la proteólisis mediada por ubiquitina (UB) (63,64). Estudios recientes han demostrado la implicación de HTT como

proteína de andamiaje durante el proceso de autofagia selectiva inducida por estrés. Esta relación ocurre por la interacción de HTT con ULK1, proteína necesaria para el inicio del proceso de macroautofagia (65,66), y con SQSTM1/p62, uno de los receptores selectivos de macroautofagia. p62 se va a unir simultáneamente a los autofagosomas, interaccionando con LC3-II y a los sustratos, mediante su interacción directa con las cadenas de poliubiquitina (polyUB) que marcan los sustratos para su degradación (65,66). Es más, una disfunción de los sistemas proteolíticos celulares, tanto las vías autofágicas como el sistema ubiquitin-proteasoma han sido relacionados con la EH (64,67). La proteína mHTT, a diferencia de lo que ocurre con HTT, impide que LC3 pueda ser reclutada, afectando por tanto, a la formación y transporte de los autofagosomas, esenciales para que pueda ocurrir el inicio de la autofagia. mHTT tampoco va a poder reconocer a p62, lo que va a impedir el reconocimiento del cargo, provocando la acumulación de autofagosomas “vacíos”, bloqueando el proceso de autofagia. Asimismo, mHTT tampoco va a permitir la formación del complejo BECN1, también esencial para la formación de los autofagosomas (64,67). Finalmente, se produce una competición entre HTT y mTOR por ULK1 y, cuando ULK1 es liberado, es cuando se inicia la autofagia. Sin embargo, mHTT no tiene esa capacidad de unirse a ULK1, lo que supone que no se libere de mTOR y, por tanto, no se pueda iniciar la autofagia (64,68).

Al mismo tiempo que se produce la disfunción proteolítica, y de la misma manera que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, también se ha descrito que se produce una disfunción mitocondrial en las neuronas que se encuentran afectadas en la EH (69,70). La causa de esta disfunción mitocondrial puede ser, en parte, provocada por un deterioro en el proceso de mitofagia. Como ya he indicado anteriormente, mHTT impide la correcta interacción de HTT con p62, así como con otros receptores como OPTN, CALCOCO2 y NRB1, lo que impide el reclutamiento de LC3 a las mitocondrias dañadas, bloqueando la mitofagia (68). El efecto de mHTT en la mitocondria va a alterar numerosos procesos, siendo crítico para la homeostasis mitocondrial (69,71), y va a provocar daños en el ADN mitocondrial (72), una desregulación transcripcional de proteínas mitocondriales (73), la desregulación del transporte y dinámica mitocondrial (74), un defecto en el metabolismo bioenergético (75,76), la producción excesiva de ROS (77) y la alteración de la biogénesis mitocondrial (70,78).

Actualmente, se están realizando esfuerzos para reducir el colapso de la actividad proteolítica y la disfunción mitocondrial ocasionada por la mHTT potenciando la

autofagia y la mitofagia como estrategias terapéuticas para la EH.

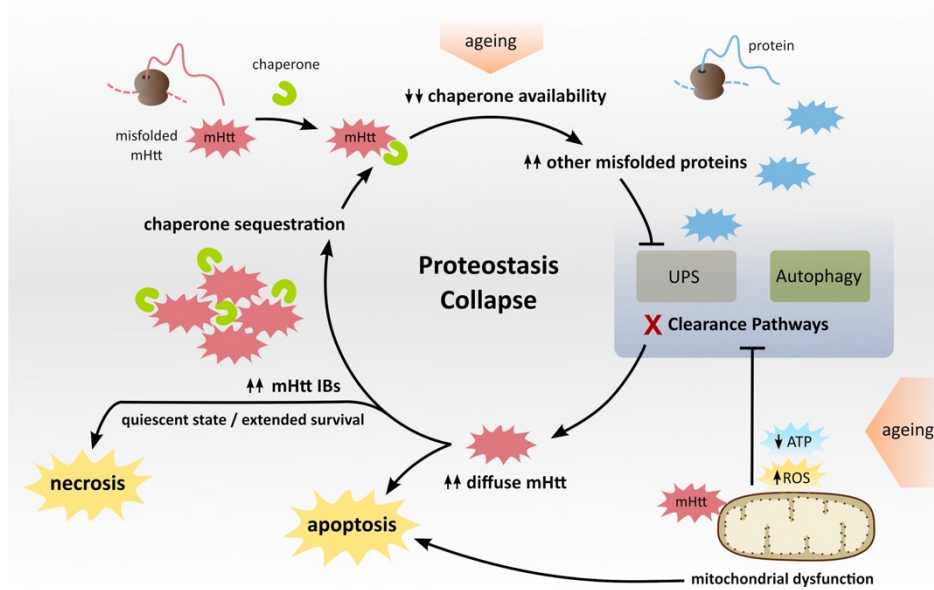


Ilustración 5. Colapso de la proteostasis en EH (79).

4. Herramientas terapéuticas: productos naturales

Uno de los principales retos en el estudio del envejecimiento es el descubrimiento de sustancias o compuestos cuya actividad promueva la longevidad y/o retarde el envejecimiento y la aparición de las enfermedades relacionadas con la edad además de dilucidar sus mecanismos de acción (80). Los productos naturales, así como sus compuestos bioactivos, se han estudiado ampliamente en los últimos años por su potencial terapéutico en diversas EN, entre ellas EA, EH y EP. Dado que la neurodegeneración está asociada a un sinnúmero de procesos patológicos, es necesario abordar mecanismos de acción múltiples y enfoques de neuroprotección que incluyan la prevención de la muerte celular y el restablecimiento de la función de las neuronas dañadas. En el tratamiento de las EN, incluidas la EA y la EH, la activación de la autofagia mediante intervenciones nutricionales, farmacológicas o genéticas se ha demostrado que puede ralentizar o retrasar estas patologías y/o aumentar la longevidad, ha hecho que, en los últimos años, el interés en la búsqueda de inductores de autofagia se haya visto aumentada, sobre todo aquellos de origen natural (81,82).

4.1. QBA

Los compuestos naturales provenientes de las abejas, como la miel, el propóleo o la jalea real (JR) se han considerado beneficiosos debido a sus muchas propiedades

biológicas y farmacológicas, capaces de mejorar la salud humana y alargar la longevidad de diferentes tipos celulares y tejidos de modelos animales (83). La jalea real en concreto tiene un gran interés. Todas las larvas de abeja son alimentadas con jalea real durante los tres primeros días de vida. Después, la mayoría de las abejas hembra se convierten en obreras mientras que una abeja hembra es seleccionada y alimentada durante el resto de su vida con JR y se convierte en la abeja reina. Mientras las abejas obreras solo viven entre 3 y 6 semanas, las abejas reinas pueden vivir y reproducirse entre 1 y 4 años (84,85). También se ha visto que la jalea real puede alargar la vida de nematodos, moscas y ratones, lo que parece corroborar una implicación en la longevidad (80).

La composición de la jalea real es una mezcla compleja formada por un 60-70% de agua, un 9-18% de proteínas, un 7-18% de azúcares y un 3-8% de lípidos. El porcentaje restante lo componen aminoácidos libres, sales, vitaminas y minerales (84).

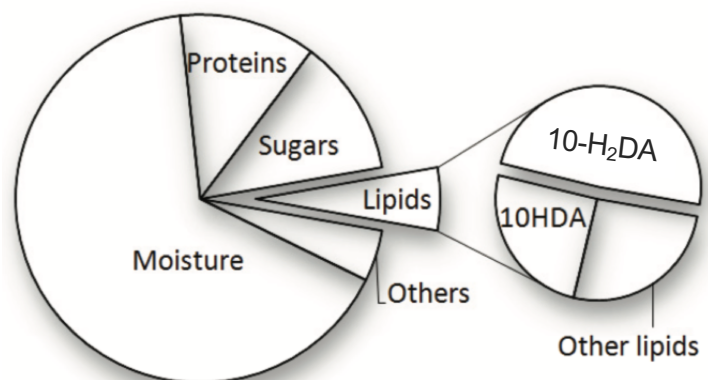


Ilustración 6. Composición de la jalea real (84).

El ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-H₂DA), también conocido como QBA (*Queen Bee Acid* o ácido de la abeja reina), es el ácido graso mayoritario y exclusivo de la jalea real, constituyendo el 40% aproximadamente del total de la fracción lipídica. El segundo ácido graso mayoritario sería el ácido 10-hidroxidecanoico (10-HDA), el cual no es exclusivo de la jalea real (82,86).

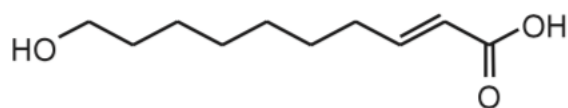


Ilustración 7. Estructura química de QBA (10-H₂DA) (87).

Varios estudios han demostrado que QBA presenta efectos beneficiosos para la salud. Se ha visto que QBA confiere tolerancia frente a varios tipos de estrés como el térmico o el oxidativo (80). Puede inducir la generación de ROS en células cancerígenas, induciendo apoptosis en dichas células, e inhibir la producción de ROS en células sanas, e inhibir la producción de citoquinas pro-inflamatorias, mecanismo que también está muy activo en diferentes tipos de cánceres, convirtiéndolo en un posible agente antitumoral (88,89). Es más, también se ha visto que tiene capacidad de regenerar la piel, al inducir la producción de colágeno y convertirse en un prometedor tratamiento frente a la hiperpigmentación, inhibiendo la melanogénesis (90). De la misma manera que se ha visto que puede inhibir las citoquinas pro-inflamatorias, también es capaz de reducir la neuroinflamación, que puede dar lugar a enfermedades neurodegenerativas (86,91). Además, estimula el crecimiento neuronal, y protege a las neuronas de daños y disminuye los comportamientos asociados con ansiedad (92). Tratándose de un compuesto de origen natural proveniente de un alimento, no es raro pensar que pueda tener un papel en el metabolismo energético (93) y pese a que se ha visto que tiene efectos beneficiosos frente a la hiperglucemia y la resistencia a la insulina, no previene la obesidad (94). QBA tiene efectos sobre varias enfermedades que afectan a los huesos, como la osteoporosis (95) y una gran actividad antibacteriana frente patógenos tanto específicos de animales como de humanos (89).

Todos estos efectos beneficiosos que QBA es capaz de llevar a cabo, tanto *in vitro* como *in vivo* (86), así como muchos otros más que no hemos nombrado, convierten a este compuesto en una sustancia clave y digna de estudio.

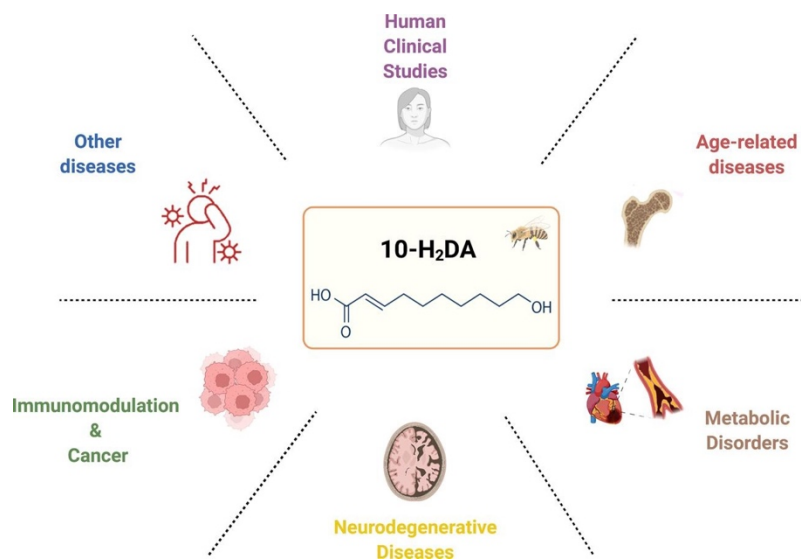


Ilustración 8. Principales enfermedades sobre las que se ha visto que QBA ejerce sus funciones (96).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Evaluar la modulación de autofagia mediada QBA tanto *in vitro* (SH-SY5Y) como *in vivo* (ICR).
2. Determinar el papel de sirtuinas en la autofagia inducida por QBA.
3. Estudiar el impacto de QBA sobre el metabolismo mitocondrial, así como su efecto sobre la toxicidad inducida por 6-OHDA.
4. Analizar el efecto de QBA en la eliminación de agregados proteicos inducidos *in vitro* (SH-SY5Y y N2a) así como *in vivo* (ratones R6/1, modelo de EH).
5. Evaluar el efecto de QBA sobre la senescencia en modelos celulares y analizar su impacto en el fenotipo del ratón *Lmna*^{G609G/G609G}, modelo de envejecimiento.

OBJECTIVES

OBJECTIVES

The objectives that we aims to achieve in this doctoral thesis were the following:

1. To assess QBA-mediated autophagy modulation both *in vitro* (SH-SY5Y) and *in vivo* (ICR).
2. To determine the role of sirtuins in QBA-induced autophagy.
3. To study the impact of QBA on mitochondrial metabolism, as well as its effect on 6-OHDA-induced toxicity.
4. To analyze the effect of QBA on the removal of induced protein aggregates *in vitro* (SH-SY5Y and N2a) as well as *in vivo* (R6/1 mice, HD model).
5. To evaluate the effect of QBA of senescence in cellular models and to analyze its impact on the phenotype of the *Lmna*^{G609G/G609G} mouse, aging model.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

A la hora de trabajar en un laboratorio es necesario mantener unas condiciones de esterilidad para evitar, en la medida de lo posible, cualquier tipo de contaminación. Para ello será obligatorio el uso de guantes y trabajar dentro de campanas de flujo laminar previamente desinfectadas con etanol al 70% e irradiadas con luz ultravioleta. Además, todo lo que vaya a entrar en la misma debe estar en perfecto estado de esterilidad y ser igualmente desinfectado con etanol al 70%. Siempre que sea posible deberemos utilizar materiales estériles.

1.1. Líneas celulares

Todos los modelos celulares utilizados son líneas inmortalizadas que crecen en monocapa en frascos de cultivo o placas utilizados para su mantenimiento o tratamiento.

Todos los experimentos mostrados en este trabajo se han realizado utilizando las siguientes líneas celulares:

- Células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).
- Células de neuroglioma humano y deficientes en ATG5 (SH-SY5Y atg5 KD) cedidas por la Dra. Ana Pérez Castillo.
- Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y que expresan de manera estable la construcción *mito-QC* (tándem de proteínas mCherry-GFP-FIS1) cedidas por la Dra. Patricia Boya.
- Células de neuroglioma humano que expresan de manera estable el plásmido LC3-GPF (H4-GPF-LC3).
- Células de melanoma humano (SK-Mel-103), utilizadas en el laboratorio del Dr. Federico Pietrocola.
- Células de osteosarcoma humano, que expresan de manera estable plásmidos fluc-GFP (U2OS-Lu-Fluc-EGFP-TFEB), utilizados en el laboratorio del Dr. Federico Pietrocola.
- Células de neuroblastoma de ratón (N2a).

1.2.Cultivos primarios

Los cultivos primarios utilizados para la realización de algunos de los experimentos fueron fibroblastos obtenidos de orejas de ratón.

Para ello los animales de 4-5 semanas de edad fueron primero anestesiados y seguidamente sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente las orejas fueron rociadas con etanol al 70% para evitar la contaminación. Se cortan las orejas y, con ayuda de una lanceta o las propias tijeras y el alcohol, se eliminan la mayor cantidad de pelos posibles. Las orejas se meten en tubos cónicos con un tampón fosfato salino o PBS 1X (del inglés "*Phosphate Buffer Saline 1X*") hasta su posterior procesado, ya en el laboratorio, a la mayor brevedad posible, aunque pueden conservarse hasta 24 horas tras la extracción.

Una vez en el laboratorio trabajamos en la campana de flujo laminar. Para cada preparación de cultivos se emplearon 1 o 2 orejas.

Las orejas se lavan bien con etanol al 70% y PBS con 1% de antimicótico y 1% de penicilina/estreptomicina (*Gibco 15240-062*). El siguiente paso es una disgregación enzimática y mecánica para la cual se prepara una solución que contiene medio de cultivo, DMEM (del inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*"), al que se le añade una mezcla de colagenasa/dispasa (*Roche 10269638001*) a una concentración de 70 mg/mL.

Las orejas son colocadas en una placa de Petri de 10 cm donde son cortadas con ayuda de dos lancetas hasta obtener unos trozos lo más pequeño posible y luego, sobre los trozos colocados en el centro de la placa, se añade 1 mL de la mezcla de digestión y se incuba durante 30 minutos en un incubador a 37°C.

Pasado el tiempo se añade 10 mL de medio completo con 1% de antimicótico y 1% de penicilina/estreptomicina, pipeteando muy bien unas 10 veces para disgregar completamente la solución celular. Se dejan en el incubador a 37°C y se repite la disgregación a las 24 y 48 horas. Luego esperamos entre 5 y 7 días hasta que empiecen a aparecer colonias de células, pudiendo cambiar parte del medio por medio fresco, manteniendo los trozos de orejas, si vemos que está muy sucio.

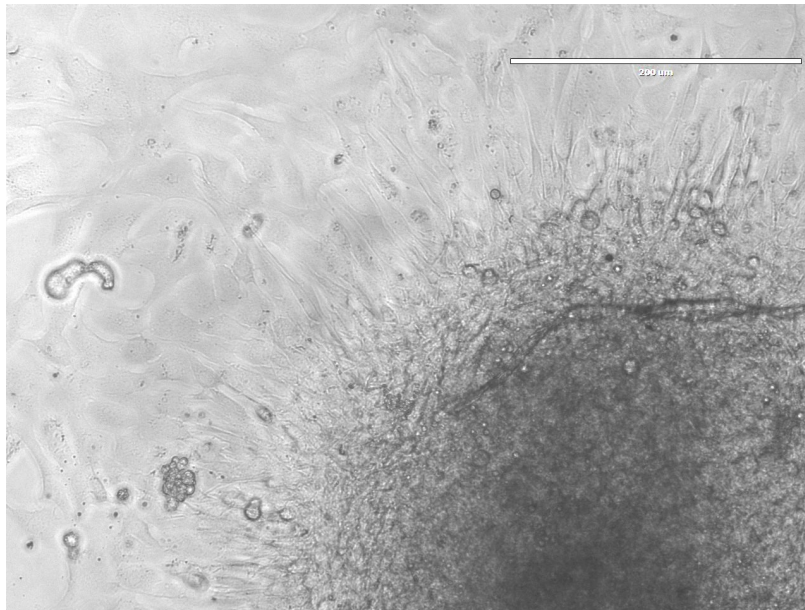


Ilustración 9. Cultivo primario de fibroblastos de oreja de ratón.

Al llegar al estado de confluencia, las células se pueden despegar utilizando tripsina para su congelación y/o siembra. Estas células no deben utilizarse más allá de 3-4 pases, ya que pierden sus propiedades.

1.3. Mantenimiento celular

Todas las células utilizadas crecen en monocapa sobre la superficie de frasco de cultivo o placas de cultivo de distintos tamaños según el momento en el que se encuentren o nuestras necesidades. Además, deben mantenerse en unas condiciones óptimas de temperatura, 37°C, humedad y atmósfera de CO₂, 5%, que permitan su correcto crecimiento y proliferación.

Las células se conservan en un medio de cultivo DMEM al que se adicionan diferentes compuestos según el tipo celular.

Las células SH-SY5Y, SH-SY5Y-mito-QC y SK-Mel-103 se mantienen en medio DMEM (Sigma D6546) suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (Sigma-Aldrich 7524) al 10%, 1% de L-glutamina (2mM) (*Sigma-Aldrich*

G7513), los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) (HyClone 456-1046) y *Plasmocin* (5 µg/mL).

Las células SH-SY5Y (nt y KD) se mantienen en medio DMEM (*Hyclone RPMI, Thermofisher W78331*) suplementado con FBS al 10%, gentamicina (50 mg/mL) (*Proquinorte 15750060*) y *Plasmocin* (5 µg/mL).

Las células H4-GFP-LC3 y U2OS-Lu-Fluc-EGFP-TFEB se mantienen en medio DMEM (Gibco 21969-035) suplementado con FBS al 10%, L-Glutamina, 1%, de tampón HEPES (1M) (Life technologies 15630080), penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL), geneticina (50 mg/mL) (Thermofisher G418) y *Plasmocin* (5 µg/mL).

Las células N2a se mantienen en medio de cultivo DMEM (Corning 15-013-CV) suplementado con FBS al 10%, 1 % de L-Glutamina, penicilina (100 U/mL) y estreptomicina (100 µg/mL) y *Plasmocin* (5 µg/mL).

Los cultivos primarios de fibroblastos de oreja de ratón se mantienen en medio de cultivo DMEM (Gibco 21969-035) suplementado con FBS al 10%, 1% de L-Glutamina y 1% de antimicótico con penicilina/estreptomicina (Gibco 15240-062).

1.4. Métodos de cultivo

Los cambios de medio y pases de las células se realizan cada 2-3 días o cuando estas han llegado a una confluencia del 80% aproximadamente. Esto es fácil de detectar mirando la variación del color del medio, que pasa de rojo a amarillento, debido a la acidificación del mismo, y, por tanto, a cambios en el pH, gracias a que contiene el indicador rojo fenol. También se realiza la observación de la confluencia celular con un microscopio óptico (*Carl Zeiss. Axiovert 25C*). Las células H4-GFP-LC3, al llevar un marcaje fluorescente, pueden ser observadas también utilizando el microscopio de fluorescencia EVOS FL.NO OBJ71.

1.4.1. Descongelación/congelación

Las células se encuentran conservadas en tubos de criogenización (*Fisherbrand 11321675*) en nitrógeno líquido o en congeladores a -80°C, en una mezcla de FBS y dimetilsulfóxido al 10% (DMSO, *Sigma D8779*). El DMSO es un crioprotector que impide la formación de cristales de hielo al congelar las células y previene, por tanto, la muerte de estas. Pero el DMSO es tóxico a temperatura ambiente por lo que tanto el proceso de descongelación como el de congelación de las células debe hacerse relativamente rápido. Para ello, una vez descongelado el criovial, se diluye su contenido con medio

de cultivo y se procede a su centrifugación. Luego se descarta el sobrenadante para eliminar todos los restos de DMSO y se resuspende el pellet con medio de cultivo. Posteriormente se añaden las células previamente resuspendidas junto con más medio a un frasco de cultivo de 25 cm². Conforme las células vayan proliferando y alcanzando una confluencia del 80% podemos ir aumentando el tamaño del frasco de cultivo a 75 cm² y 175 cm². Tras una semana aproximadamente en cultivo, las células ya estarían listas para comenzar a trabajar con ellas.

Para la congelación el proceso es inverso. Una vez centrifugadas las células, el sobrenadante es descartado y el pellet se resuspende con la mezcla de FBS y DMSO al 10%. Esta mezcla es transferida a tubos de congelación o criotubos (*Thermofisher* 11321675) a razón de 1mL/criotubo y sin mucha demora, son depositados en un recipiente de congelación (*Thermofisher* 5100-0001) y esta, a su vez, en el congelador a -80°C.

El recipiente de congelación lleva una esponja embebida en isopropanol que va a permitir una bajada progresiva de la temperatura de las muestras, del orden de 1°C/minuto, para evitar que el proceso de congelación sea demasiado brusco.

1.4.2. Pase y siembra celular

Para llevar a cabo el pase celular se realiza un lavado con PBS 1X para eliminar todos los restos de medio de cultivo sin alterar el pH o la osmolaridad y posteriormente se añade la solución comercial Tripsina-EDTA 1X (*Sigma-Aldrich* T4049), una serinproteasa que tiene la capacidad de cortar los enlaces peptídicos entre argininas y lisinas permitiendo romper la monocapa en la que se encuentran las células. Una vez despegadas las células, se inactiva la tripsina con medio de cultivo y se procede a su centrifugación, 1200 rpm, entre 5 y 15 minutos, según la línea celular, a 25°C. Finalmente se deshecha el sobrenadante, se resuspende el pellet celular resultante de la centrifugación con medio de cultivo fresco y las células ya estarían listas para su pase a otro frasco de cultivo o placa de siembra.

Las células suelen sembrarse a una densidad entre 80.000 y 120.000 células/mL y se mantendrán en el incubador hasta que se puedan usar el día siguiente, ya que las células necesitan un tiempo para depositarse y volver a crear la monocapa en la que se mantienen. Los tratamientos realizados suelen durar entre 1 y 6 horas. En caso de que los tratamientos vayan a ser de más de 24 horas la densidad celular a la que se sembrarán las células será menor para evitar un sobrecrecimiento de las mismas y que

se supere el 80% de confluencia. Para sembrar es necesario tener en cuenta la línea a utilizar, ya que variará la densidad celular y el tipo de experimento que vayamos a realizar, ya que dependiendo del mismo se utilizarán placas de 6 pocillos (*western blotting*), placas de 24 pocillos (citometría de flujo) o placas de 96 pocillos (inmunofluorescencia o análisis metabólico).

Las placas de 96 pocillos utilizadas son especiales para inmunofluorescencia (*Corning 353219*), y se añade un volumen de medio de 0,1 mL por pocillo, o especiales para la realización de *Seahorse (Agilent)*, en las que se añade un volumen de 0,08 mL por pocillo. En las placas de 6 pocillos (*Biolite 130184*) se añade un volumen de 2 mL por pocillo y en las de 24 pocillos 0,5 mL por pocillo (*Corning 3524*).

Para determinar la concentración celular adecuada a la que sembrar debemos contar el número de células que tenemos. Una vez centrifugadas las células y después de descartar el sobrenadante, debemos resuspender el pellet con medio de cultivo. El volumen dependerá del tamaño del pellet. Luego realizaremos una dilución 1:1 de la mezcla de células con *Trypan blue 10X (Sigma-Aldrich T8154)* y se introduce en un contador de células (*Cell Counter TC10*). Finalmente, y conociendo el número de células del que partimos, podemos realizar los cálculos para sembrar las células a la concentración que nos interese.

1.4.3.Tratamientos

Inductores de Autofagia				
Reactivo	Concentración final	Vehículo	Tiempo tratamiento	Mecanismo de acción
QBA	50-100 μ M	Etanol	2-6 horas/ 24 horas	Desconocido
Earle's Balance Salt Solution (EBSS)	-	-	4 horas	Inhibición de la vía mTOR
Rapamicina (Rapa)	1 μ M	DMSO	4 horas	Inhibidor mTORC1
Inductores de Mitofagia				
Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP)	10 μ M	Acetona	2-4 horas	Desacoplante del potencial de membrana mitocondrial Inhibidor del complejo I y IV de la cadena transportadora de electrones
6-hidroxdopamina (6-OHDA)	50 μ M	Agua	18-24 horas	
Inductores de agregados/proteostres				
MG-132	2 μ M	DMSO	2 horas	Inhibidor del proteasoma
Puomicina	10 μ g/mL	Agua	3 horas	Inhibidor de la síntesis de proteínas
Inductores de Senescencia				
Doxorubicin (Doxo)	50 μ M	Agua	5-7 días	Inductor de senescencia
Palbociclib (Palbo)	50 μ M	Agua	5-7 días	Inductor de senescencia
Inhibidores de Autofagia				
Bafilomicina A1 (BAF.A1)	100 nM	DMSO	4 horas	Inhibidor V-ATPasa
Cloroquina (CQ)	50 μ M	Agua	1 hora pretratamiento 3 horas tratamiento	Neutraliza el pH de los lisosomas
Leupeptina	1 mg/mL	Agua	4 horas	Inhibidor de proteasas
3-Metiladenina (3-MA)	10 mM	Medio	1 hora pretratamiento 3 horas tratamiento	Inhibidor de PI3K clase III
Inhibidores de SIRT1				
EX-527	2 μ M	DMSO	1 hora pretratamiento 2 horas tratamiento	Inhibidor SIRT1

Tabla 1. Compuestos inductores o inhibidores de diferentes procesos.

2. Modelos murinos

2.1. Procedimiento

Los experimentos con animales se realizaron bajo los protocolos aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Extremadura (nº de registro 66/2018 y 190/2021)

El procedimiento se ajusta a las normas Éticas y Bioseguridad esenciales cumpliendo las normativas vigentes a efecto, en conformidad con los requisitos de *reemplazo*, *refinamiento* y *reducción*.

Todos los ratones utilizados fueron mantenidos en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura en Cáceres o en el Servicio de Animalario del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa en Madrid, en condiciones de aislamiento y libres de patógenos y se sacrificaron de la misma manera al finalizar los ensayos.

2.2. Modelos animales utilizados

2.2.1. Ratones ICR

Para medir el impacto de QBA a tiempos cortos de exposición se utilizaron 12 ratones ICR de 4 semanas de edad. Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con QBA (10 mg/kg) y 2 horas después con leupeptina (150 mg/kg) o un volumen equivalente del vehículo en ambas ocasiones y se sacrificaron 2 horas después de la última inyección (Ilustración 10.). Tras el sacrificio se extrajeron diferentes órganos.

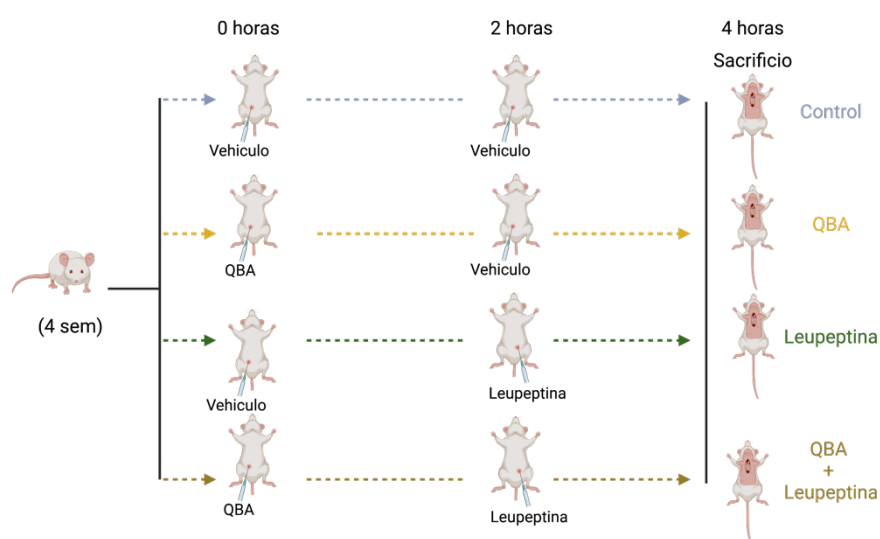


Ilustración 10. Diseño experimental de la inyección intraperitoneal realizada en ratones ICR.

Elaboración propia con *BioRender*.

Por otro lado y separados en el tiempo, se utilizaron ratones ICR de 6 semanas de edad para el estudio del efecto de QBA a tiempos largos de exposición. La administración de los tratamientos, etanol (condición control) o QBA (10 mg/kg), se llevó a cabo de forma oral, en el agua de bebida, durante 6 semanas (Ilustración 11.). Posteriormente los ratones fueron sacrificados y se extrajeron diferentes órganos.

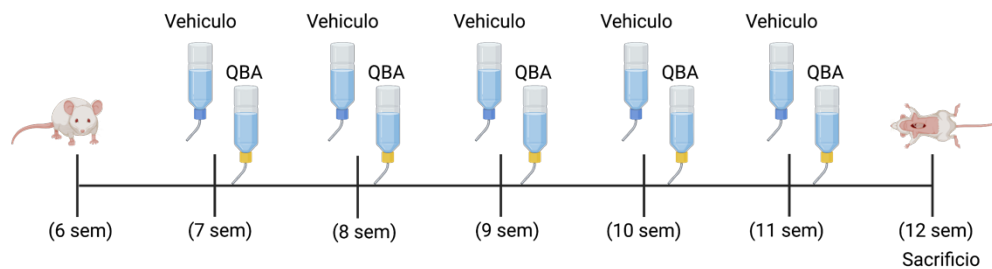


Ilustración 11. Diseño experimental de la administración oral en el agua de bebida del tratamiento realizado en ratones ICR. Elaboración propia con *BioRender*.

2.2.2. Ratones R6/1

Para el estudio del efecto de QBA en un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington se utilizaron los ratones R6/1. Se trata de un modelo transgénico, cuya base genética son los ratones C57BL/6, que expresa el exón 1 del gen que codifica la Huntingtina humana. 10 ratones de 4 semanas de edad fueron tratados con etanol (condición control) o QBA (10 mg/Kg) administrados en el agua de bebida durante 4 semanas (Ilustración 12.).

Posteriormente fueron sacrificados extrayéndose diferentes órganos (corazón, hígado y musculo) así como distintas partes del cerebro, en concreto corteza, hipocampo, estriado y cerebelo.

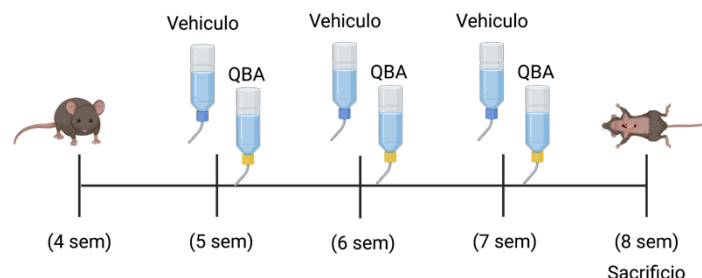


Ilustración 12. Diseño experimental de la administración oral en el agua de bebida del tratamiento realizado en ratones R6/1. Elaboración propia con *BioRender*.

2.2.3. Ratones *Lmna*^{G609G/G609G}

Para estudiar los efectos de QBA en un modelo de envejecimiento se utilizaron ratones C57BL/6 con una mutación en el gen *Lmna* (*p.G609G*).

Los ratones *Lmna*^{G609G/WT} (heterocigotos) o *Lmna*^{G609G/G609G} (homocigotos, LAKIS) presentan un envejecimiento precoz.

Los ratones, de 6 semanas de edad, fueron separados por sexo y tratados con etanol (condición control) o QBA (10 mg/Kg).

El tratamiento fue administrado en el alimento en forma de galletas que se preparaban semanalmente. Para ello se picaba el alimento hasta convertirlo en polvo para después mezclarlo con agua previamente preparada con el volumen adecuado de etanol o QBA, hasta obtener una masa. Posteriormente se extiende sobre una superficie plana y se dejan en oscuridad y un poco de calor hasta que se sequen.

Estas galletas se convierten en el alimento exclusivo de los ratones en tratamiento hasta el momento de su muerte de forma natural o hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento.

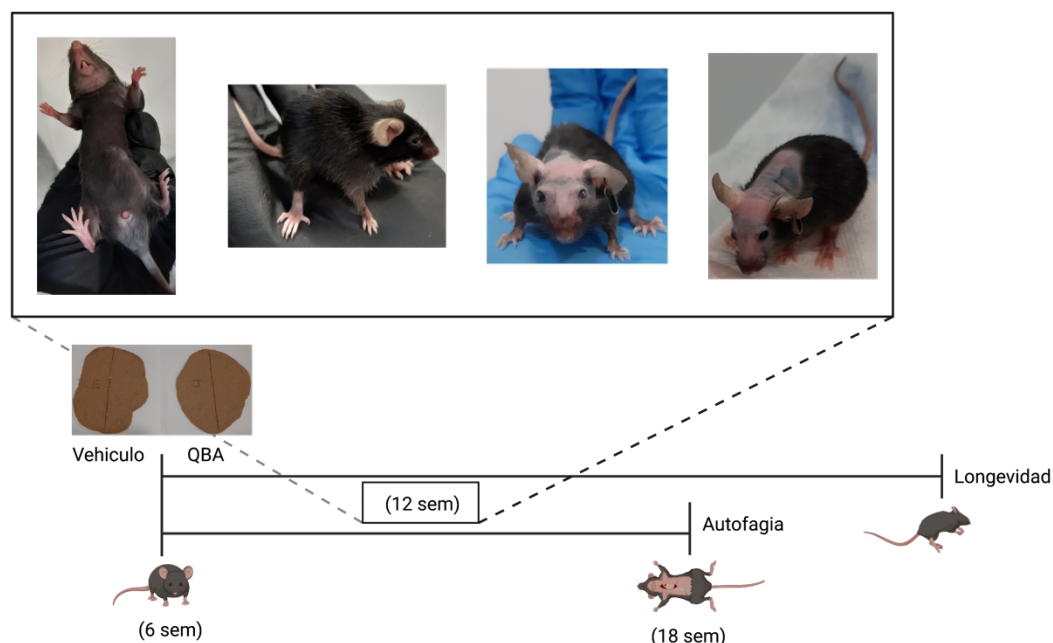


Ilustración 13. Diseño experimental de la administración oral en el alimento del tratamiento realizado en ratones *Lmna*^{G609G/G609G}. Se muestran fotos representativas de los fenotipos que comienzan a presentar los ratones homocigotos (LAKIS) que presentan la mutación *Lmna*^{G609G/G609G}, a partir de las 12 semanas de edad, como son parafimosis en el caso de los machos, deformación de la columna vertebral, problemas en los ojos o pérdida de pelo entre otros. Elaboración propia con

BioRender.

2.2.3.1. Obtención de ADN genómico

Nuestros ratones de interés para estos estudios son los homocigotos, por lo que para su obtención debemos cruzar animales heterocigotos entre sí, ya que los homocigotos son estériles.

Antes de poder iniciar los experimentos debemos realizar un genotipado de los ratones para caracterizarlos genéticamente. Esta caracterización se llevó a cabo a partir del ADN extraído de las orejas de los ratones al momento de su destete y a la vez que se les colocaba un crotal para su posterior identificación.

Las orejas se incubaban con un tampón de lisis compuesto por: Tris buffer (2M pH8), EDTA (0,5M pH8), NaCl (5M), SDS (del inglés “sodium dodecil sulfate”) (20%), proteinasa K (*ThermoFisher 25530049*) y agua miliQ, a 50°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugan las muestras (13.000 rpm, T° amb., 10 minutos), se recoge el sobrenadante y se precipita el ADN añadiendo isopropanol frío. Se vuelven a centrifugar las muestras en las mismas condiciones y al terminar se retira el sobrenadante y se deja secar el pellet, que contiene el ADN. Finalmente, se resuspende con tampón Tris-EDTA: Tris (1M pH 7,5) y EDTA (0,5M pH 8).

2.2.3.2. Amplificación del ADN genómico y genotipado

Los cebadores o *primers* utilizados para la caracterización genética el modelo fueron los siguientes:

GEN	Secuencia primers
LMNA	5' AAG GGG CTG GGA GGA CAG AG 3'
	5' AGT AGA AGG TGG CGC GAA GG 3'
	5' AGC ATC CAA TAG GGT GGA AGG 3'

Tabla 2. Secuencia de los primers utilizados para el genotipado de los ratones *LMNA*.

La reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) se realizó a partir del ADN obtenido de las orejas de los ratones. Para la reacción se mezcló el ADN previamente aislado con una master mix comercial (*Cultek B4KK4601*), los tres primers utilizados y H₂O libre de nucleasas hasta completar el volumen final.

Para la PCR se utilizó un termociclador T100 *Thermal cycler* (*Biorad*) y las siguientes condiciones:

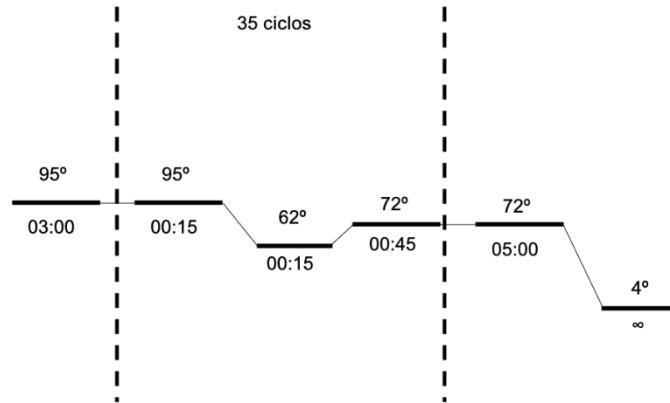


Ilustración 14. Condiciones del protocolo de PCR para el genotipado de los ratones *LMNA*.

A cada muestra del producto de la PCR se le añadió tampón de carga 6X y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE 0,5% (TBE 10X *Biorad* y H₂O DEPC (del inglés “diethyl pyrocarbonate”)) y 2 µl de *RedSafe* (*Intron* 21141).

La electroforesis se realiza utilizando el tampón TBE, a 50 V y durante unos 30 minutos y como marcador de ADN se utiliza un *DNA loader* de (*Intron* 305-105).

El resultado fue visualizado mediante un transiluminador UVP y las imágenes fueron captadas en el aparato de revelado *Amersham Imager 600*.

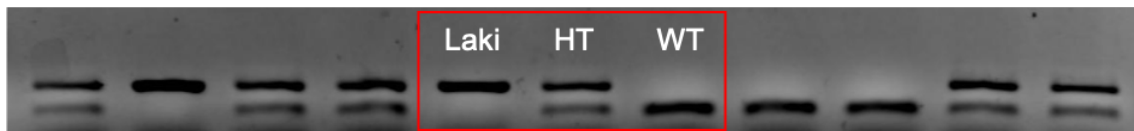


Ilustración 15. Resultado de la PCR para el genotipado de los ratones *LMNA*.

2.2.3.3. Análisis de la evolución del fenotipo de los ratones

2.2.3.3.1. Peso corporal

Se realizaron medidas de peso semanales a los ratones desde el inicio de su tratamiento hasta el momento de su muerte de forma natural o hasta el momento de su sacrificio.

2.2.3.3.2. Prueba de la fuerza de agarre (*Grip strength*)

Se midieron los niveles de fuerza muscular utilizando un tensiómetro (*Harvard apparatus 76-1065*) sobre el cual se coloca al ratón haciendo que este se agarre utilizando las patas delanteras. Posteriormente se tira ligeramente de la cola y se apunta el valor de la medida de fuerza ejercida por el ratón en respuesta. Esta medida se realiza por triplicado y el promedio se relativiza al peso del animal.



Ilustración 16. Fotografía representativa de la realización de la medida de fuerza en los ratones utilizando un tensiómetro.

2.2.3.3.3. Medida de la glucosa

También se realizó una medida del nivel de glucosa de los ratones justo después de ser sacrificados. Esta medida se realizó mediante la utilización de un glucómetro (*Glucomen areo 2K*). A los ratones se les retiró el alimento el día anterior a su sacrificio para asegurar la condición de ayuno.

3. Detección de los niveles de expresión de proteínas por *Western blotting*

3.1. Lisado de células

Para la obtención de lisados celulares, las células se siembran en placas 6 pocillos y se utilizan entre 2 y 3 pocillos por condición. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se recoge el medio de cultivo en tubos cónicos, se lavan los pocillos con PBS 1X para eliminar restos de medio y se despegan las células añadiendo unos 300 μL de tripsina/pocillo. A partir de este momento comenzaremos a trabajar en frío. Posteriormente los tubos se centrifugan a 2500 rpm, durante 7 minutos a 4°C. Se

elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con PBS 1X y se pasa todo el volumen a tubos eppendorfs (*Albus 175508*). Estos se vuelven a centrifugar a 6500 rpm durante 4 minutos a 4°C. Finalmente nos quedamos con el pellet. En este punto se podrían congelar las muestras a -80°C o continuar con el proceso.

3.1.1.Lisado total

Para el lisado total utilizaremos el tampón de lisis SB1X (Tris HCl 0'5 M pH 6'8, glicerol 10% (Panreac 211339.1211), SDS 10% y H₂O miliQ) el cual se mantiene a T^a ambiente. El volumen a añadir dependerá del tamaño del pellet. Disgregamos lo máximo posible el pellet con ayuda de la pipeta y posteriormente procedemos a su sonicación. Es importante mantener las muestras en hielo al sonicarlas ya que se genera mucho calor y se podrían desnaturalizar las proteínas.

Finalmente, en cuanto veamos que todo el pellet se ha deshecho, procederemos a calentar las muestras durante 10 minutos a 95°C en un baño termostático (*Fisherbrand*). Pasado el tiempo las muestras estarían listas para su conservación o uso.

3.1.2.Lisado fraccionado

El lisado fraccionado consiste en la obtención de dos fracciones, una fracción soluble, el sobrenadante y una fracción insoluble, el pellet.

Para ello debemos lisar las muestras con el tampón de lisis NP40 0,5% (Tris HCl 50 mM pH 7'4, NaCl 300 mM) el cual habremos suplementado previamente con pastillas inhibidoras de fosfatasas y proteasas (*Cocktel* inhibidor de proteasas, *Rocher*, 11836170001 y fosfatasas (*PhosStop*), *Rocher* 04906837001). Disgregamos el pellet con un volumen variable dependiendo del tamaño de este, e incubamos las muestras en hielo entre 30 minutos y 1 hora. Posteriormente centrifugamos las muestras a 13000 rpm, de 15 minutos a 1 hora, a 4°C. El sobrenadante será nuestra fracción soluble, la cual deberemos trasvasar a otro eppendorf, y el pellet que nos haya quedado tras la centrifugación será nuestra fracción insoluble. Esta fracción insoluble será procesada siguiendo el protocolo descrito en el apartado "lisado total".

3.2. Lisado de órganos

Al terminar un experimento *in vivo* se procede a la obtención de los distintos órganos de interés. Dichos órganos son depositados en tubos de 1,5 mL, muy bien rotulados con toda la información necesaria para su correcta identificación, y mantenidos en hielo seco hasta su posterior congelación a -80°C una vez en el laboratorio.

A la hora del procesado de los diferentes tejidos, las muestras se cortan y se añaden a tubos de centrifugación específicos para la homogenización de tejidos ("*Hard/Soft tissue homogenizing CK28-R*"; *Precellys Lysing Kit*, KT03961-1-007.2) que van a contener de tampón de lisis RIPA (Tris HCl 100 mM pH 7,4, EDTA 0,1 M, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%, SDS 10%, H₂O miliQ y pastillas inhibidoras de proteasas y fosfatasas) para el lisado de cerebro (tubos *Soft*) o Tritón X-100 (NaCl 1,5 M, Tris HCl 200 mM pH 7,5, Tritón X-100 0,1%, EDTA 1 mM, H₂O miliQ y pastillas inhibidoras de proteasas y fosfatasas) para el resto de órganos (tubos *Hard*).

Los trozos de órganos cortados se conservan en hielo. Luego son procesados en un *precellys* (*Precellys 24. Bertin Tecknologies*) con el siguiente ciclo: 6500 rpm x 23 segundos, seguido de 20 segundos de reposo y finalmente 6500 rpm otros 23 segundos. Al terminar pasamos todo el volumen a tubos eppendorfs y dejamos reposar las muestras en hielo entre 30 y 60 minutos. Luego las centrifugamos a 13000 rpm, de 15 minutos a 1 hora, a 4°C. Conservamos el sobrenadante y el pellet podemos descartarlo o mantenerlo como fracción insoluble y lisarlo con SB1X como anteriormente se ha comentado.

3.3. Cuantificación de proteínas

El siguiente paso sería la determinación de la cantidad de proteínas que contienen nuestras muestras. Para ello utilizamos el método del BCA (del inglés "bicinchoninic acid", *Sigma-Aldrich B9643*). Se trata de un ensayo colorimétrico que permite medir la concentración de proteínas totales en una muestra mediante una reacción química que provoca una variación del color de la muestra cuya absorbancia, medida a una longitud de onda de 570 nm, es directamente proporcional a la concentración de proteínas.

Además de las muestras necesitaremos una recta patrón preparada con albúmina sérica bovina (BSA, *Sigma-Aldrich A7906*) y una concentración de proteínas conocida, que oscila entre 0 µg/µL y 2 µg/µL.

Cada muestra se cuantifica por triplicado en una placa Elisa de 96 pocillos (*Corning 3788*).

Preparamos una mezcla de BCA con sulfato de cobre (II) (*Sigma-Aldrich C2284*) en una proporción 50:1. La placa se incuba en oscuridad en una estufa a 37°C entre 15 y 30 minutos. Finalmente, la absorbancia de la placa será leída en un espectrofotómetro (*Biochrom Asys UVM 340*). Con los valores de la recta patrón, se interpolan los valores obtenidos de las muestras y nos permitirá prepararlas todas a la misma concentración.

3.4. Electroforesis de proteínas

El siguiente paso consiste en separar las proteínas por peso lo que nos va a permitir identificar nuestras proteínas de interés. Las muestras que se utilizarán serán fracciones totales o la fracción soluble obtenida en el lisado fraccionado.

Para ello debemos preparar las muestras a una concentración de proteínas conocida, normalmente entre 10 y 35 µg, ajustando su volumen, el cual va a depender del tamaño del pocillo de los geles que utilicemos, con PBS 1X, y añadiendo un tampón de carga 5X (Tris HCl 1M pH6'8, SDS 10%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0'0025% y H₂O miliQ). Este tampón va a teñir las muestras permitiéndonos seguir su avance durante la electroforesis; también aumenta su densidad y va a hacer que la migración de las mismas sea más homogénea. Además, el tampón contiene β-mercaptoetanol que va a ayudar a la desnaturalización proteica rompiendo enlaces disulfuro aunque, para ello, es necesario calentar las muestras durante 5 minutos a 95°C. Luego esas muestras son cargadas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato-sódico (SDS-PAGE del inglés "*SDS polyacrilamide gel electrophoresis*") de porcentaje fijo, 12% o en gradiente, 4-20%, y 10, 12, 15 pocillos (*Mini-proteanTGX*), 18 o 26 (*Criterion TGX*) dependiendo de las proteínas a estudiar y del número de muestras. Se utilizará también un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standard Bio-Rad, Bio-Rad 161-0374*) como referencia del peso molecular de las proteínas. Las cubetas de electroforesis utilizadas dependerán del tamaño del gel y son *Bio-Rad Mini Protein Tetra System*, (geles *Mini Protean*) o *Bio-Rad Criterion Cell* (geles *Criterion*). En ambos casos el tampón de electroforesis utilizado es *Laemmli 1X* (*Laemmli 100X, Fisher BioReagents BP13414* y H₂O destilada). Según el voltaje, entre 90 y 150 V, al que se sometan las muestras, el tiempo de la electroforesis variará, aunque suele rondar 1 hora y 30 minutos.

3.5. Transferencia de proteínas

Finalizada la electroforesis se pasa a la realización de la transferencia de las proteínas a membranas de polivinil difluoruro (PVDF, *Bio-Rad* 162-0177). La membrana debe ser activada previo uso durante 1 minuto en etanol o metanol, seguido de 1 minuto en agua destilada y finalmente se mantiene en el líquido de transferencia hasta su utilización.

3.5.1. Análisis por Filter Trap

Empleamos la técnica del *Filter trap* (FTA, *Bio Dot SF cell*, *Bio-Rad*) para estudiar agregados proteicos insolubles. Consiste en transferir una muestra a una membrana ayudándonos de una bomba de vacío. Los agregados quedarán retenidos en la membrana y podremos cuantificarlos ayudándonos de anticuerpos.

Para llevarlo a cabo vamos a utilizar la fracción insoluble que se obtiene en el lisado fraccionado. Es necesario realizar de forma paralela una electroforesis de la fracción soluble de las muestras, de manera que podamos cuantificar los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Una vez cuantificadas las muestras se preparan a varias concentraciones de proteínas, la mayor de ellas coincidiendo con la cargada en la electroforesis, empleando el tampón TBS 1X (del inglés *Tris Buffer Saline*, 4,84 g Tris-HCl, 58,48 g NaCl y H₂O destilada hasta 2 L, pH 7,5). Embebemos tres papeles *Whatman* (*Bio-Rad*) y una membrana de nitrocelulosa (*Bio-Rad* 162-0112), en TBS 1X, y se procede al montaje del aparato de la siguiente manera: base del aparato, placa de soporte, borde sellador de plástico, los tres papeles *Whatman*, la membrana y la tapa del aparato (Ilustración 17).

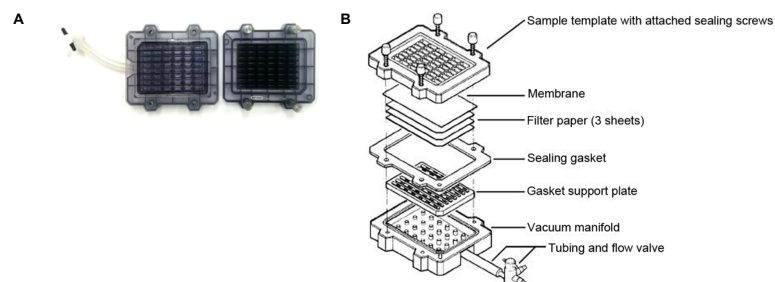


Ilustración 17. A) Fotografía del aparato Bio-Dot®. B) Esquema del montaje del aparato Bio-Dot®.

El aparato se conecta a una bomba de vacío y, se cierra ajustando los tornillos siguiendo el esquema que aparece en la ilustración 18.A. Una vez cerrado, rehidratamos la membrana con TBS 1X y cuando desaparezca todo el volumen (posición 1, ilustración 18.B.) procedemos a añadir nuestras muestras (posición 2, ilustración 18.B.). Ponemos la bomba en vacío suave (posición 3, ilustración 18.B.) hasta que desaparezca todo el volumen de todos los pocillos. Es importante que todos los pocillos estén llenos, ya sea con muestras o con TBS 1X, para que se pueda realizar el vacío correctamente. Finalmente lavamos los pocillos con TBS 1X y cuando no quede líquido podemos poner la membrana a bloquear con leche en polvo desnatada al 10% preparada en TTBS 1X (del inglés *Tween Tris Buffer Saline*, 1 L de TBS 1X y 0,5 mL *Tween 20* (*Sigma-Aldrich P1379*)) durante 1 hora a T^a ambiente. A partir de aquí se continua con el proceso de forma similar a las siguientes formas de transferencia descritas a continuación.

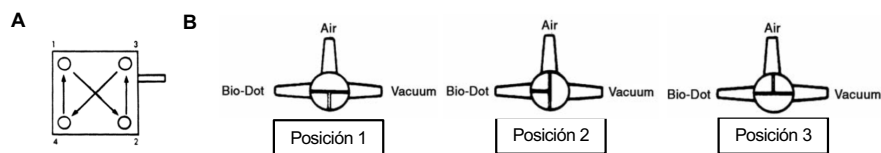


Ilustración 18. A) Esquema representativo de la forma correcta para ajustar los tornillos y cerrar el aparato Bio-Dot®. B) Posiciones de la válvula de vacío a lo largo del proceso.

3.5.2. Transferencia en húmedo

Para la transferencia en húmedo se necesitan 2 papeles *Whatman*, dos esponjas, la membrana previamente activada y el gel. Todo el montaje debe hacerse embebido en el tampón de transferencia CAPS 1X (CAPS 10%, *Sigma-Aldrich C2632*, metanol, *Panreac 141091* y H₂O destilada). Una vez montado el denominado “sándwich” se introduce en la cubeta de transferencia, se rellena con el tampón de transferencia y se coloca un bloque de hielo en el interior para evitar un sobrecalentamiento. Además, se puede colocar la cubeta sobre una bandeja rodeada de hielo y llevarlo todo a un frigorífico. Las condiciones de transferencia son 110 V fijos, con un amperaje variable que suele rondar los 0,25 A, durante 90 minutos.

En el caso de los geles *Criterion*, se realiza todo exactamente igual con la utilización del Tris Glicina Metanol 1X (TGM) como tampón de transferencia y 75 V, 0,25 A y 45 minutos como condiciones.

3.5.3. Transferencia en semi-seco

Para la transferencia en semi-seco no se necesitan cubetas, solo el aparato *TransBlot-Turbo Transfer System*TM. Se requieren 2 papeles *Whatman* de mayor grosor y 3/4 papeles *Whatman* de tamaño estándar. Se procede de la misma manera que la transferencia en húmedo, activando la membrana y embebiendo todo en el tampón de transferencia que en este caso va a ser TGM. Se realiza el montaje, y se transfiere durante 15 minutos a 25 V.

Una vez finalizada la transferencia, por cualquiera de los métodos indicados, las membranas son teñidas con rojo *Ponceau* (*Sigma-Aldrich P7170*) para marcar las proteínas y confirmar si la transferencia se ha realizado de forma correcta. Se puede hacer una fotografía de la membrana con la tinción en la máquina de revelado, en la función “*colorimetric*”, que nos puede servir como control de carga.

3.6. Detección de proteínas

Una vez eliminado el *Ponceau* lavando las membranas con TTBS 1X, debemos realizar un bloqueo durante 1 hora a T^a ambiente con una solución de bloqueo al 10% de leche desnatada en polvo diluida en TTBS 1X. Este bloqueo se realiza para eliminar las uniones inespecíficas que se puedan generar al incubar posteriormente nuestra membrana con los anticuerpos de interés.

Pasado el tiempo, lavamos 3 veces la membrana con TTBS 1X para eliminar los restos de leche y procedemos a su incubación con los anticuerpos de interés. Estos anticuerpos son preparados en leche al 10% o BSA al 5% y a distintas concentraciones dependiendo de las indicaciones de la casa comercial y se suelen incubar durante toda la noche en agitación a 4°C.

Al día siguiente se retira en anticuerpo primario, se lavan las membranas 3 veces con TTBS 1X y se realiza una segunda incubación con un anticuerpo secundario, específico para cada anticuerpo primario utilizado (*mouse, rabbit o goat*), que se encuentra conjugado con la enzima HRP (del inglés “*Horseradish peroxidase*”). Los anticuerpos secundarios se preparan en leche al 10% y se incuban durante 1 hora a T^a ambiente en agitación. Cuando finaliza la incubación secundaria, se lavan las membranas 3 veces con TTBS 1X y se puede proceder a su revelado.

Anticuerpo	PM (kDa)	Isotipo (IgG)	Dilución	Solución (TTBA)	Casa comercial
α-TUBULINA	52	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
ACTB	42	HRP	1/50000	10% leche	<i>Abcam</i>
ACETIL TUBULINA K40	52	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
ATG5	55	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
ATG7	75	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
BECN1	60	Policlonal	1/1000	10% leche	<i>Santa Cruz</i>
BNIP3L/NIX	76,38	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
C-CASPASA 3	17	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
COX IV	16	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Abcam</i>
C-PARP	89	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
CTSB	25/20	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Abcam</i>
FOXO1	82/78	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
FOXO3	97/82	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
GAPDH	37	Monoclonal	1/1000	10% leche	<i>Millipore</i>
GFP	27	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
H2AX	17	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Sigma</i>
HDAC6	150	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Santa Cruz</i>
HTT	348	Monoclonal	1/5000	10% leche	<i>Millipore</i>
K63	rsmear	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
LAMIN A/C	74-65	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Santa Cruz</i>
LAMP1	100	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Abcam</i>
LAMP2	120	Monoclonal	1/1000	10% leche	<i>Santa Cruz</i>
LC3	18,16	Policlonal	1/5000	10% leche	<i>Sigma</i>
mHTT	>200	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Millipore</i>
MNF1	84	Policlonal	1/1000	10% leche	<i>Abcam</i>
NRF2	100	Policlonal	1/1000	10% leche	<i>Abcam</i>
OPTN	75	Policlonal	1/1000	10% leche	<i>Cell Signaling</i>
p21	21	Monoclonal	1/500	5% BSA	<i>Santa Cruz</i>
P4D1	rsmear	Monoclonal	1/1000	10% leche	<i>Santa Cruz</i>
p62(SQSTM1)	62	Monoclonal	1/1000	10% leche	<i>Abnova</i>
PGC1α	90	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Santa Cruz</i>
PHB1	32	Policlonal	1/1000	10% leche	<i>Cell Signaling</i>
PINK1	66	Policlonal	1/500	10% leche	<i>Novu</i>
SIRT1	120	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
SIRT2	43,39	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
SIRT3	28	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
SIRT5	30	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
SIRT6	42,36	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Cell Signaling</i>
SOD1	18	Policlonal	1/500	5% BSA	<i>PAS</i>
SOD2	23	Monoclonal	1/1000	10% leche	<i>Santa Cruz</i>
TFEB	75	Policlonal	1/1000	5% BSA	<i>Proteintech</i>
TIMM23	23	Monoclonal	1/5000	5% BSA	<i>BD</i>
TOMM20	20	Monoclonal	1/500	5% BSA	<i>Sigma</i>
TRIM16	70	Monoclonal	1/1000	5% BSA	<i>Santa Cruz</i>
VINCULINA	120	Monoclonal	1/1000	10% leche	<i>Sigma</i>

Tabla 3. Características y diluciones de los anticuerpos primarios específicos para cada proteína estudiada. PM es el peso molecular de la proteína en kilodaltons (kDa). rsmear hace referencia a todas las proteínas ubiquitinadas en una lisina.

3.7.Revelado

Este proceso se lleva a cabo en el equipo *Amersham Imager 600* empleando una solución ECL (del inglés “*Enhanced chemiluminescent by luminol*”) (*Pierce™ ECL Western Blotting Substrate; ThermoFisher Scientific 32106*) que oxida el luminol en presencia de la HRP generando una reacción quimioluminiscente.

En caso de que la señal sea muy débil se puede utilizar un reactivo más sensible (*SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate*).

Las membranas pueden ser reincubadas con otros anticuerpos de distinto peso molecular o que tengan un anticuerpo secundario diferente para que no haya interferencias de señales. En caso de que las hubiera, se podría realizar el borrado de las membranas antes de proceder a su reincubación. Para ello se añade a la membrana una solución de borrado *Stripping buffer (Thermofisher 46430)* durante 10 minutos. Luego se retira muy bien realizando varios lavados con TTBS 1X y se bloquea la membrana toda la noche con leche al 10%. Al día siguiente estaría lista para volver a ser incubada.

Es necesario incubar las membranas con un anticuerpo que nos sirva como control de carga y que nos permita verificar la cantidad de proteína cargada y confirmar que los posibles cambios en los niveles de las proteínas que veamos se deben a nuestros tratamientos y no a una mala carga de las muestras.

4.Transfección celular

Hay ocasiones en las que es necesario insertar proteínas exógenas marcadas dentro de las células para poder visualizar estructuras que de otra manera no sería posible o sería más complicado e, incluso, inducir la generación de agregados proteicos, como ha sido el caso en esta ocasión. Los plásmidos utilizados han sido:

- pEGPF-Htt-Q74 (Htt-Q74): modelo genético de Huntington que induce la formación de agregados y que está unido a la proteína verde de fluorescencia GFP.
- pcDNA 3.1: plásmido vacío utilizado como control negativo de la transfección.

El día siguiente tras la siembra se realiza la transfección. Para ello se utiliza como agente de transfección *Lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668030)* y un medio específico *Opti-MEM (Gibco 51985-026)*. Vamos a preparar los siguientes tubos (debemos preparar tantos tubos como plásmidos distintos vayamos a utilizar y el

volumen del tubo B variará proporcionalmente):

- Tubo A: Opti-MEM + plásmido (3 µg plásmido/100 µl *Opti-MEM*)
- Tubo B: Opti-MEM + Lipofectamina 2000 (3 µl Lipo./100 µl *Opti-MEM*)

Dejamos reposar los tubos 5 minutos, se mezclan bien y se incuban a T^a ambiente durante 30 minutos.

Mientras retiramos el medio de los pocillos de las placas a transfectar y los lavamos con PBS 1X. Luego añadimos *Opti-MEM* a las placas y, pasado el tiempo de incubación añadimos, gota a gota, la mezcla A+B a cada pocillo.

Incubamos durante 5 horas a 37°C antes de añadir medio fresco sin antibiótico y con el doble de FBS a cada uno de los pocillos transfectados. En ese momento ya es posible visualizar alguna célula con fluorescencia, aunque hasta el día siguiente no se alcanzará la máxima eficiencia de transfección. Al día siguiente podemos proceder como normalmente.

5.Silenciamiento génico

Para estudiar la implicación de un gen/ proteína en un proceso concreto realizamos un silenciamiento génico. Usamos ARN pequeños de interferencia (siRNA del inglés “*small interfering RNA*”) que se unen a una región específica del mRNA complementario para reducir su nivel de expresión. Los siRNA utilizados han sido los siguientes:

- siRNA *SIRT1*: interviene en la expresión de SIRT1 (*Invitrogen* AM16708)
- siRNA *Negative Silencer*: control negativo del silenciamiento (*Ambion* AM4611).
- siRNA *KIFF11*: control positivo del silenciamiento (*Life Technologies* AM4639).

Las células son sembradas a baja confluencia en placas de 6 pocillos con medio normal o directamente con medio completo sin antibiótico. Al día siguiente se realiza el silenciamiento utilizando también *Lipofectamina 2000*. Vamos a preparar los siguientes tubos (debemos preparar tantos tubos como siRNAs distintos vayamos a utilizar y el volumen del tubo B variará proporcionalmente):

- Tubo A: Opti-MEM + siRNA (33 nM siRNA/200 µL Opti-MEM)
- Tubo B: Opti-MEM + Lipofectamina 2000 (4 µL Lipo./200 µL Opti-MEM)

Los volúmenes se calculan dependiendo del número de pocillos a silenciar. Dejamos

reposar las mezclas 5 minutos, luego los unimos, mezclándolos muy bien y los incubamos a T^a ambiente durante 20 minutos.

Mientras, retiramos el medio de los pocillos de las placas donde vayamos a realizar el silenciamiento y añadimos 1,6 mL de medio sin antibiótico por pocillo. Si estaban con medio completo, los lavamos con PBS 1X antes para eliminar todos los restos de antibiótico; si estaban con medio sin antibiótico, añadimos medio fresco. Pasado el tiempo de incubación añadimos, gota a gota, 400 µL de la mezcla A+B por pocillo.

Incubamos hasta el día siguiente a 37°C, cuando podremos proceder como normalmente.

6. Técnicas de imagen

Con esta técnica se pretende marcar orgánulos o proteínas para su posterior visualización y análisis, observar células que presentan fluorescencia, como las H4-GFP-LC3, o células que hayamos transfectado con plásmidos que contienen una proteína marcada con fluorescencia.

6.1. Microscopía de fluorescencia

Los marcajes pueden realizarse *en células vivas* o fijar las células para realizar el marcaje en otra ocasión. En el caso de los marcajes *in vivo*, unos 15 minutos antes de que termine nuestro tratamiento, retiramos el medio y añadimos medio con *Lysotracker red* (LTR) (concentración final 100 µM).

Después de los tratamientos, se haya o no realizado marcaje *in vivo*, se procede a la retirada del medio, se realizan varios lavados con PBS 1X y se fijan las células con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 20 minutos.

Luego se retira y lavamos varias veces con PBS 1X.

Durante el proceso de fijación y de forma simultánea, se puede realizar la tinción de los núcleos de las células utilizando los marcadores fluorescentes de ADN, DAPI (*ThermoFisher* P36966) o Hoechst 33342 (Ho) (*Sigma-Aldrich* B2261), durante 5 minutos, a una concentración de 1µg/µL. Esta tinción con DAPI o Ho puede realizarse también a posteriori.

En este punto podríamos observar las células en el microscopio o continuar el proceso en el caso de que queramos realizar incubaciones con anticuerpos específicos.

6.2. Microscopia confocal

Para realizar el marcaje con anticuerpos, lo primero que debemos hacer es permeabilizar las células para facilitar la entrada de los anticuerpos en las mismas. Para ello incubamos los pocillos donde vayamos a realizar los marcajes con Tritón 0,1% durante 5 minutos en agitación y a T^a ambiente. Luego se retira, se lava con PBS 1X y se bloquea con BSA 1% entre 30 minutos y 1 hora, en agitación y a T^a ambiente. Otra opción sería permeabilizar y bloquear al mismo tiempo utilizando saponina 0'01% durante 1 hora, en agitación y T^a ambiente. Finalmente se lava con PBS 1X otra vez y se añaden los anticuerpos primarios. Los anticuerpos primarios se preparan en BSA 1% a la concentración que indique la casa comercial. Las placas con los anticuerpos primarios se dejan en agitación, a 4°C durante toda la noche o a T^a ambiente durante 1 hora. Al día siguiente se recoge el anticuerpo primario para su reutilización en otra ocasión, se lavan bien los pocillos con PBS 1X y se añade el anticuerpo secundario que corresponda, también preparado en BSA 1%. Se debe incubar a T^a ambiente durante 1 hora en agitación antes de su retirada y posterior lavado con PBS 1X. Es importante tener en cuenta, no solo la especificidad (monoclonal o policlonal) sino el fluorocromo que tenga conjugado, ya que nos va a permitir combinar varios anticuerpos en un mismo pocillo o marcar proteínas en un color y alguna estructura en otro. Disponemos de anticuerpos *Alexa Fluor 488* con fluorescencia en verde y *Alexa Fluor 568* con fluorescencia en rojo.

Las placas ya estarían listas para ser visualizadas al microscopio.

6.3. Procesado de las imágenes

Las imágenes han sido analizadas utilizando un microscopio invertido de fluorescencia (*Olympus Cellsens IX-83*) o en un sistema de imagen confocal A1 montado en un microscopio invertido Eclipse Ti (*Nikon Corp. A1*) ambos acoplados a una cámara fotográfica. Todas las imágenes pertenecientes a un mismo experimento fueron tomadas en las mismas condiciones de exposición. Para la cuantificación del número de puntos, tamaño, intensidad, colocalización, número de células u otros parámetros, se han utilizado diferentes macros y *plugins* del software *ImageJ* del NIH (*National Institute of Health*). En todos los análisis de imágenes por IF se han contado, al menos 200 células por condición.

5.4. Microscopía electrónica

Para estudiar orgánulos o compartimentos celulares a nivel ultraestructural se realizó microscopía electrónica de transmisión (MET). Es necesario preparar las muestras a partir de un número elevado de células por lo que se sembraremos, al menos, una placa por condición. Se procede como normalmente y una vez obtenido el pellet añadimos a cada muestra glutaraldehído 2'5% en cacodilato (9 mL de cacodilato 0,1 M, pH 7,4 y 1 mL de glutaraldehído al 25%) y dejamos reposar las muestras en hielo o a 4°C durante 2 horas. Volvemos a centrifugar las muestras a 1200 rpm, 5 minutos a 4°C y retiramos el sobrenadante. Añadimos a las muestras cacodilato 0,1 M, dejamos reposar 5 minutos en hielo, centrifugamos en las mismas condiciones y volvemos a repetir una vez más. Finalmente retiramos el sobrenadante, añadimos una última vez cacodilato y mantenemos las muestras en el frigorífico hasta su envío para su análisis.

6.5. Microscopía óptica

Los microscopios ópticos no son únicamente utilizados para determinar el estado de las células en cultivo o su confluencia. También pueden acoplarse a ordenadores y cámaras fotográficas que nos permitan tomar fotos de cambios en la morfología, tamaño, crecimiento, características e incluso visualizar tinciones *in vivo*. Una de las técnicas que se pueden realizar y observar con un microscopio óptico es la tinción β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) de la cual hablaremos más adelante.

7. Técnicas con ARN

Para conocer si la expresión de determinados genes varía bajo diferentes condiciones o tratamientos se emplea la técnica de PCR (del inglés "*Polymerase Chain Reaction*") a tiempo real. El producto de la PCR se va a detectar utilizando sondas de marcaje fluorescentes, concretamente *SYBR Green I*, el cual se une al ADN de doble cadena, de manera que, la cantidad de fluorescencia será directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR formado.

7.1. Extracción de ARN

La extracción del ARN mensajero necesario para comenzar el proceso puede realizarse tanto de cultivos celulares como de órganos.

En nuestro caso hemos utilizado células. Debemos recoger los cultivos como

normalmente y realizar todos los pasos hasta obtener el pellet, el cual puede congelarse a -80°C hasta que se pueda seguir con el proceso o continuar con la extracción.

El pellet se resuspende con *TRIsure* frío (*Bioline-38032*) con ayuda del vortex, en una campana extractora de gases y se incuban a T^{a} ambiente durante 5 minutos. Luego se añade cloroformo (*Acros organics*, 404635000) en la misma campana y se mezcla muy bien por inversión, unas 20 veces aproximadamente. Las muestras de vuelven a incubar a T^{a} ambiente durante 10 minutos. Se centrifugan las muestras a 12000 rpm, durante 20 minutos a 4°C y la fase acuosa se recoge, con mucho cuidado, en eppendorfs nuevos. Añadimos isopropanol (*Panreac*, 141090) y mezclamos bien. En este punto se podría parar, manteniendo las muestras a 4°C o continuar con el proceso. Si continuamos, debemos incubar durante 10 minutos las muestras a 4°C antes de centrifugarlas a 12000 rpm, durante otros 10 minutos, a 4°C . Retiramos el sobrenadante y lavamos con etanol (*Panreac*, 141086) frío al 75%. Centrifugamos a 7500 rpm durante 5 minutos y volvemos a repetir el proceso 2 veces más.

Finalmente retiramos todo del etanol posible y dejamos secar las muestras al aire. Posteriormente disolveremos el pellet, que será ARN, con agua DEPC e incubaremos las muestras durante 10 minutos a 60°C . Las muestras pueden conservarse a -20°C .

7.2. Síntesis de ADN codificante

Antes de continuar con el proceso, debemos cuantificar la pureza, calidad y cantidad del ARN mensajero obtenido midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (*NanoDrop 2000*, *Thermo Scientific*).

Para la obtención del ADN codificante (ADNc) partimos del ARNm, el cual mezclaremos con *Buffer 10X*, *DNAseI* (*Sigma*, *AMPD1-1KT*) y agua DEPC.

Una vez tengamos preparadas todas las muestras las ponemos en el termociclador (*Thermal Cycler BioRad*) siguiendo las etapas y pasos recogidos en la ilustración 19.

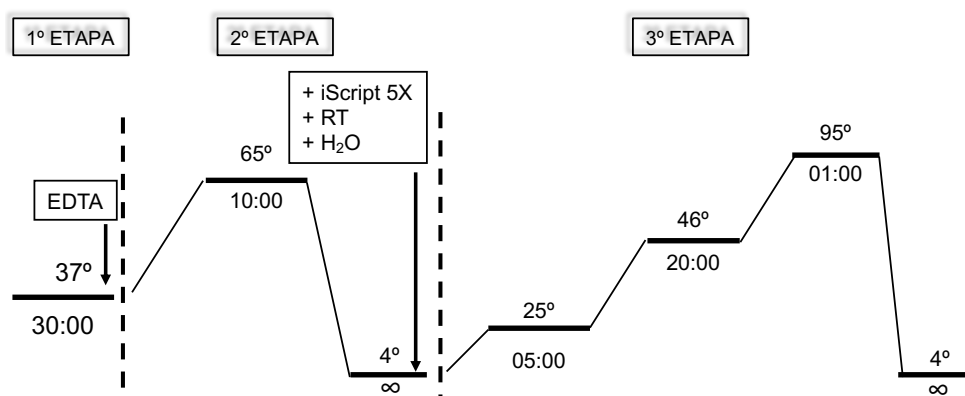


Ilustración 19. Condiciones de trabajo del termociclador T100.

Al finalizar la tercera etapa podemos conservar las muestras a -20°C hasta que realicemos la PCR.

7.3.PCR cuantitativa

Una vez tenemos el ADNc, diluimos las muestras con agua DEPC para tenerlas a una concentración final de 100 ng/μl. Y preparamos nuestras muestras junto con una máster mix o mezcla de reacción (Máster mix 2X, (*Kappa SYBR Fast Master Mix, B4KK4601*), mezcla de *primers* (*Forward + Reverse*) y H₂O DEPC) para cada uno de los genes que vayamos a analizar. Utilizamos un equipo de PCR a tiempo real (*Applied Biosystem 7500*) con las siguientes condiciones:

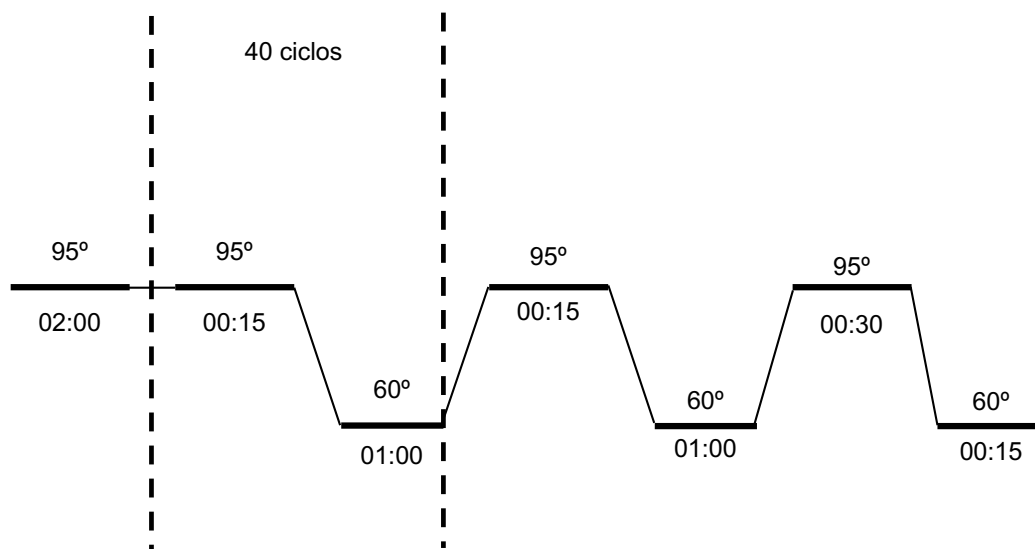


Ilustración 20. Condiciones de trabajo de la máquina de PCR *Applied Biosystem 7500*.

8.Citometría de flujo

La citometría de flujo se utilizó para analizar la inducción de apoptosis. Cuando una célula entra en apoptosis, la simetría de la membrana plasmática cambia, permitiendo la unión de Anexina V (*Inmunostep, ANXVF-200T*). Como esta se encuentra conjugada con un fluorocromo, en este caso isocianato de fluoresceína (FITC), al producirse la unión de la Anexina V con la membrana se emitirá una fluorescencia que puede ser medida. Por otro lado, el yoduro de propidio (IP) (*Sigma-Aldrich, P4170*) es una sonda fluorescente que permite identificar células muertas o necróticas al ser capaz de atravesar la membrana plasmática en esos casos. Por lo que podemos determinar el porcentaje de muerte celular al cuantificar la cantidad de IP que tengamos.

Las células N2a se sembraron en placas de 24 pocillos, utilizando 6 pocillos por condición. Se procede como habitualmente y cada pocillo es recogido en un tubo de citometría (*Enzo laboratories 51031*). Se centrifugan los tubos a 1200 rpm durante 5 minutos y posteriormente se descarta el sobrenadante. El pellet se resuspende con Anexina V/FITC y se deja incubando en una estufa a 37°C durante 15 minutos o durante 30 minutos a T^a ambiente. Después de añade 0,1 mg/mL de IP por tubo. Se incuba a T^a ambiente durante 5 minutos y se procede a su medida en el citómetro *Beckman-Coulter FC500-MPL*. Este aparato nos va a permitir detectar el porcentaje de células positivas para Anexina V o IP. Una media de 10⁴ eventos (células) fueron analizados para cada condición.

9. Análisis *Pulse-Chase*

La técnica de *pulse-chase* consiste en medir el catabolismo de diferentes macromoléculas; en nuestro caso, proteínas de vida media larga. El proceso puede ser dividido en dos fases: “*pulse*” fase donde se marcan las proteínas de interés con un isótopo radioactivo y “*chase*” fase donde se añade la forma sin marcar del compuesto, reemplazando al compuesto marcado. De esta manera, todas las proteínas de interés nuevas que se hayan generado irán marcadas radiactivamente y podremos medir su disminución conforme se vayan degradando.

Las células se siembran en placas de 6 pocillos.

- Día 1:

El día siguiente a la siembra celular comenzaría la primera fase “*Pulse*” que consiste en sustituir el medio de las células por medio que contiene 2 µL/mL de L-Valina [¹⁴C] (*PerkinElmer, NEC291EU050UC*). Mantenemos las células en cultivo entre 18 y 24 horas.

- Día 2:

Posteriormente se procedería con la siguiente fase “*Pre-chase*”, durante la cual se elimina el medio con el isótopo radioactivo y, tras varios lavados con PBS 1X se realiza un pre-tratamiento de 1 hora a 37°C con medio fresco que contiene L-Valina 10 mM (no radiactiva) (*Sigma, V0513*).

Pasado esa hora entraríamos en la fase “*Chase*”, en la cual se retira el medio y se

sustituye por medio fresco con L-Valina y nuestros tratamientos durante el tiempo que deseemos. A la hora de recoger nuestros tratamientos procederemos de la siguiente manera: el medio de cada pocillo se recogerá en tubos eppendorfs que rotularemos como fracción precipitada (Rp) y a los que añadiremos TCA (del inglés “trichloroacetic acid”, *Sigma-Aldrich, T9159*) al 100%. El TCA va a permitir que las proteínas precipiten. Dejaremos los eppendorfs en un rotor durante toda la noche a 4°C. Las placas con las células pueden congelarse a -80°C hasta el día siguiente o continuar el proceso.

- **Día 3:**

Al día siguiente se añade TCA al 10% frío en cada pocillo de las placas que estaban congeladas a -80°C. Se incuban durante 15-20 minutos a 4°C y se elimina todo el TCA. Posteriormente se añade NaOH 0,2 M a cada pocillo, para disolver los precipitados, y se incuba durante 1 hora a 37°C. Luego raspamos todo el contenido de los pocillos y lo añadimos a eppendorfs rotulados como fracción celular (Rc).

Por otro lado, centrifugamos los eppendorfs Rp durante 20 minutos a 3000 rpm y 4°C. El sobrenadante lo recogeremos en eppendorfs rotulados como fracción soluble (Rs) y el pellet que ha quedado en los tubos Rp lo disolveremos con ayuda de un vortex y 500 µL de NaOH 0,2 M.

Las muestras pueden mantenerse a T^a ambiente hasta el momento de su análisis, después se mezclará cada muestra con líquido de centelleo (*PerkinElmer 1200.437, RRS 314*) en viales de centelleo (*Fisher 10523904*) y, tras 2 horas, se procede a medir la degradación en un contador β de centelleo.

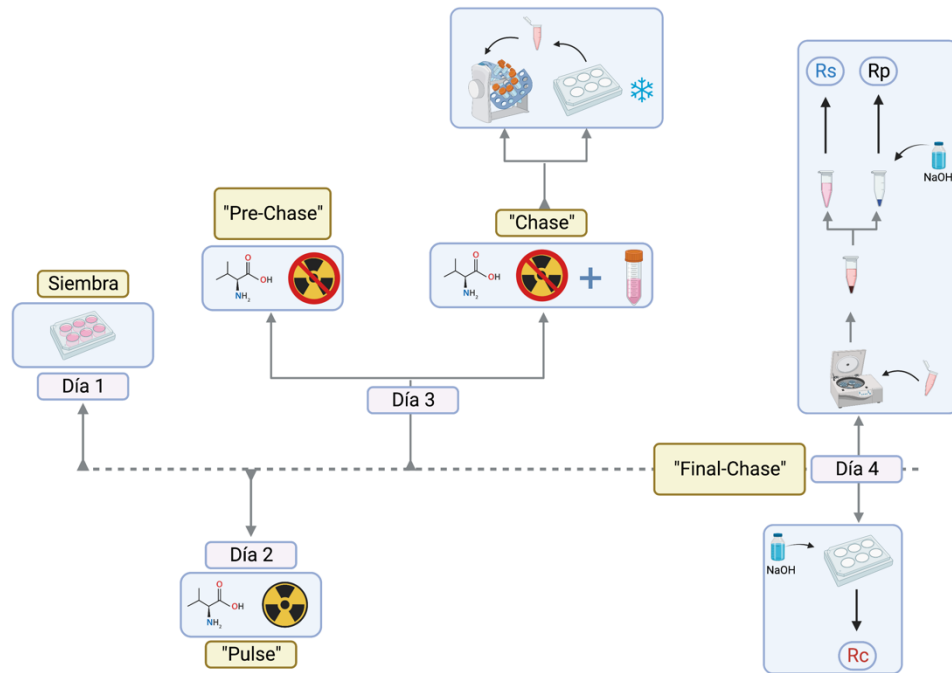


Ilustración 21. Esquema resumen de los pasos realizados durante el análisis "Pulse-Chase".

Elaboración propia con *BioRender*.

10. Análisis metabólico

Para determinar la función mitocondrial se empleó el analizador metabólico *Agilent Seahorse XF96* que nos va a permitir monitorizar cambios en el consumo de oxígeno y en el pH extracelular en células vivas. En concreto se utilizó el *kit Seahorse XF Cell Mito Stress Test* (103015-100).

Este kit nos va a permitir determinar los siguientes parámetros:

- Respiración basal: Muestra el consumo de oxígeno de la célula en condiciones basales.
- Respiración ligada a la producción de ATP: Muestra la cantidad de oxígeno empleado por las mitocondrias para producir ATP.
- Fuga de protones: Respiración basal que no está acoplada a la producción de ATP. Es un indicativo de daño mitocondrial.
- Respiración máxima: Consumo máximo de oxígeno que puede alcanzar una célula.
- Capacidad respiratoria máxima o *Spare Capacity*: Capacidad máxima de la célula para responder a la demanda energética.
- Respiración no mitocondrial: Consumo de oxígeno por otras fuentes diferentes a las mitocondrias.

Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile

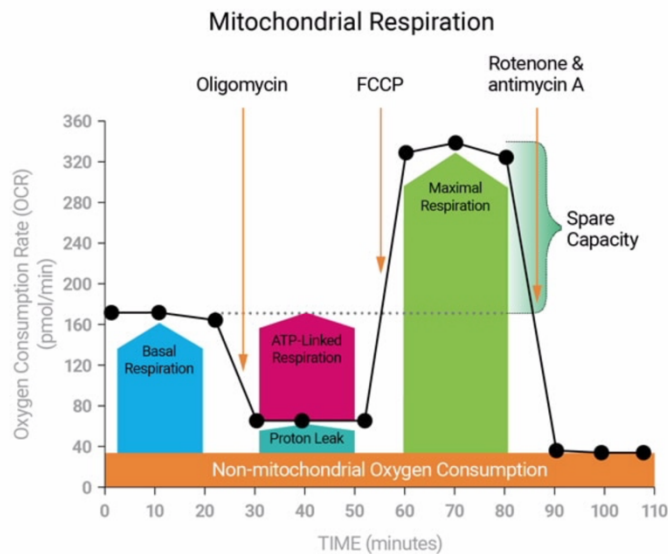


Ilustración 22. Perfil del Seahorse XF Cell Mito Stress Test. Fuente:

<https://www.agilent.com/en/product/cell-analysis/real-time-cell-metabolic-analysis/xf-assay-kits-reagents-cell-assay-media/seahorse-xf-cell-mito-stress-test-kit-740885>

- Día 1:

Las células se siembran en placas de 96 pocillos específicas para *Seahorse*, dejando las cuatro esquinas sólo con medio (serán nuestro blanco). dejamos la placa a T^a ambiente una hora antes de meterla en el incubador, y a última hora de la mañana añadimos medio fresco.

El cartucho que contiene las sondas debe ponerse a hidratar con calibrador, al menos 1 hora antes de realizar el experimento, en una estufa sin CO₂ a 37°C.

El aparato debe encenderse previamente para alcanzar la temperatura óptima.

- Día 2:

Realizamos los tratamientos de interés en la placa de células y 1 hora antes de meterla en el aparato debe estar en una estufa a 37°C sin CO₂, en un medio específico para el *Seahorse* sin rojo fenol ni bicarbonato (*XF DMEM 103575-100 Agilent*, con 2mM de L-glutamina, 10 mM de glucosa y 1mM de sodio piruvato).

Los cambios de medio han de hacerse con mucho cuidado para evitar llevarnos las células y que se sequen los pocillos. Además, debemos asegurarnos de que no quedan restos del medio con rojo fenol, por lo que realizaremos un paso intermedio de lavado con el medio *Seahorse*.

Durante la hora de la placa en la estufa procedemos a preparar y cargar las sondas del kit que vayamos a usar en el cartucho. Las sondas, en el caso del *kit Seahorse XF Cell*

Mito Stress Test son Oligomicina, p-(trifluoro-metoxi)fenilhidrazona de carbonilcianuro (FCCC) y Rotenona + Antimicina, vienen liofilizadas, por lo que deben ser rehidratadas en medio Seahorse y diluidas a las concentraciones de uso de cada una.

Cada una de las sondas se añadirá a un puerto del cartucho y dependiendo del puerto, el volumen que se añade variará.

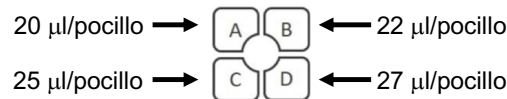


Ilustración 23. Representación de un pocillo del cartucho, con los cuatro puertos que presenta y los volúmenes que se añaden a cada uno de ellos.

Al terminar, se introduce el cartucho en el aparato donde se va a calibrar. Posteriormente insertamos la placa de las células y comenzará un proceso de equilibrado y, finalmente, la inyección de las diferentes sondas y las medidas de las mismas. Una vez finalizado debemos fijar las células con PFA al 4%, con o sin Ho para su posterior normalización mediante el conteo de núcleos.

11. Análisis de senescencia

Para los experimentos de análisis de senescencia se utilizaron células que son consideradas senescentes al haber sido mantenidas en cultivo bastante tiempo y a las que se les han realizado un gran número de pases o bien células a las que se les ha inducido la senescencia utilizando diferentes inductores como doxorubicin (Doxo) o palbociclib (Palbo).

11.1. Análisis senomórficos

Los análisis senomórficos consisten en la inducción de un fenotipo senescente utilizando diferentes compuestos farmacológicos, Doxo o Palbo por ejemplo, en células jóvenes. Esta inducción de senescencia va a llevar aparejado una serie de cambios en la morfología, aparición de vacuolas de gran tamaño con mucho contenido vacuolar o producción de una serie de factores asociados a senescencia (SASP). Todos estos factores pueden ser medidos con diferentes técnicas.

Para llevarlos a cabo se sembraron las células, SK-Mel-103 o cultivos primarios de fibroblastos de oreja de ratón, en placas de 6 pocillos, utilizando una placa por condición ya que tres pocillos van a ser destinados a la extracción de ARNm, dos pocillos se

utilizarán para extraer proteínas que se analizarán por *western blotting* y un pocillo será utilizado para tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal). El día siguiente a la siembra de las células, se añade en el medio el inductor de senescencia, Doxo (50 nM) o Palbo (50 μ M). Las células son mantenidas a 37°C en el incubador. Un par de días antes de recoger las células debemos sembrar células que van a ser nuestros controles no senescentes. El día 5 todas las placas, tanto senescentes como no senescentes, serán tratadas con QBA (50 μ M). 24 horas después se recogen todas las placas, cada pocillo de la forma que corresponda según su procesamiento posterior.

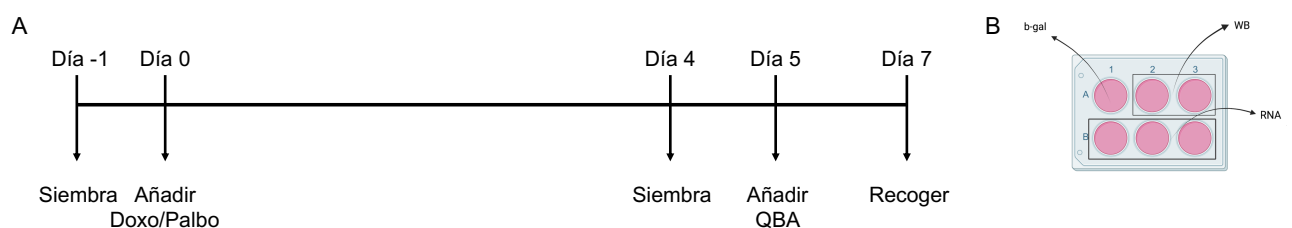


Ilustración 24. A) Cronograma de realización del análisis senomórfico. B) Distribución de una placa de 6 pocillos para el análisis senomórfico. Elaboración propia con *BioRender*.

11.2. Análisis de senopreención

Los análisis de senopreención consisten en un tratamiento conjunto de las sustancias inductoras de senescencia con sustancias que protejan o eviten la senescencia.

Para llevarlos a cabo la actuación es más o menos similar a la anterior, con la salvedad de que el día después de haber sembrado las células, estas son tratadas a la vez con el inductor de senescencia y nuestro compuesto. A los cinco días se sembrarían las placas control, no senescentes, las cuales solo se van a tratar con QBA y al final de la semana se recogen todos los tratamientos. En este caso solo sembramos media placa por condición ya que decidimos no hacer extracción de ARN para PCR.

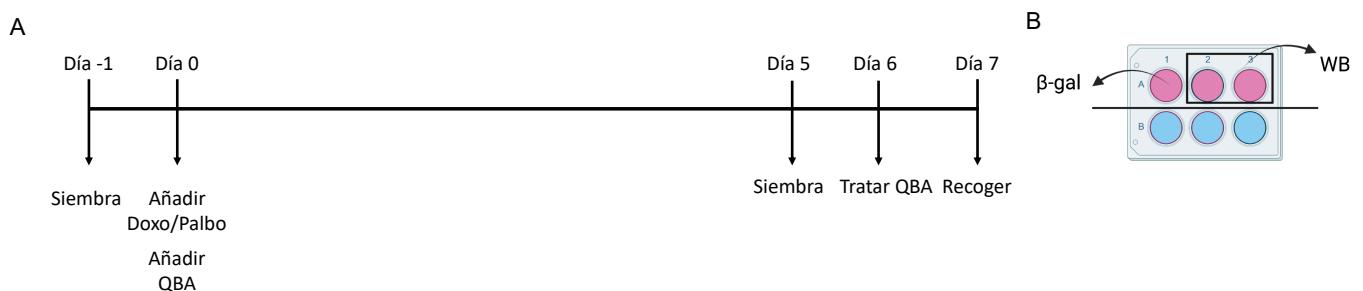


Ilustración 25. A) Cronograma de realización del análisis de senopreención. B) Distribución de una placa de 6 pocillos para el análisis de senopreención. Elaboración propia con *BioRender*.

11.3. Tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia

La tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) es el marcador más aceptado para la identificación de senescencia en los cultivos celulares. Durante la senescencia se produce un aumento en el tamaño de las células y en el tamaño y número de lisosomas. Esto implica un aumento de la enzima β -galactosidasa. Cuando las células entran en contacto con un compuesto X-gal a un pH de 6, se forma un precipitado azul, que es el que nos va a indicar la cantidad de senescencia. Para realizarlo hay que preparar una mezcla de solución de tinción con X-gal (RPI B71800-1.0) diluido en N,N-dimetilformamida (DMF) (*ThermoFisher* 15562393). Se pesa el X-gal y se diluye en DMF. La mezcla hay que realizarla en la campana de gases y mantenerlo tapado. Luego debemos ajustar el pH a 6.

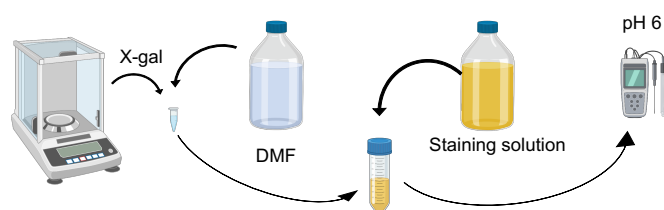


Ilustración 26. Esquema de la preparación de la solución de tinción con X-gal/DMF. Elaboración propia con *BioRender*.

Cogemos las placas con los pocillos a teñir, aspiramos el medio y lavamos con PBS 1X. Añadimos una solución de fijación a cada pocillo y dejamos incubando a T^a ambiente durante 10 minutos. Lavamos bien varias veces con PBS 1X y añadimos 2 mL/pocillo de la mezcla de solución de tinción con X-gal/DMF. Dejamos incubando las placas toda la noche en una estufa a 37°C en oscuridad.

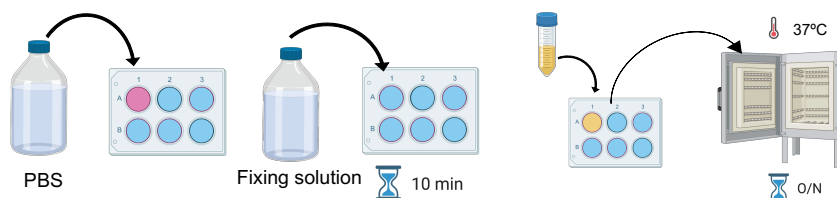


Ilustración 27. Esquema de la preparación de las placas para la tinción con X-gal/DMF. Elaboración propia con *BioRender*.

Al día siguiente se retira todo el volumen, se hacen varios lavados con PBS 1X y se conservan las placas con PBS 1X a 4°C hasta que se puedan realizar fotos de la tinción.

12. Análisis de proteostasis

Para llevar a cabo estos ensayos vamos a emplear la línea celular U2OS-Lu-Fluc-EGFP que expresa de manera estable la proteína Lu-Fluc unida a EGFP, lo que nos va a permitir medir o visualizar la recuperación de la función celular tras la inducción de un daño por choque térmico. Estas células presentan una fluorescencia basal que pierden cuando son sometidas a un choque térmico. Al tratar las células con un inductor de autofagia y medir su fluorescencia, esperamos observar una recuperación de la misma.

Para llevarlo a cabo sembramos dos placas de 96 pocillos blancas y con la base de cristal (*ThermoFisher* 10067581) con las células U2OS-Lu-Fluc-EGFP. Al día siguiente tratamos ambas placas con las mismas condiciones, por columnas. 24 horas después incubamos una de las dos placas durante 30 minutos a 43°C, dándole un choque térmico. La otra placa será control sin choque térmico y se mantendrá durante ese tiempo en condiciones normales, a 37°C. Pasado el tiempo usamos el kit *Steady Glo* (*Promega* E2510) y añadimos, en la mitad superior de ambas placas, *Steady-glow luciferase* y en la mitad inferior *Cell tite glow substrate*. El primer reactivo va a permitir medir la actividad luciferasa, es decir, la luminiscencia producida por las células y el segundo nos va a permitir conocer la viabilidad celular.

Dejamos incubando 15 minutos a Tª ambiente, en agitación y luego medimos la luminiscencia de ambas placas. Las placas deben estar siempre cubiertas para evitar perder la luminiscencia.

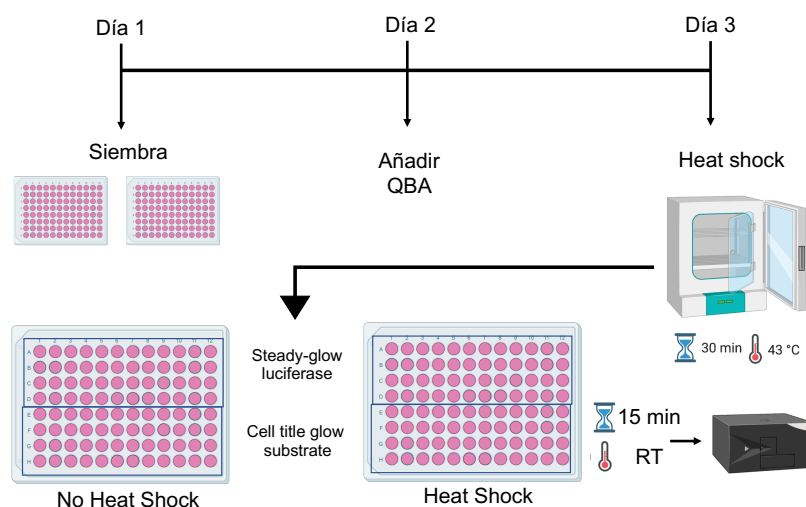


Ilustración 28. Cronograma de realización del análisis de proteostasis. Elaboración propia con *BioRender*.

13. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *GraphPad Prims Versión 9.0.1*. Todos los tratamientos experimentales que incluyen estadística fueron realizados al menos tres veces. Los datos se presentan como la media de los experimentos y su correspondiente desviación o error estándar.

Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$), se utilizó la prueba de la *T de Student*, cuando los datos se distribuyen de manera normal. Para comparaciones entre más de dos grupos, los datos que se distribuyen normalmente se analizaron mediante la prueba de *ANOVA* seguida de las pruebas *post hoc* de *Tukey*. El nivel de significancia mínimo aceptado ha sido $p < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1.QBA induce autofagia *in vitro*

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio (97) se demostró la inducción de autofagia mediada por QBA. Esta tesis doctoral se inició con el estudio de diferentes proteínas implicadas en el proceso de autofagia y su modulación por QBA. Así como otras vías de señalización íntimamente relacionadas con ella.

Para ello, lo primero que se hizo fue estudiar su efecto en una línea de neuroblastoma humano, SH-SY5Y. Primero se realizaron tratamientos a tiempos cortos, de 2 y 4 horas y una concentración fija de 50 μ M, (Figura 1.1) y, posteriormente, se realizaron tratamientos a las concentraciones de 25 y 50 μ M y un tiempo fijo de 4 horas (Figura 1.2). En ambos casos se utilizó un medio bajo en nutrientes (EBSS) como control positivo de autofagia.

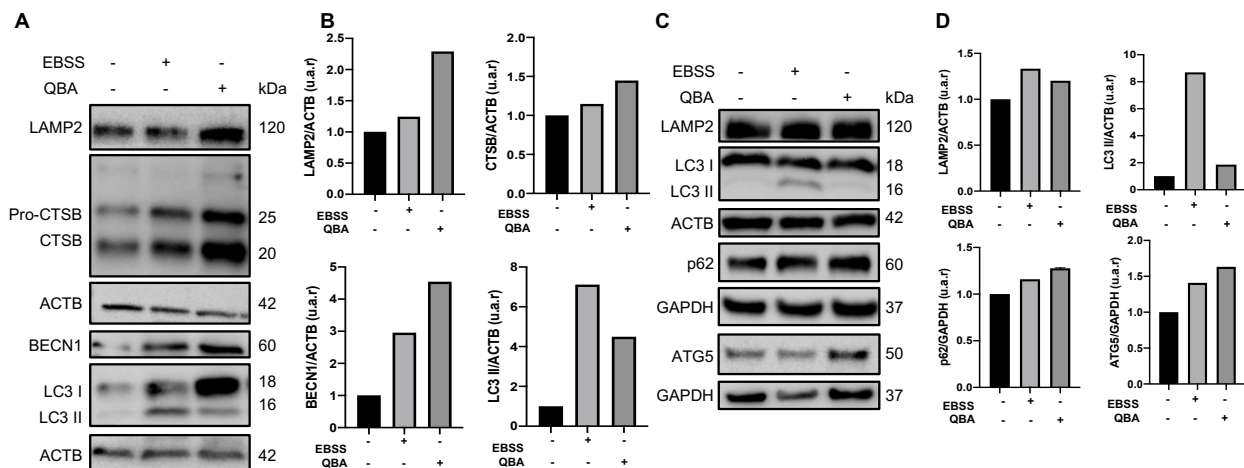


Figura 1. 1.Análisis de los niveles de proteínas de autofagia tras el tratamiento con QBA durante 2 y 4 horas, *in vitro*. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 120.000 células/ml. Pasadas 24 horas desde la siembra, las células fueron tratadas con medio normal (Co), con un medio bajo en nutrientes (EBSS) o con 50 μ M de QBA durante 2 horas (A) o 4 horas (C). B,D) Los niveles de distintas proteínas autofagia (BECN1, LC3, p62 o ATG5) o proteínas lisosomales (LAMP2 o CTSE) fueron determinados por *western blotting* utilizando ACTB o GAPDH como controles de carga. Se representan en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

En cada uno de los experimentos se midieron los niveles de diferentes proteínas lisosomales, como las proteínas asociadas a la membrana lisosomal 1 y 2 (LAMP1 y 2) y la isoforma madura de la Catepsina B (CTSB) así como proteínas implicadas en el proceso de autofagia como la SIRT1, ATG5, BECN1, p62 o LC3 II.

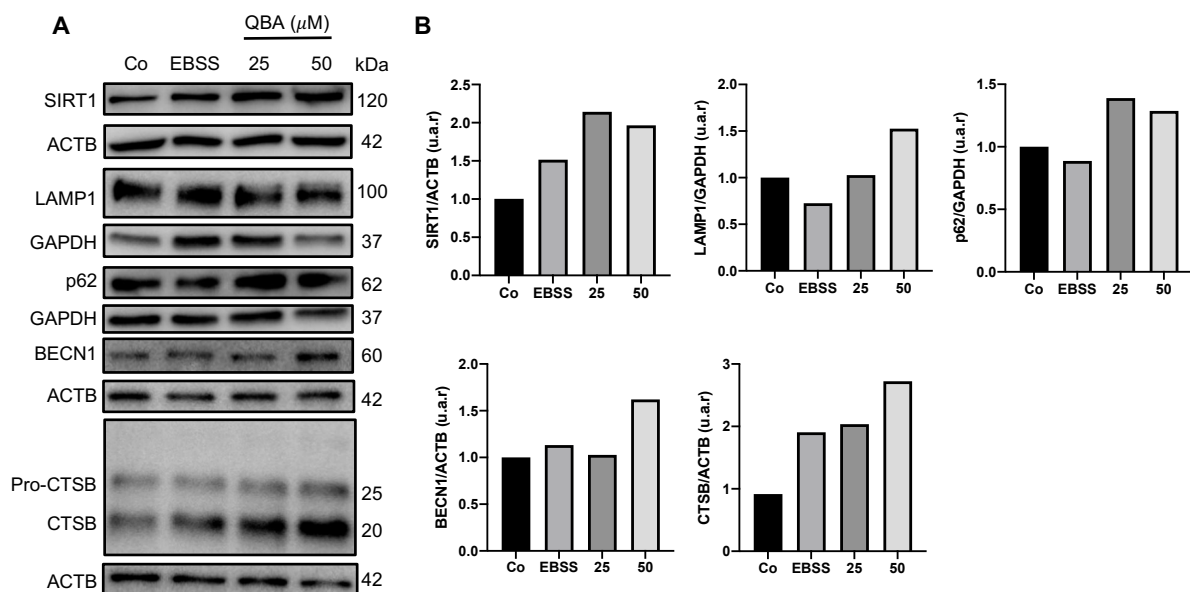


Figura 1. 2. Análisis de los niveles de proteínas de autofagia tras el tratamiento con QBA a 25 y 50 μM , in vitro. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 120.000 células/ml. Pasadas 24 horas desde la siembra, las células fueron tratadas con medio normal (Co), con un medio bajo en nutrientes (EBSS) o con dos concentraciones de QBA, 25 y 50 μM durante 4 horas A) Los niveles de distintas proteínas autofagia (SIRT1, p62 o BECN1) o proteínas lisosomales (LAMP1 o CTSB) fueron determinados por *western blotting* utilizando ACTB o GAPDH como controles de carga. B) Análisis densitométrico de las distintas proteínas estudiadas, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Podemos observar un aumento de los niveles de todas las proteínas estudiadas, respecto al control sin tratar, tras la inducción de autofagia al someter a las células a una privación de nutrientes. Y cómo el tratamiento con QBA, independientemente del tiempo (figura 1.1) y de la concentración (figura 1.2) utilizada, provoca un efecto similar al del EBSS, llegando a ser incluso superior para algunas proteínas.

En la misma línea celular también se realizó un ensayo de flujo autofágico, utilizando QBA en ausencia o presencia del inhibidor de autofagia Bafilomicina A1 (BAF.A1) (Figura 1.3). Podemos observar cómo se produce un ligero aumento de los niveles de p62 y de la lipidación de LC3 tras el tratamiento con QBA y cómo este aumento es más pronunciado al combinar QBA con BAF.A1, siendo más acentuado en los niveles de LC3 II.

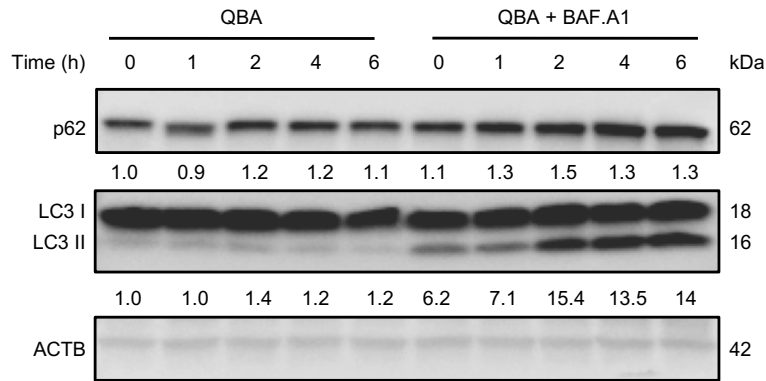


Figura 1. 3. Determinación del flujo autofágico inducido por QBA, in vitro. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 120.000 células/ml. Pasadas 24 horas desde la siembra, las células fueron tratadas con medio normal (Co), con un medio bajo en nutrientes (EBSS) o con QBA a 50 μ M en ausencia o presencia de Bafilomicina A1 (BAF.A1) 100 nM durante 1, 2, 4 y 6 horas. Los niveles de p62 y LC3 fueron determinados por *western blotting* utilizando ACTB como controles de carga. Se presentan los valores de la densitometría de, al menos, tres experimentos \pm su desviación estándar.

También se llevó a cabo la técnica de inmunofluorescencia utilizando células de neuroglioma humano, H4, que expresan de manera estable la proteína LC3 unida a un marcador verde fluorescente (GFP). En la figura 1.4 se analizó la distribución de la fluorescencia mediante la técnica de microscopía confocal, observando una inducción de autofagia por QBA al aumentar el número de vacuolas p62/LC3 positivas respecto al control sin tratar. Resultado complementario a los obtenidos por *western blotting*, donde observábamos un aumento del número de lisosomas y de proteínas de autofagia tras tratar con QBA.

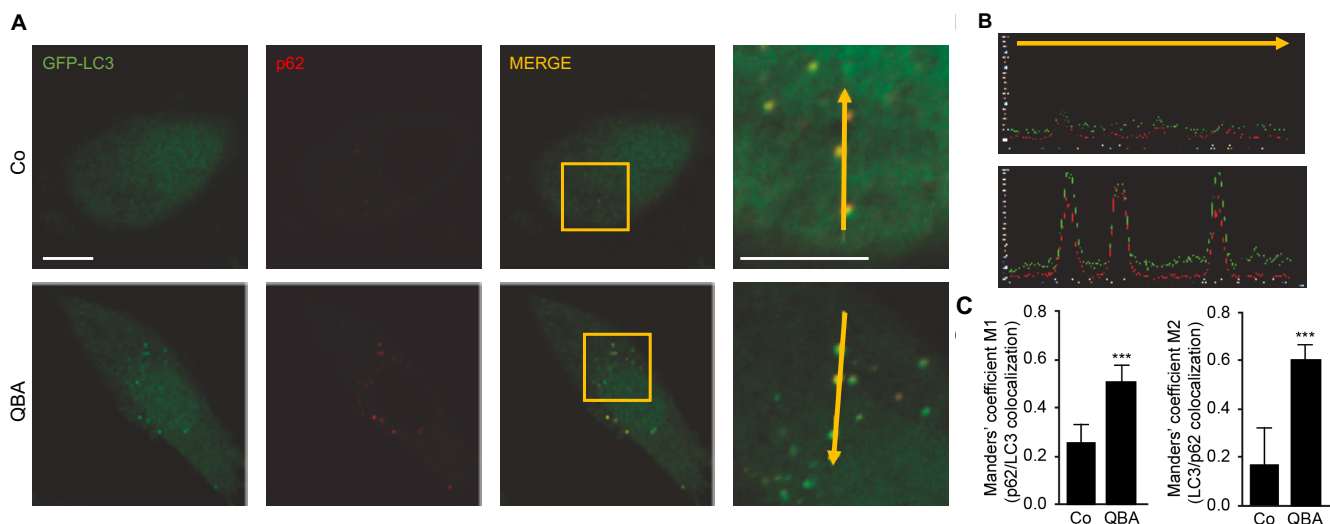


Figura 1. 4. Determinación de la colocalización de p62 y LC3 tras la inducción de autofagia mediada por QBA. Las células H4-GFP-LC3 se sembraron a una densidad de 80.000 células/ml y se trataron con medio normal (Co) o QBA a 50 μ M durante 4 horas. Posteriormente se realizó una IF empleando los anticuerpos p62 (rojo) y LC3 (verde) y se estudió la colocalización de ambas proteínas mediante un microscopio confocal. A) Imágenes representativas de la colocalización de ambas proteínas tras el tratamiento con QBA. La barra de escala representa 10 μ m. B) Gráficas representativas de la distribución de la fluorescencia C) Cuantificación del coeficiente de colocalización de p62 con LC3 (M1) y LC3 con p62 (M2) (***) $p < 0.001$ frente al control no tratado).

Finalmente, y para terminar de confirmar la implicación de QBA en la inducción de autofagia, determinamos la degradación de proteínas de vida media larga mediante un ensayo de *pulse-chase* en las células SH-SY5Y y SH-SY5Y defectivas para el gen ATG5 (Figura 1.5). Claramente se produjo un aumento de la degradación de proteínas de vida media larga marcadas tras el tratamiento con QBA y superior al que ocurre tras la inducción de autofagia, EBSS. Además, en las células sin ATG5 se produce una disminución en la degradación, confirmando que esta ocurre vía autofagia.

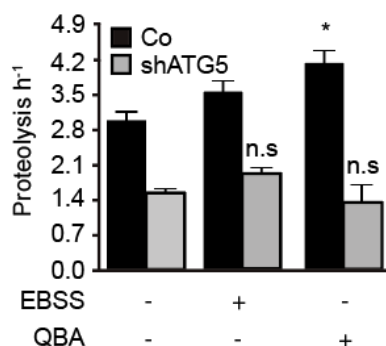


Figura 1. 5. Degradación de proteínas de vida media larga por QBA. Las células SH-SY5Y y SH-SY5Y defectivas para ATG5 fueron tratadas con medio normal (Co), con medio bajo en nutrientes (EBSS) o con 50 μ M de QBA durante 4 horas. La degradación de proteínas de vida media larga se determinó utilizando valina radiactiva (* $p < 0.05$ respecto al control sin tratar). n.s indica no significancia.

Estos resultados nos confirman la inducción de autofagia por parte de QBA y su implicación en la biogénesis lisosomal.

2.QBA induce autofagia *in vivo*

Una vez confirmada la inducción de autofagia mediada por QBA en varias líneas celulares *in vitro*, quisimos averiguar si esa inducción ocurría también *in vivo*. Para ello se procedió a realizar un estudio de flujo autofágico en ratones ICR a los cuales se les administró intraperitonealmente QBA (10 mg/kg), un inhibidor de proteasas que impide la degradación lisosomal, leupeptina (15 mg/kg), los vehículos en los que van disueltos como control o la combinación de ambas sustancias, durante 4 horas. Se analizaron los extractos proteicos del corazón, hígado y cerebro para su posterior estudio por *western blotting*. Al analizarlos (Figura 2.1.) podemos ver como en el corazón (A) se produce un ligero aumento de los niveles de lipidación de LC3 tras el tratamiento con QBA sin llegar este a ser significativo. Por otro lado, p62 si que aumenta de forma significativa tras el tratamiento combinado de QBA y leupeptina. Un resultado similar se observa en hígado (C), QBA induce un ligero descenso en los niveles de p62 con respecto al grupo control que aumenta de manera significativa tras el tratamiento con leupeptina. En cuanto a LC3 II no se aprecian cambios significativos tras el tratamiento con QBA. Sin embargo, si que se produce un incremento significativo de los niveles de lipidación de LC3 con QBA y leupeptina combinados.

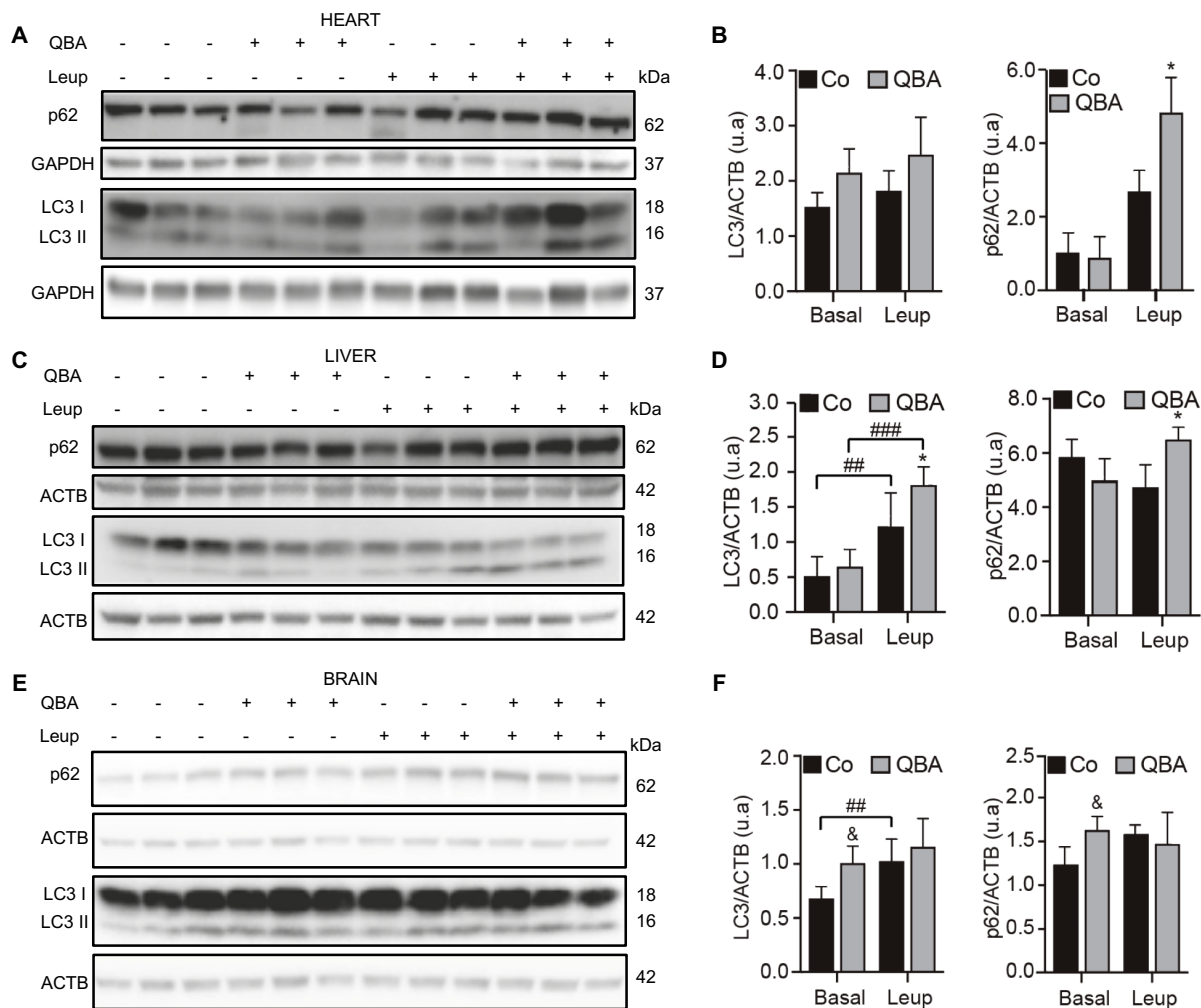


Figura 2. 1.Inducción de autofagia por QBA, in vivo, a tiempos cortos. Los ratones ICR fueron inyectados intraperitonealmente con el vehículo o con QBA (10 mg/kg). 2 horas después recibieron una inyección de vehículo o leupeptina (Leup) (15 mg/kg). Tras 2 horas, los ratones fueron sacrificados. Se muestran *blots* representativos de las proteínas LC3 y p62 analizadas en corazón (A), hígado (C) y cerebro (E), utilizando GAPDH y ACTB como controles de carga. B,D,F) Densitometría de las medias \pm la desviación estándar de, al menos, 3 ratones para corazón e hígado y, al menos, 5 ratones para el cerebro, representados en unidades arbitrarias (u.a.). (* $p < 0.05$ respecto a leupeptina; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$ respecto al control; & $p < 0.05$ respecto al control).

Finalmente, en el cerebro (E) podemos observar cómo QBA si induce un aumento de LC3 II y p62 con respecto al grupo control, pero no se observan cambios significativos tras la administración de la leupeptina. Estos resultados parecen indicar que QBA aumenta el flujo autofágico en corazón e hígado, pero este efecto no se aprecia de manera tan clara en cerebro.

Estos resultados se obtuvieron al realizar un tratamiento agudo a tiempo corto administrando el compuesto por vía intraperitoneal. A continuación, evaluamos si estos efectos observados serían los mismos si el tratamiento con QBA se administraba de

forma oral, en el agua de bebida, y si su administración se producía por un periodo de tiempo más largo. Para ello y durante 6 semanas, ratones ICR de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) administrado en el agua de bebida. Se analizaron proteínas implicadas en el proceso de autofagia en el cerebro (Figura 2.2.) y se vio como aumentan de manera significativa los niveles de SIRT1, TFEB, FOXO3 y PGC1 α y muy cerca de significancia BECN1.

Al contrario de lo que ocurría en el cerebro de los ratones ICR tras el tratamiento mediante inyección intraperitoneal, aquí si que se ven cambios en los niveles de las proteínas analizadas.

Estos resultados indican que QBA es capaz de activar autofagia también *in vivo*, no solo mediante inyección intraperitoneal sino administrado en el agua de bebida, por lo que parece ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al cerebro donde produce cambios.

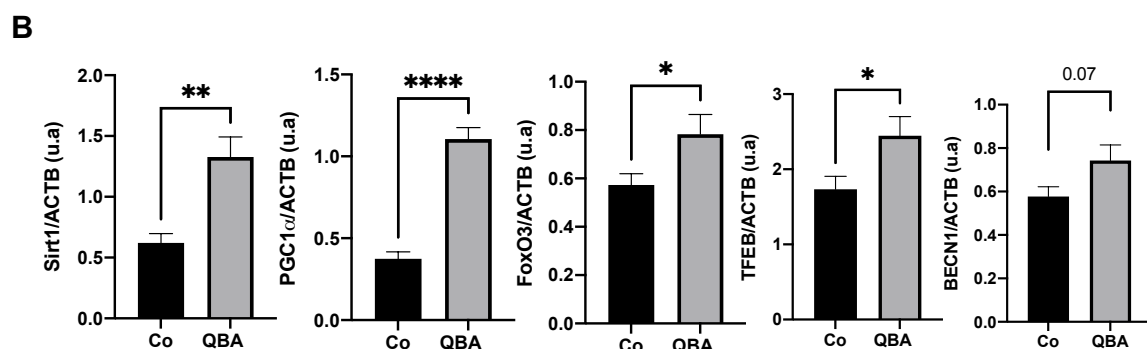
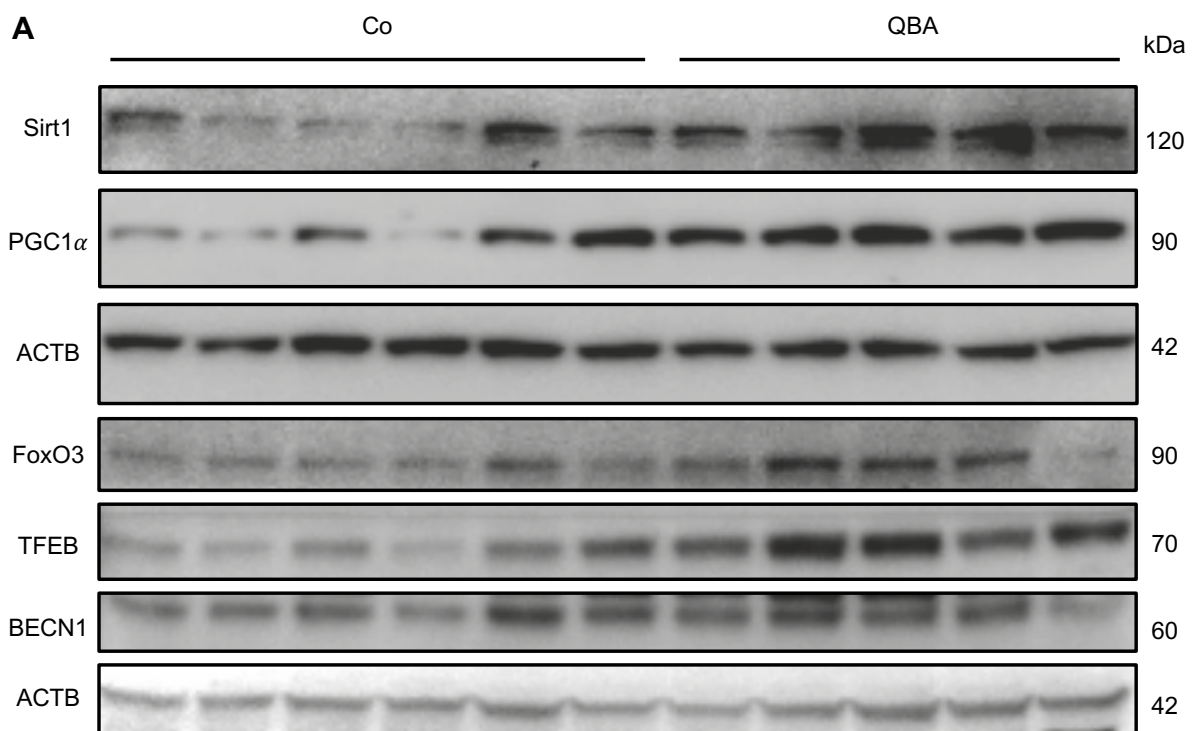


Figura 2. 2.Inducción de autofagia por QBA, in vivo, a tiempos largos. Los ratones ICR de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo, administrado en el agua de bebida durante 6 semanas. El cerebro fue extraído, lisado y analizado por *western blotting*. A) Se muestran *blots* representativos de las proteínas SIRT1, PGC1 α , FoxO3, TFEB y BECN1. ACTB fue utilizada como control de carga. B) Análisis densitométrico de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 5 ratones, representados en unidades arbitrarias (u.a.). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$ respecto al grupo control).

3.Papel de SIRT1 en la inducción de autofagia por QBA

El mecanismo de acción por el cual QBA ejerce su función es desconocido pero, basándonos en estudios previos y en los resultados obtenidos, creemos que estos ocurren a través de la vía de SIRT1.

Para confirmarlo decidimos llevar a cabo la inhibición de la actividad de SIRT1 mediante su silenciamiento génico utilizando un siRNA específico para *SIRT1* en las células SH-SY5Y.

Como podemos observar en la Figura 3.1. la inhibición génica de Sirt1 disminuyó significativamente los niveles de LC3 II comparándolo con las células control (siUNR), tras el tratamiento con QBA o con HDA, el segundo ácido graso mayoritario de la jalea real después de QBA.

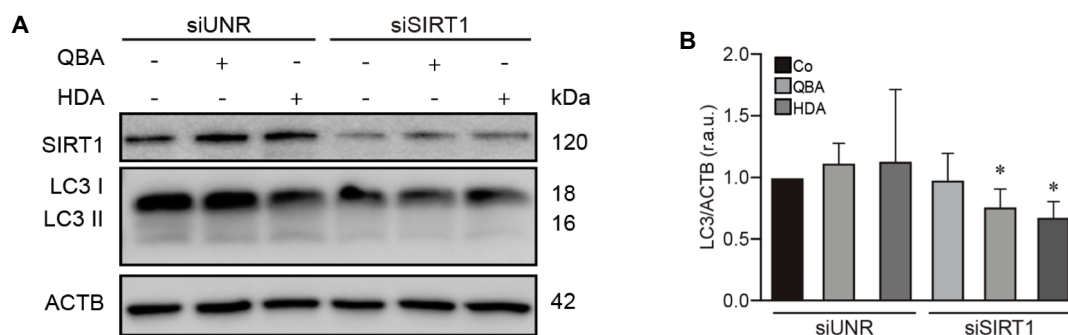


Figura 3. 1.Efecto del silenciamiento génico de SIRT1 sobre la inducción de autofagia por QBA.

A) Las células SH-SY5Y se sembraron a una confluencia de 120.000 células/ml y se transfectaron con un siRNA control (siUNR) o con un siRNA específico para *SIRT1* (siSIRT1) durante 48 horas. Después las células fueron mantenidas en condiciones control o tratadas con QBA o HDA a 50 μ M durante 4 horas. Posteriormente, se procesaron las células para determinar la lipidación de LC3. ACTB fue utilizada como control de carga. B) Densitometría de los valores de LC3 de, al menos, tres experimentos \pm su desviación estándar, representados en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.). (* $p < 0.05$ respecto las células siUNR tratadas con QBA).

En vista de los resultados decidimos probar si ocurría lo mismo al utilizar un inhibidor farmacológico específico de su actividad, EX527 (Figura 3.2.).

Tras el tratamiento con EX527 tanto en las células SH-SY5Y (Figura 3.2.A) como en las células de neuroglioma, H4-GFP-LC3 (Figura 3.2.C), pudimos observar el mismo resultado que observamos con el silenciamiento génico. En ambas líneas se produce una disminución de la lipidación de LC3 en comparación con el control sin tratar, siendo esta disminución significativa en la línea SH-SY5Y, igual que ocurría con el silenciamiento génico.

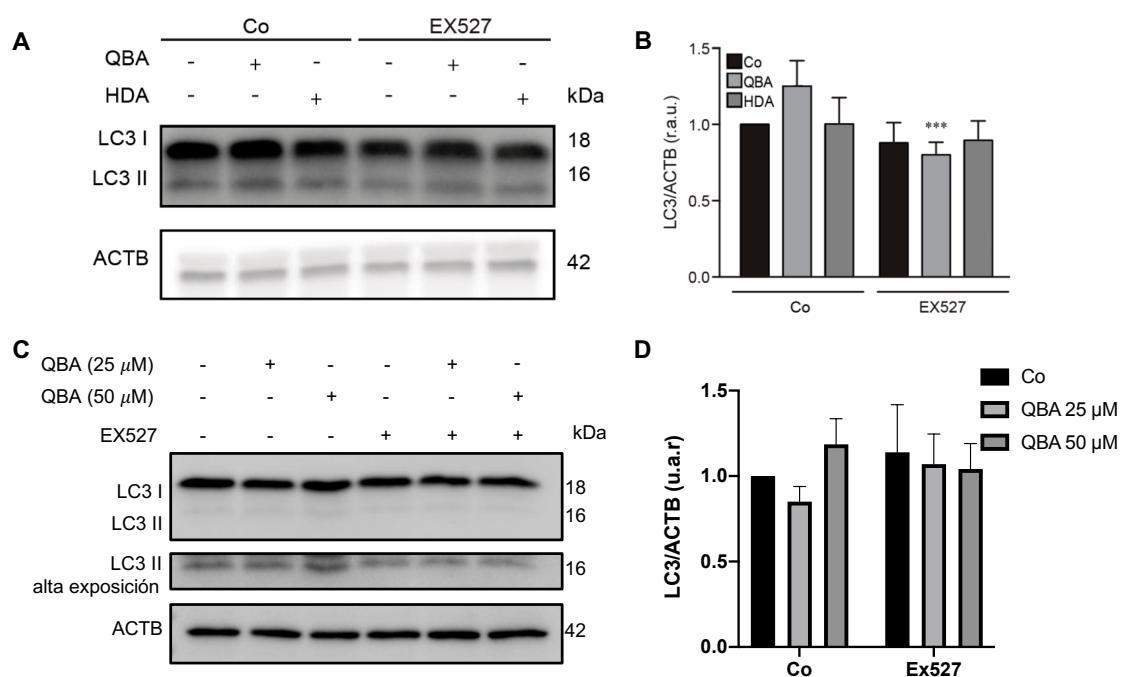


Figura 3. 2. Implicación de SIRT1 en la autofagia inducida por QBA, tras la inhibición de la actividad de SIRT1, en células de neuroblastoma humano. A) Las células SH-SY5Y se sembraron a una confluencia de 120.000 células/ml y fueron mantenidas en condiciones control (Co) o tratadas con 50 μM de QBA o HDA en ausencia o presencia de EX527 2 μM durante 3 horas. C) Las células H4-GFP-LC3 se sembraron a una confluencia de 80.000 células/ml y se mantuvieron en condiciones control (Co) o se trataron con QBA a una concentración de 25 o 50 μM en ausencia o presencia de EX527 2 μM durante 3 horas. Tras el tratamiento las células se procesaron y se determinaron los niveles de lipidación de LC3 utilizando ACTB como control de carga. B, D) Densitometría de los niveles de LC3 de, al menos, tres experimentos ± su desviación estándar (B), representados en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.). (***)p<0.001 respecto las células tratadas con QBA).

Posteriormente quisimos confirmar si la inhibición de la actividad de SIRT1 utilizando EX527 tenía el mismo efecto en células de ratón. Para ello utilizamos la línea de neuroblastoma murino, N2a. En la figura 3.3. podemos apreciar como las células N2a siguen la misma tendencia que las células humanas. Se produce una disminución de los niveles de lipidación de LC3 tras el tratamiento con EX527.

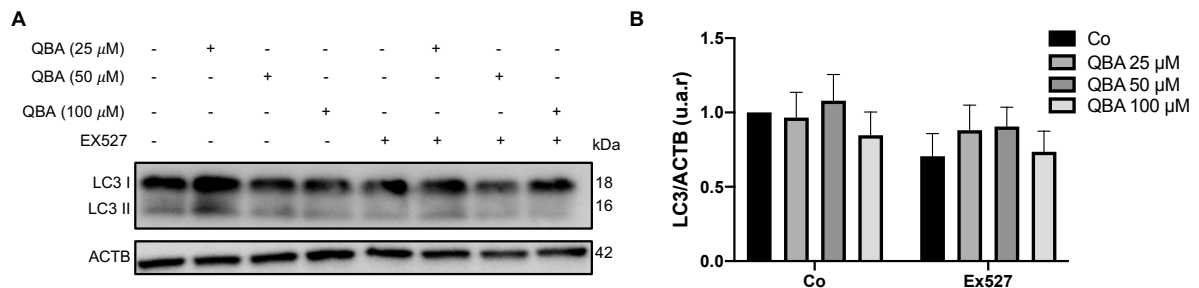


Figura 3.3. Implicación de SIRT1 en la autofagia inducida por QBA, tras la inhibición de la actividad de SIRT1, en células de neuroblastoma murino. A) Las células N2a se sembraron a una confluencia de 100.000 células/ml y fueron mantenidas en condiciones control (Co) o tratadas con distintas concentraciones, 25, 50 o 100 μ M, de QBA en ausencia o presencia de EX527 2 μ M durante 3 horas. Posteriormente se procesaron las células y se cuantificaron los niveles de LC3 utilizando ACTB como control de carga. B) Densitometría de los niveles de LC3, representados en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

A continuación, analizamos en esta misma línea celular, otras proteínas implicadas en el proceso de autofagia estudiadas previamente como PGC1 α , ATG7, LAMP1 o FOXO3.

Podemos distinguir también en ellos la misma tendencia. Al tratar con las distintas concentraciones de QBA se promueve un aumento de los niveles de dichas proteínas, el cual es más o menos pronunciado según la concentración y/o proteína estudiada. Y tras el tratamiento con EX527 se aprecia un claro descenso en los niveles, en todas las concentraciones al compararlos con sus respectivos controles sin EX527 (Figura 3.4.).

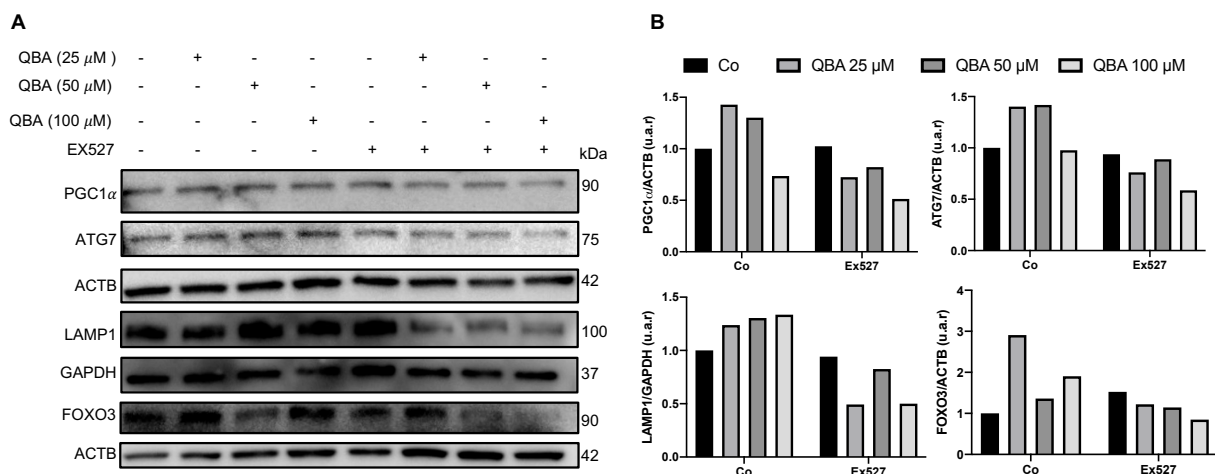


Figura 3. 4. Estudio de la implicación de SIRT1 en la modulación de otras proteínas de autofagia tras el tratamiento con QBA. Las células N2a se sembraron a una confluencia de 100.000 células/ml y fueron mantenidas en condiciones control (Co) o tratadas con distintas concentraciones, 25, 50 o 100 μ M, de QBA en ausencia o presencia de EX527 2 μ M durante 3 horas. A) Posteriormente se procesaron las células y se cuantificaron los niveles de PGC1 α , ATG7, LAMP1 y FOXO3 utilizando ACTB o GAPDH como controles de carga. B) Densitometría de los niveles de PGC1 α , ATG7, LAMP1 y FOXO3, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Todos estos datos parecen indicar que la inducción de autofagia por parte de QBA es dependiente de SIRT1.

4. Modulación de los niveles de otras sirtuinas por QBA

Ya hemos demostrado que SIRT1 puede tener un papel importante en la modulación de la autofagia inducida por QBA. Por lo tanto, nos planteamos estudiar si QBA modulaba los niveles de otras sirtuinas. Mediante *western blotting* observamos que, en las células SH-SY5Y, QBA aumentaba los niveles de SIRT2 y SIRT3 a concentraciones de 10 y 100 μ M. También aumentó los niveles de SIRT6, aunque este aumento es más notorio a la concentración de 50 μ M y en SIRT5 entre 100 y 500 μ M (Figura 4.). Esto parece indicarnos que no solo SIRT1 está modulada por QBA sino también otras sirtuinas.

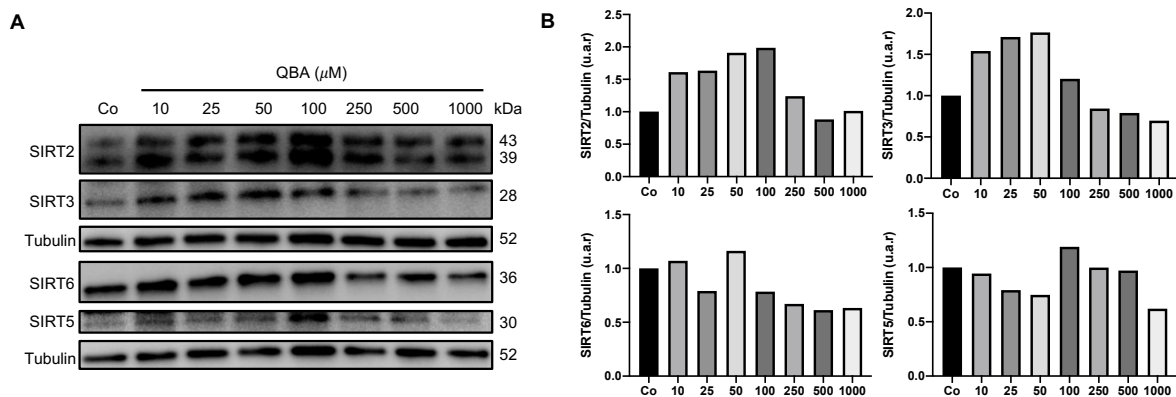


Figura 4. 1. Modulación de los niveles de otras sirtuinas por QBA. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 120.000 células/ml. Pasadas 24 horas desde la siembra, las células fueron tratadas con medio normal (Co), o con concentraciones de 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 μ M de QBA durante 4 horas. A) Los niveles de distintas sirtuinas (SIRT2, SIRT3, SIRT5 y SIRT6) fueron determinados por *western blotting* utilizando tubulina como control de carga. B) Densitometría de los niveles de SIRT2, SIRT3, SIRT5 y SIRT6, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

5. Impacto de QBA sobre la función mitocondrial

Como hemos visto anteriormente, QBA modula los niveles de otras sirtuinas además de SIRT1. Entre las sirtuinas analizadas se encuentran SIRT3 y SIRT5, las cuales son mitocondriales. Esto podría ser un indicador de que QBA tiene algún efecto sobre las mismas. Para estudiar las mitocondrias y su morfología, utilizamos las células SH-SY5Y tratadas con QBA a 50 μ M, en ausencia o presencia del inhibidor de autofagia. Posteriormente se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión. En las imágenes se puede apreciar como las mitocondrias aumentaban de tamaño y cambiaban su morfología tras el tratamiento con QBA, indicando un efecto de QBA en las mismas (Figura 5.1.).

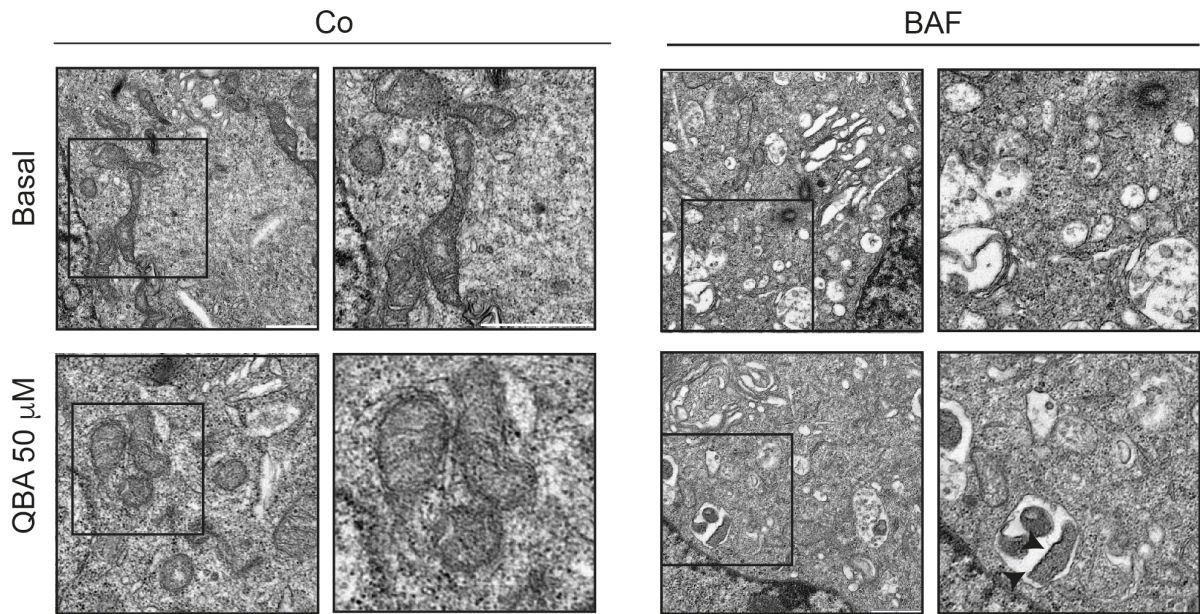


Figura 5. 1. Análisis de la morfología de mitocondrias tras el tratamiento con QBA. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 110.000 células/ml. Pasadas 24 horas desde la siembra, las células fueron tratadas con medio normal (Co) o con 50 μM de QBA en presencia o ausencia de 100 nM de BAF.A1 durante 4 horas. La barra de escala representa 1 μm .

Para seguir con el estudio de la mitocondria después de obtener estos resultados tras el tratamiento con QBA, empleamos la línea celular H4-GFP-LC3, y utilizamos el desacoplante de la cadena transportadora de electrones CCCP (Figura 5.2.).

Al tratar las células con CCCP, se está induciendo una disfunción mitocondrial que promueve una inducción del proceso de mitofagia. De ahí que la proteína PINK1, que se encuentra en la membrana externa mitocondrial, se acumule y aumente sus niveles y que otras proteínas de la membrana externa mitocondrial como TOMM20, MFN1, OPTN, y BNIP3L/NIX, así como TIMM23, PHB1 y Cox IV de la membrana interna mitocondrial estén disminuidas.

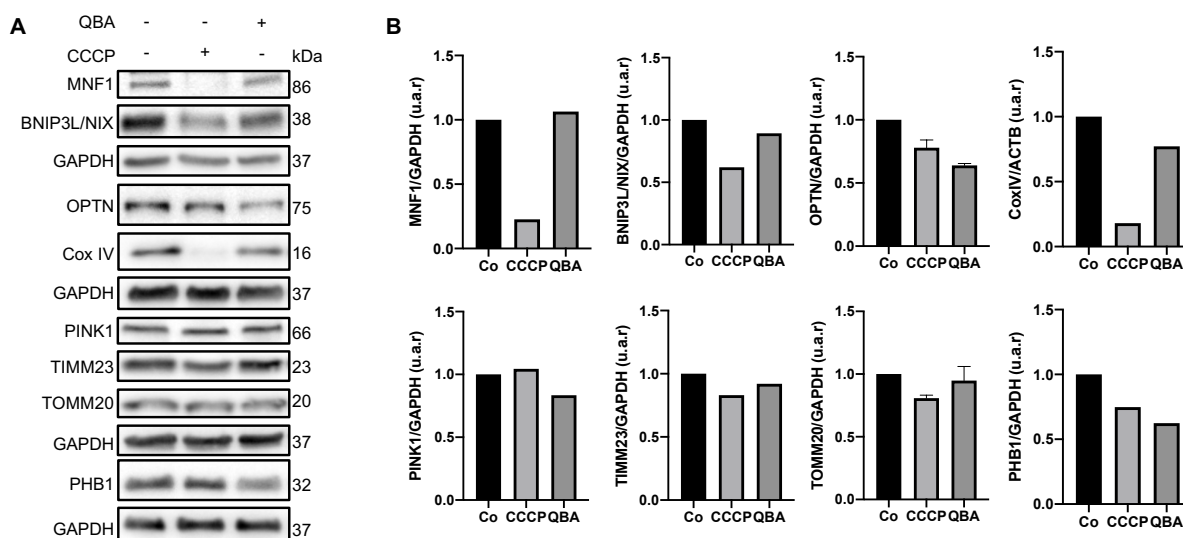


Figura 5. 2. Estudio del efecto de QBA en los niveles de distintas proteínas relacionadas con la mitocondria. Las células H4-GFP-LC3 se siembran a una densidad de 80.000 células/ml. Al día siguiente son tratadas con medio normal (Co), QBA 50 μ M y CCCP 10 μ M durante 4 horas. A) Los niveles de distintas proteínas mitocondriales, MFN1, BNIP3L/NIX, OPTN, Cox IV, PINK1, TIMM23, TOMM20 y PHB1 fueron determinados por *western blotting*. GAPDH fue utilizado como control de carga. B) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Esto puede deberse a la activación de la maquinaria de eliminación de mitocondrias disfuncionales y, por tanto, a una disminución en el número de mitocondrias a medida que se activa el proceso de mitofagia.

Tras el tratamiento con QBA, los niveles de PINK1 disminuyen respecto a CCCP, así como los de OPTN y PHB. Por otro lado, los niveles de MFN1, BNIP3L/NIX, Cox IV, TIMM23 y TOMM20 aumentan.

Realizamos también el análisis del estado del metabolismo mitocondrial en las células SH-SY5Y utilizando para ello un analizador metabólico *Seahorse* y el kit *Cell Mito Stress Test*. Este kit nos va a permitir medir cambios en el consumo de oxígeno y en el pH extracelular, en células vivas.

Las células fueron tratadas con el compuesto de estudio, QBA, en ausencia o presencia del inhibidor de autofagia BAF.A1 y del inhibidor de EX527. Se midieron distintos parámetros, respiración basal y máxima, producción de ATP asociada a la respiración, fuga de protones, capacidad de reserva y consumo de oxígeno no mitocondrial.

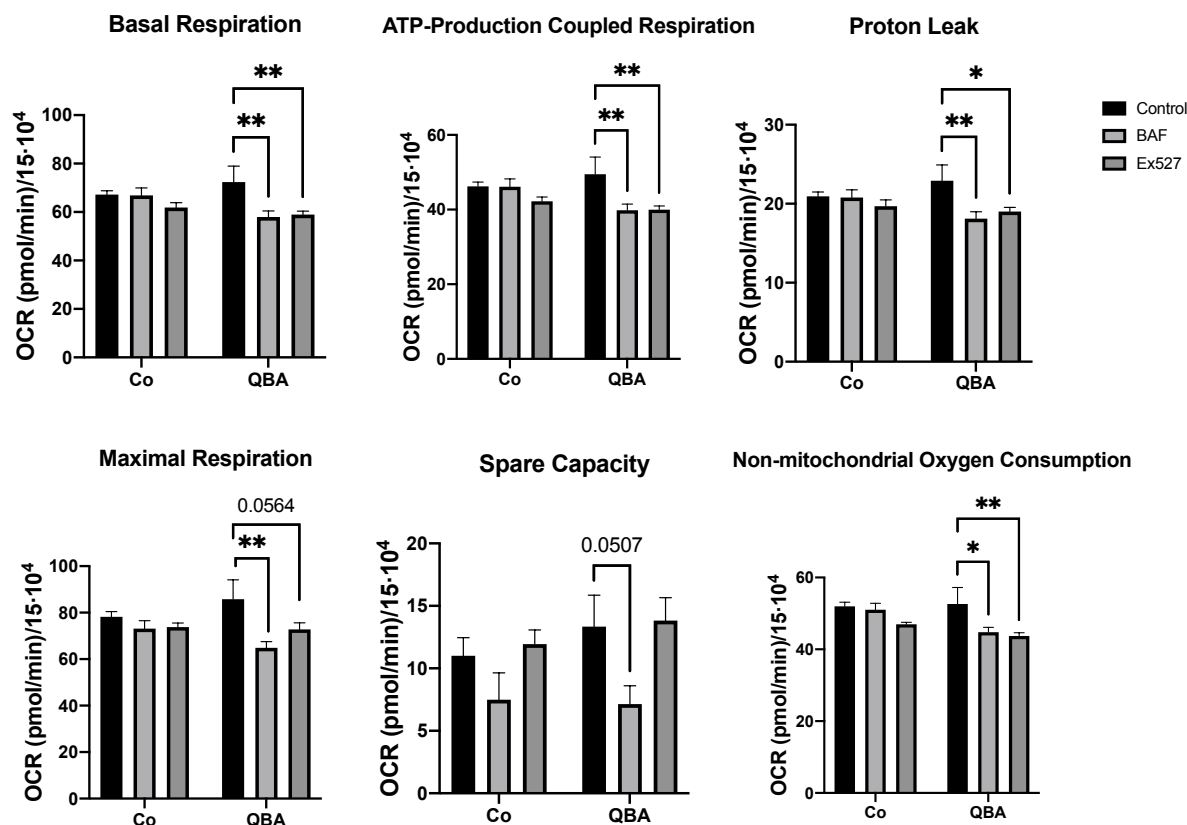


Figura 5.3. Análisis del estado del metabolismo mitocondrial tras el tratamiento con QBA. Las células SH-SY5Y se sembraron a 15.000 células/ml en placas de Seahorse. Al día siguiente las células fueron pretratadas durante 1 hora con BAF.A1 100 nM y EX527 10 mM. Luego se añadió QBA 50 μ M durante 2 horas. Tras el tratamiento se siguió el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Los datos de OCR fueron normalizados respecto al número de células. Los resultados se representan como la media del OCR \pm su error estándar de los valores normalizados (* $p < 0.05$ respecto al control; ** $p < 0.01$ respecto al control).

En la figura 5.3. observamos como QBA basalmente no modula ninguno de los parámetros estudiados respecto al control sin tratar. En cambio, al inhibir la autofagia con BAF A1, QBA reduce significativamente todos los parámetros estudiados. Un efecto similar se observó al inhibir SIRT1 con EX527 salvo en la respiración máxima y SRC donde no se aprecian cambios significativos. Por tanto, la función metabólica se ve alterada con QBA sólo al inhibir la autofagia y la actividad de SIRT1.

Por tanto, desde el punto de vista metabólico, QBA no afecta a la función mitocondrial. Finalmente, para terminar con el estudio de la función mitocondrial por parte de QBA analizamos si modula el proceso de mitofagia. Para ello empleamos una línea celular de SH-SY5Y que expresan de manera estable la construcción *mito-QC* (tándem de

proteínas mCherry-GFP-FIS1). Esta línea nos va a permitir medir el número de mitocondrias ya que, cuando las mitocondrias son englobadas por los fagolisosomas para su eliminación, el pH ácido de los mismos provoca la extinción de la fluorescencia verde, quedando solo la roja. Esta fluorescencia roja que se observa en forma de puntos y su intensidad fue cuantificada. Los resultados (Figura 5.5.) indican que, tras el tratamiento de las células con CCCP se produce un aumento significativo del número de mitocondrias marcadas en rojo respecto al control, indicando una mayor degradación de las mismas. Sin embargo, al tratar con distintas concentraciones de QBA, el número de mitocondrias marcadas en rojo, es decir, que están siendo degradadas por los fagolisosomas, aumentó respecto al control, pero no de forma significativa. Por lo que no podemos afirmar que se esté produciendo una inducción de mitofagia. Teniendo en consideración todos estos resultados, no podemos afirmar que QBA esté induciendo mitofagia pero si podemos decir que parece tener un efecto sobre la mitocondria.

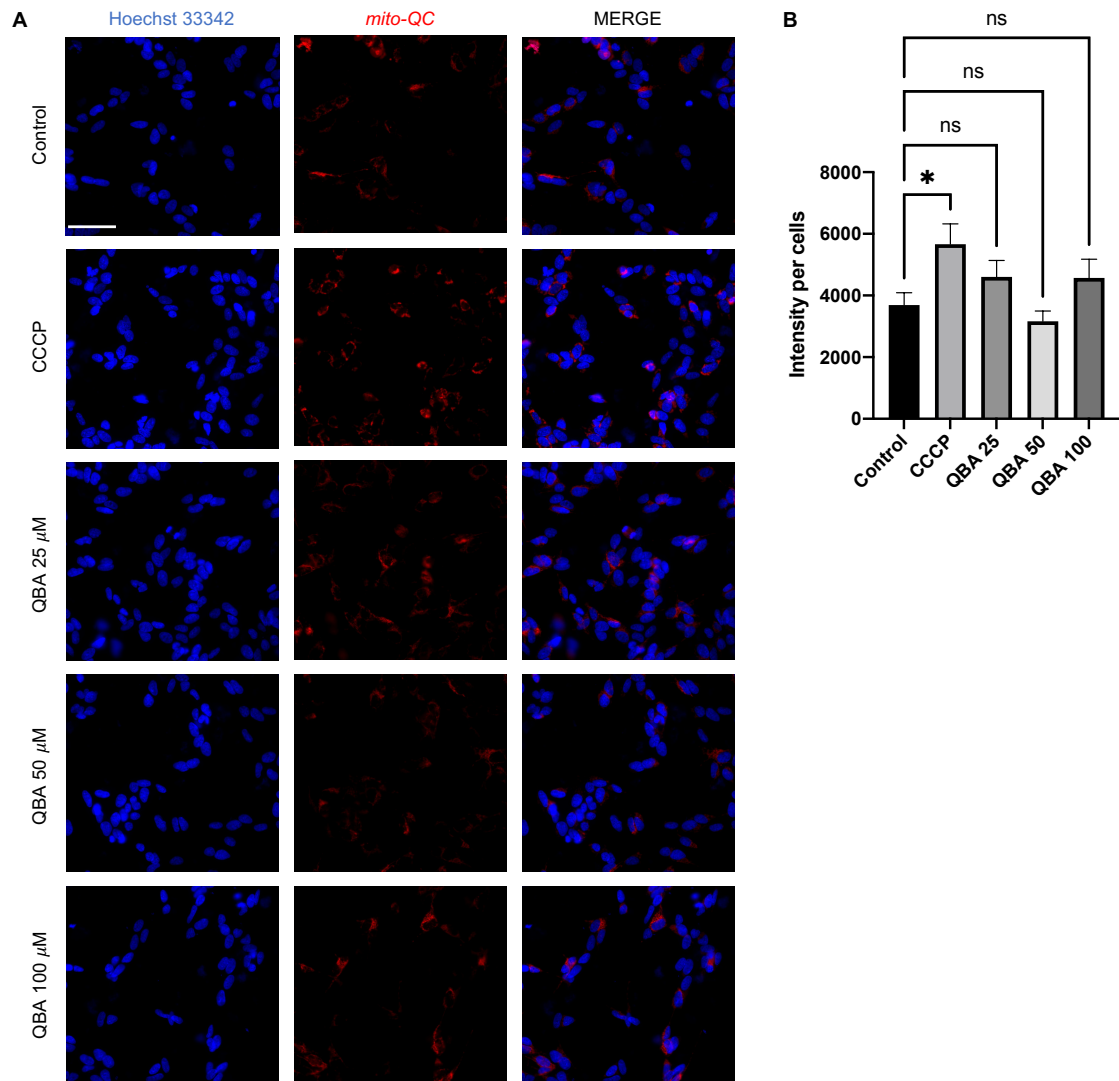


Figura 5. 4. Determinación de la inducción de mitofagia por QBA. Las células SH-SY5Y mito-QC se sembraron a una densidad de 120.000 células/ml. Al día siguiente fueron tratadas con medio normal (Co), QBA 25, 50 y 100 μ M y CCCP 10 μ M durante 4 horas. Posteriormente la placa fue fijada y los núcleos teñidos con Hoechst. A) Se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones. La barra de escala representa 10 μ m B) Cuantificación de la intensidad de mito-QC por célula tras el análisis con el software Fiji. Datos de tres experimentos \pm su error estándar (* $p < 0.05$ respecto al control).

6. QBA reduce la toxicidad inducida por 6-OHDA

Hemos visto que QBA tiene una función inductora de autofagia, tanto *in vitro* como *in vivo* en condiciones normales. Después de esto quisimos analizar su posible función citoprotectora en un modelo de neurodegeneración.

Para ello las células SH-SY5Y se trataron con la neurotoxina 6-OHDA tras realizar un pre-tratamiento con QBA.

Se determinaron los niveles de poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1), un sustrato de la caspasa 3, así como los niveles de la propia caspasa 3. Nuestros resultados muestran cómo tras el tratamiento con 6-OHDA se produce una activación de la apoptosis a través de la activación de PARP y caspasa 3. Estos resultados se ven revertidos tras el pre-tratamiento con QBA, produciéndose una reducción de la activación tanto de PARP como de caspasa 3 (Figura 6.1).

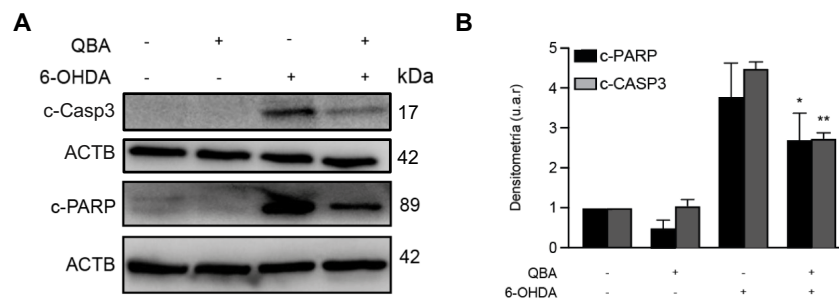


Figura 6. 1. Análisis del efecto de QBA sobre la toxicidad inducida por 6-OHDA, en células de neuroblastoma humano. Las células SH-SY5Y fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 120.000 células/ml. Posteriormente fueron mantenidas con medio normal (Co), o pre-tratadas con 50 μ M de QBA durante 24 horas, seguido de un tratamiento con 35 μ M de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A) Caspasa 3 clivada (c-Casp3) y PARP clivado (c-PARP) se determinaron por *western blotting*, utilizando ACTB como control de carga. B) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.). * $p < 0.05$ en comparación con las células tratadas con 6-OHDA.

Este experimento se realizó con las mismas condiciones en la línea celular N2a, obteniéndose resultados similares (Figura 6.2).

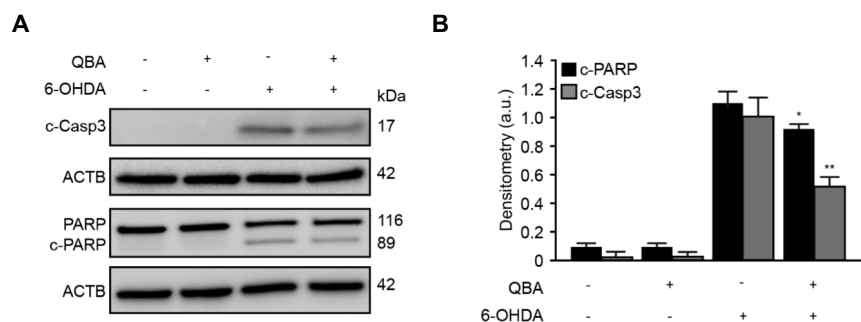


Figura 6. 2. Análisis del efecto de QBA sobre la toxicidad inducida por 6-OHDA, en células de neuroblastoma murino. Las células N2a fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 100.000 células/ml. Posteriormente fueron mantenidas con medio normal (Co), o pre-tratadas con 50 μ M de QBA durante 24 horas, seguido de un tratamiento con 35 μ M de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A) Caspasa 3 clivada (c-Casp3) y PARP clivado (c-PARP) se determinaron por *western blotting*, utilizando ACTB como control de carga. B) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.). * $p < 0.05$ en comparación con las células tratadas con 6-OHDA.

Además, confirmamos estos resultados mediante citometría de flujo estudiando distintos parámetros de apoptosis empleando las sondas Anexina V/IP.

En la figura 6.3. pudimos confirmar no solo que el pre-tratamiento con QBA reducía parcialmente la toxicidad inducida por 6-OHDA, sino que observamos que QBA también disminuía la muerte celular asociada a 6-OHDA. Para confirmar si los efectos observados eran dependientes de autofagia, al tratamiento de las células con QBA en presencia o ausencia de 6-OHDA se le sumó el tratamiento con el inhibidor de autofagia 3-metiladenina (3-MA). En la Figura 6.3 se puede observar cómo el efecto citoprotector de QBA se ve claramente reducido al inhibir la autofagia. Estos resultados los observamos tanto en las células SH-SY5Y (A,B) como en las N2a (C,D).

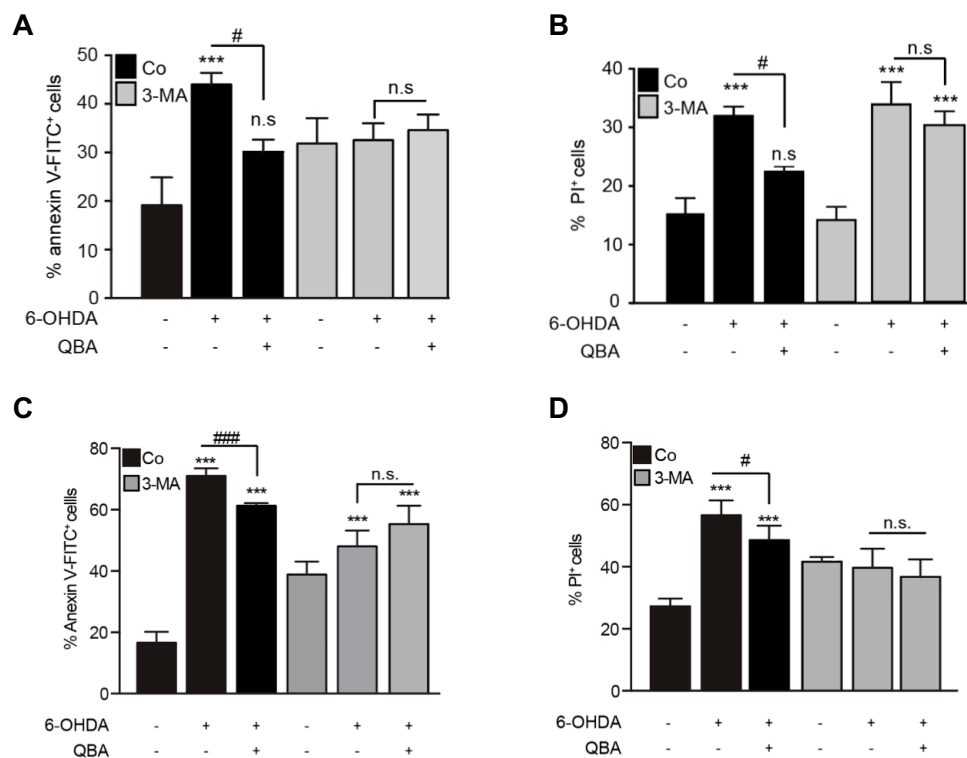


Figura 6. 3.Efecto de QBA en la muerte celular tras el tratamiento con 6-OHDA. Las células SH-SY5Y (A,B) y N2a (C,D) fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 120.000 y 100.000 células/ml respectivamente. Posteriormente fueron mantenidas con medio normal (Co), o pre-tratadas con 50 μ M de QBA durante 24 horas, seguido de un tratamiento con 35 μ M de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) solo o combinado con 10 mM de 3-metiladenina (3-MA) durante 18 horas. Se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células Annexin V-FITC positivas (A,C) y PI positivas (B,D) (n=10.000 eventos). Las columnas indican las medias \pm su desviación estándar. ***p<0.001 en comparación con los grupos no tratados. #p<0.05 y ###p<0.001 comparado con las células tratadas con 6-OHDA. n.s indica no significancia.

Estos resultados muestran un efecto protector de QBA frente al estrés oxidativo mediado por 6-OHDA.

7.Efecto de QBA sobre los agregados y proteostasis *in vitro*

Una de las características fisiopatológicas de las enfermedades neurodegenerativas es la presencia de agregados de proteínas. Tras haber estudiado la activación de la autofagia, la degradación de proteínas de vida media larga así como la función citoprotectora de QBA, el siguiente paso fue comprobar si QBA es capaz de favorecer la degradación de agregados proteicos.

Para ello realizamos una serie de experimentos complementarios a los anteriores.

Utilizamos primero una línea celular SH-SY5Y que expresa bajos niveles de ATG5, es decir, que presentan un bloqueo o disminución de la autofagia, analizamos los niveles de proteínas implicadas en el reconocimiento de sustratos a degradar mediante la vía de autofagia, tras el tratamiento con QBA a 50 μ M (Figura 7.1).

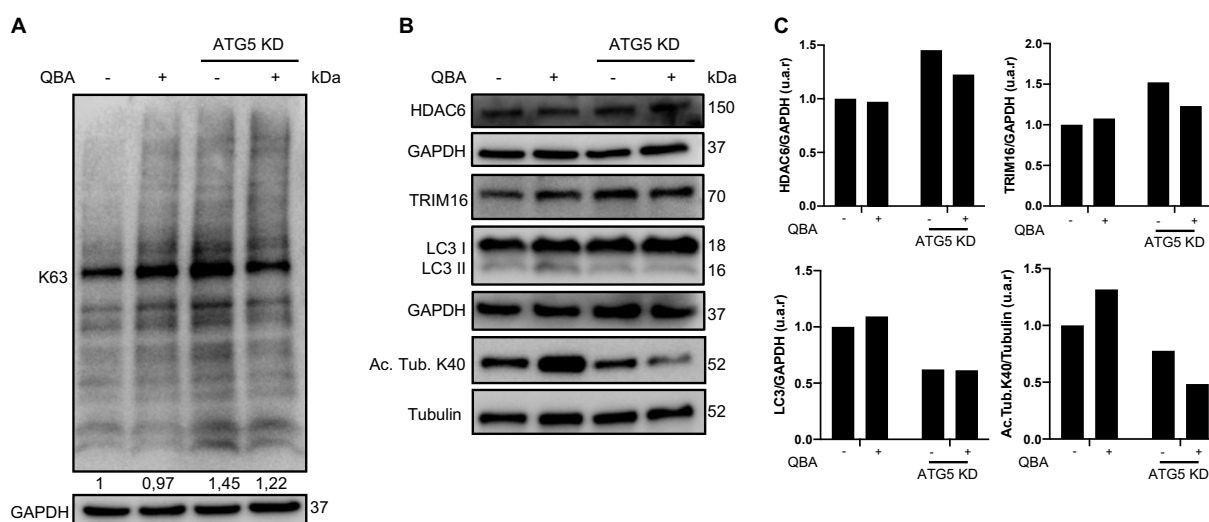


Figura 7. 1.Efecto de QBA sobre los agregados, utilizando una línea celular defectiva en autofagia, *in vitro*. Las células SH-SY5Y y SH-SY5Y ATG5 KD fueron sembradas a una concentración de 100.000 células/ml. Tras 24 horas fueron mantenidas en medio normal (Co) o tratadas con QBA 50 μ M durante 4 horas. A,B) Los niveles ubiquitinación en la lisina 63 (K63), HDAC6, Trim16, LC3 y los niveles de acetilación de α -tubulina en la lisina 40, se determinaron por *western blotting*, utilizando GAPDH como control de carga. C) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas, representados en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Pudimos observar cómo en condiciones normales no se producen diferencias en los niveles de ubiquitinación en la lisina 63 (Figura 7.1.A) y como en las células con la autofagia bloqueada se produce una acumulación de las proteínas ubiquitinadas en la lisina 63, ocurriendo lo mismo tras el tratamiento con QBA.

En cuanto a los niveles de otras proteínas implicadas en el proceso de degradación de agregados, podemos ver como los niveles de lipidación de LC3 aumentan tras el

tratamiento con QBA y como en las células con la autofagia deficiente los niveles disminuyen drásticamente. En el caso de TRIM16 (Figura 7.1.B), proteína encargada de facilitar la interacción entre la maquinaria autofágica con el cargo a degradar, observamos que sus niveles aumentan ligeramente tras el tratamiento con QBA y, cuando la autofagia está bloqueada, se produce una acumulación de dicha proteína, al no poderse degradar los cargos. Para la formación y transporte de agregados hacia el autofagosoma es importante la acetilación de α -tubulina en la lisina 40. En la figura 7.1.B podemos ver como QBA aumenta de manera importante la acetilación de α -tubulina en la lisina 40, y como esta acetilación se ve drásticamente reducida en las células deficientes de autofagia. Finalmente evaluamos si este incremento en los niveles de acetilación de α -tubulina podía ser debido a una menor deacetilación promovida por HDAC6. Los niveles de HDAC6 son ligeramente inferiores tras el tratamiento con QBA en comparación con las células control y estos niveles aumentan en las células deficientes para autofagia.

Posteriormente, decidimos bloquear la autofagia utilizando cloroquina (CQ), un compuesto que acidifica el pH lisosomal e inhibe la fusión del autofagosoma con el lisosoma, en combinación con MG132, un compuesto que inhibe el sistema ubiquitina proteasoma, de manera que se produzca una acumulación de agregados en las células. De esta manera podemos analizar si QBA tiene capacidad para su degradación.

Los agregados proteicos suelen ser difíciles de disgregar y su mayor tamaño impide su separación. Por ese motivo vamos a realizar un lisado diferencial para obtener dos fracciones y no perder información. Al ser dos fracciones diferentes es necesario realizar su análisis utilizando dos técnicas. Por un lado, analizamos la fracción soluble de nuestro lisado celular por *western blotting* y por otro, la fracción insoluble de la misma mediante la técnica de análisis de FTA. Al combinar ambos resultados podemos obtener una idea más clara de lo que está sucediendo realmente con los agregados proteicos.

En la figura 7.2. podemos observar cómo al bloquear el proteasoma con el tratamiento de MG132 se produce un aumento de LC3. Al combinar CQ y MG132, bloqueando ambos sistemas de degradación, apreciamos un incremento, el cual es todavía mayor y si le sumamos QBA.

En el caso de p62, el bloqueo de la autofagia con CQ y del SUP con MG132 desemboca en un aumento de los niveles de p62 en la fracción insoluble. El tratamiento con QBA parece disminuir los niveles de p62 en ambas fracciones, siendo más evidente en la

fracción soluble.

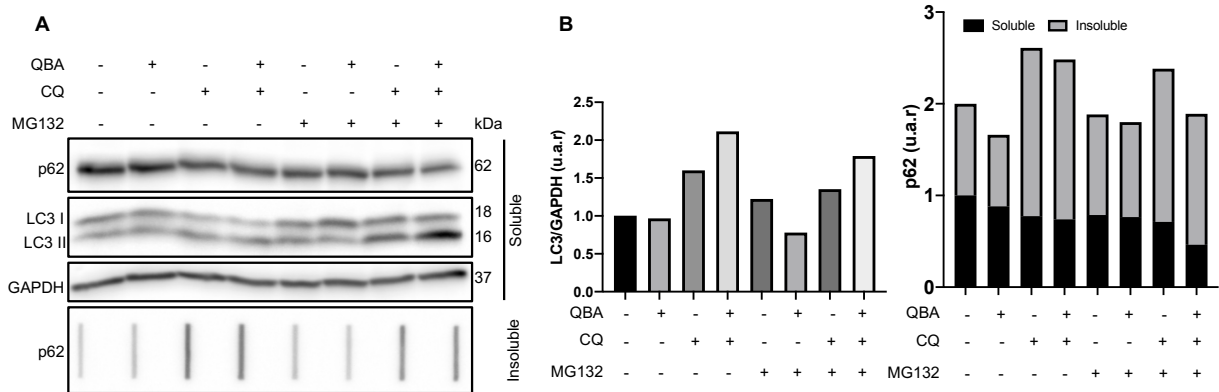


Figura 7. 2. Análisis del efecto de QBA sobre los niveles de LC3 y p62, tras el bloqueo de la autofagia y la generación de agregados, *in vitro*. Las células N2a fueron sembradas a una concentración de 100.000 células/ml. Tras 24 horas fueron mantenidas en medio normal o pre-tratadas con CQ 50 μ M y/o MG132 2 μ M durante 1 hora y posteriormente tratadas con QBA 50 μ M durante 3 horas. A) Los niveles de lipidación de LC3 se determinaron por inmunoblotting, utilizando GAPDH como control de carga. Los niveles de p62 se analizaron de forma diferencial. La parte soluble de la muestra se analizó mediante *western blotting*, utilizando GAPDH como control de carga mientras que la parte insoluble se analizó mediante FTA. B) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

En cuanto a las proteínas ubiquitinadas, al igual que ocurre con p62, es necesario realizar un análisis conjunto mediante *western blotting* (fracción soluble) y FTA (fracción insoluble), para poder hacernos una idea de lo que está ocurriendo realmente. En la figura 7.3. podemos observar como en la fracción soluble prácticamente no se aprecian cambios en los niveles de ubiquitinación total (P4D1) tras el tratamiento con QBA y como, al analizar la fracción soluble, observamos que de nuevo el bloqueo de la autofagia y del SUP aumenta los niveles de proteínas ubiquitinadas en la fracción insoluble y como el tratamiento con QBA reduce los agregados ubiquitinados.

En el caso de la ubiquitinación en la lisina 63 (K63), procedimos de la misma manera. En la parte soluble los cambios en los niveles de K63 provocados por QBA son prácticamente indetectables pero al incluir la fracción insoluble podemos apreciar como QBA disminuye los agregados inducidos por CQ y MG132.

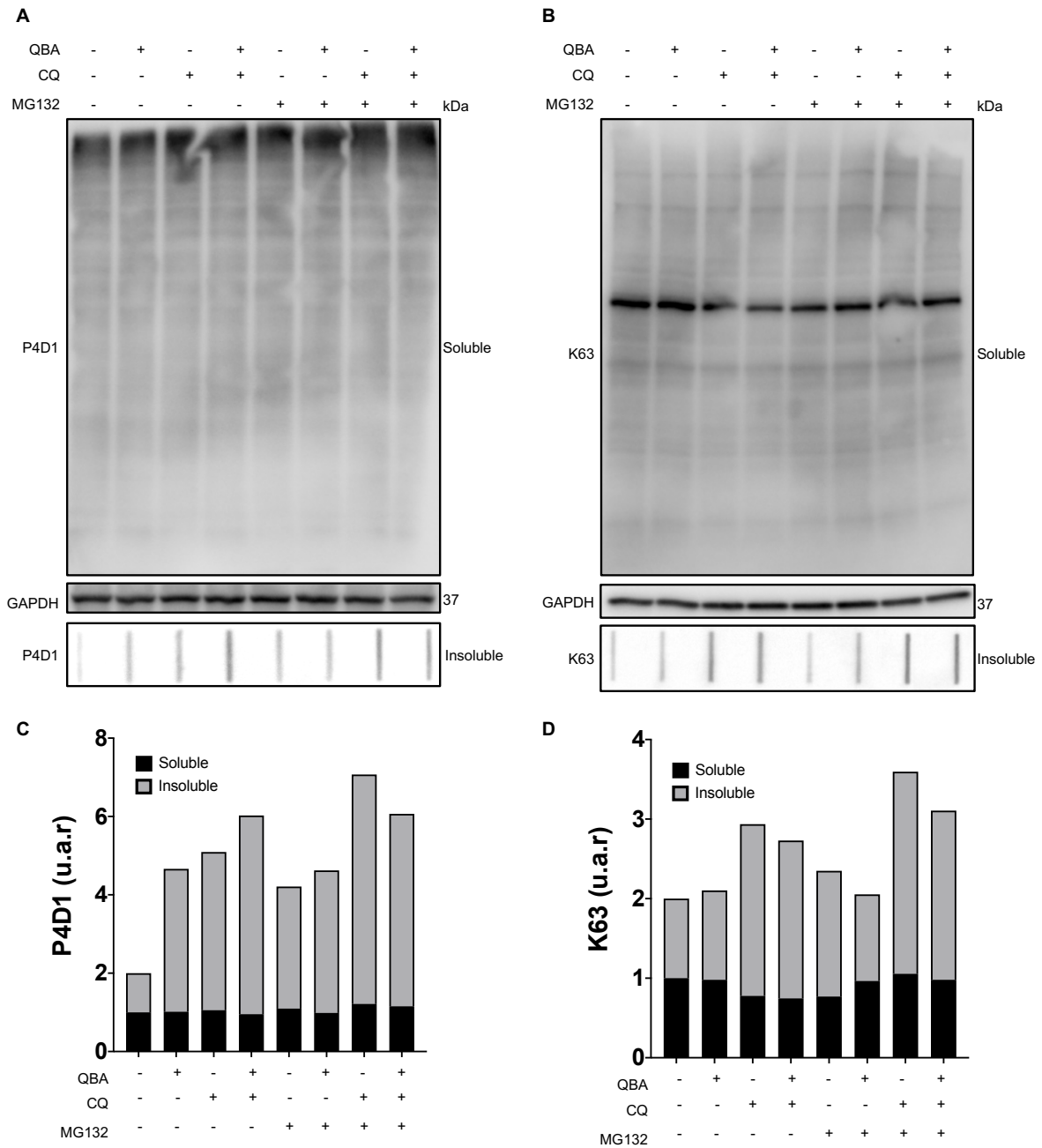


Figura 7. 3. Estudio del efecto de QBA en los niveles de ubiquitinación en la fracción soluble e insoluble, tras la inducción de agregados, in vitro. Las células N2a fueron sembradas a una concentración de 100.000 células/ml. Tras 24 horas fueron mantenidas en medio normal o tratadas con QBA 50 μ M en presencia o ausencia de CQ 50 μ M y/o MG132 2 μ M durante 4 horas. A,B) Los niveles de ubiquitina total (P4D1) y ubiquitina en la lisina 63 (K63) se determinaron en la parte soluble por *western blotting*, utilizando GAPDH como control de carga y en la parte insoluble mediante FTA. C,D) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Respecto a otras proteínas implicadas en el proceso de eliminación de los agregados proteicos, podemos observar en la figura 7.4 como tras el tratamiento combinado de MG132 con QBA produce un incremento de los niveles de acetilación de α -tubulina en la lisina 40, de TRIM16 así como de los niveles de lipidación de LC3 y una disminución de los niveles de HDAC6. Estos resultados parecen indicar una inducción de autofagia por parte de QBA para favorecer la eliminación de los agregados proteicos generados tras el tratamiento con MG132.

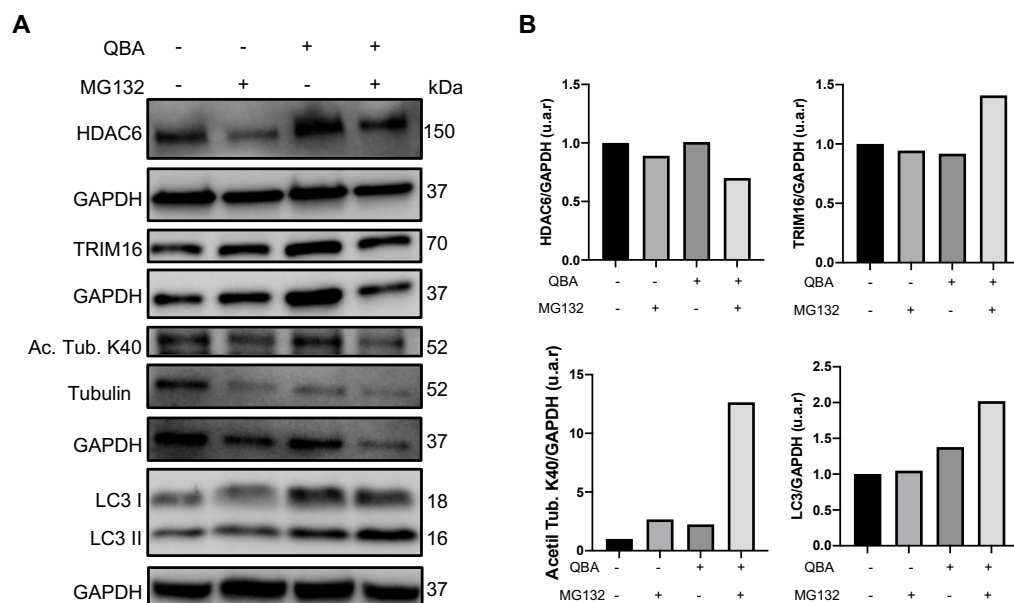


Figura 7.4. Análisis del efecto de QBA sobre los niveles de otras proteínas implicadas en la eliminación de agregados, in vitro. Las células H4-GFP-LC3 fueron sembradas a una concentración de 80.000 células/ml. Tras 24 horas fueron mantenidas en medio normal (Co) o tratadas con QBA 50 μ M en presencia o ausencia de MG132 2 μ M durante 4 horas. A) Los niveles HDAC6, Trim16, acetilación de α -tubulina en la lisina 40 y los niveles de LC3, se determinaron por inmunoblotting, utilizando GAPDH como control de carga. B) Análisis densitométrico de los niveles de HDAC6, TRIM16, acetilación de α -tubulina en la lisina 40 y LC3, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Lo siguiente que analizamos fue estudiar que ocurría si, en lugar de inhibir el SUP utilizando el compuesto MG132 inducíamos la formación de agregados proteicos *per se* y tratábamos dichas células con QBA.

Para ello realizamos dos experimentos. Por un lado, utilizamos el antibiótico puromicina para inducir la formación de agregados en las células SH-SY5Y y analizamos la fracción soluble de nuestro lisado celular por *western blotting* y la fracción insoluble de la misma mediante FTA para determinar los niveles de ubiquitinación total (P4D1). Podemos observar en la figura 7.4 que, tras el tratamiento con puromicina los niveles de P4D1

aumentan en la fracción soluble, igual que ocurre tras tratar con QBA, sin embargo, al analizar la fracción insoluble podemos observar como con QBA se produce una disminución de los niveles indicando la implicación de QBA en su eliminación.

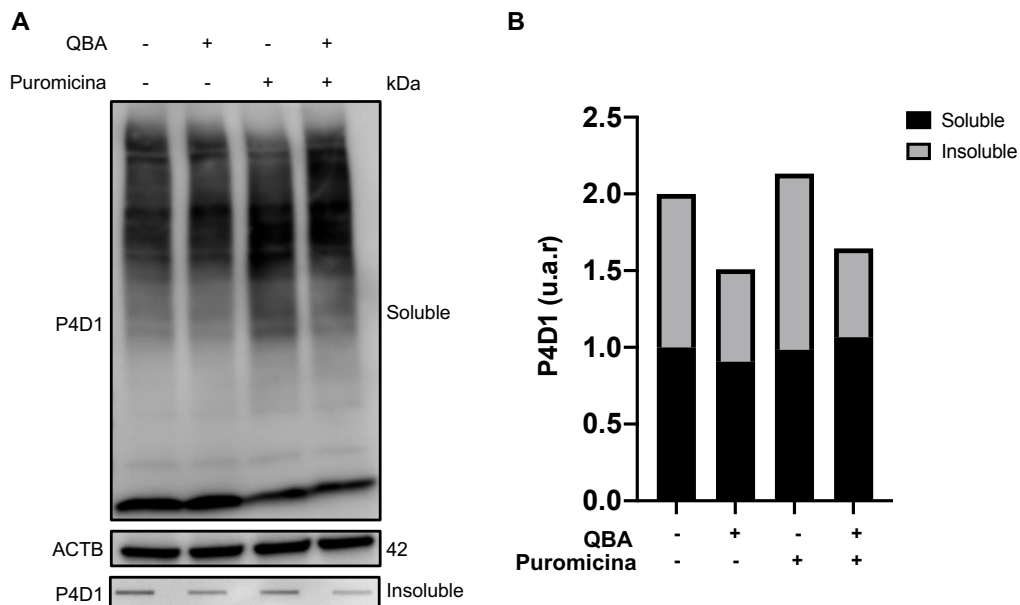


Figura 7. 5.Efecto de QBA sobre los agregados inducidos por puromicina, in vitro. Las células SH-SY5Y fueron sembradas a una concentración de 110.000 células/ml. Tras 24 horas fueron mantenidas en medio normal (Co) o tratadas con puromicina 10 μ g/ml durante 3 horas y posteriormente con QBA 50 μ M durante 2 horas, donde corresponda. A) Los niveles de ubiquitina total (P4D1) se determinaron en la parte soluble de la muestra por *western blotting*, utilizando ACTB como control de carga y en la parte insoluble mediante FTA. B) Densitometría de los niveles de las distintas proteínas analizadas, representadas en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Además de analizar los niveles de proteínas, también se realizó una inmunofluorescencia en células H4-GFP-LC3 en las que se habían generado agregados con puromicina y habían sido tratadas con QBA y CQ.

La proteína P4D1, se marcó en rojo y se analizó el número de puntos positivos para P4D1 que se corresponderían con los agregados de proteínas, al estar estos marcados para su eliminación.

Podemos observar que, si la autofagia está bloqueada, por ejemplo tras el tratamiento con CQ, los agregados marcados con ubiquitina son muy elevados y cómo con el tratamiento con QBA el número de agregados ubiquitinados disminuye significativamente, afirmando la implicación de QBA en su eliminación.

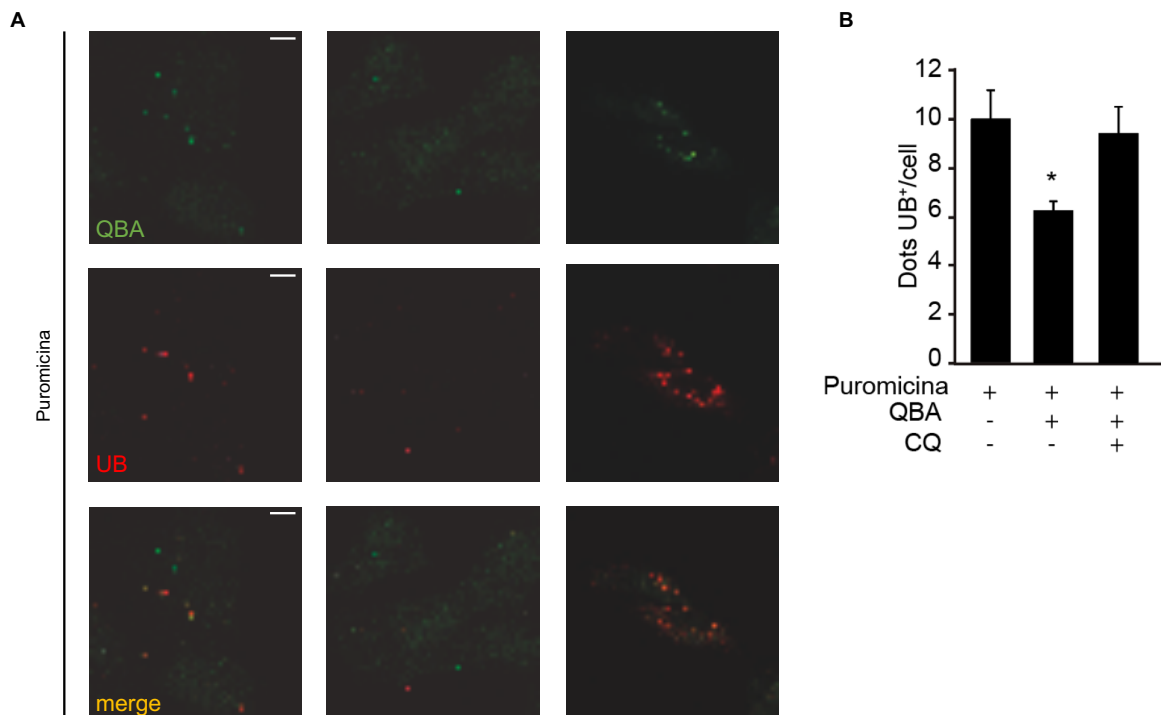


Figura 7. 6. Estudio del número de puntos UB⁺ por célula tras el tratamiento con QBA y la generación de agregados con puromicina, *in vitro*. Las células H4-GFP-LC3 fueron sembradas a una concentración de 80.000 células/ml. Tras 24 horas fueron tratadas con puromicina 10 μ g/ml durante 4 horas y posteriormente mantenidas en medio normal (Co) o tratadas con QBA 50 μ M o CQ 50 μ M durante 2 horas. Posteriormente la placa fue fijada y se cuantificó el número de puntos de ubiquitina (rojo) mediante inmunofluorescencia tras el tratamiento con QBA o CQ. Los agregados de puromicina se corresponden con LC3 (verde) A) Se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones. Barra de escala representa 10 μ m. B) La gráfica representa el número de puntos ubiquitina + por célula. (* p <0.05 respecto al control).

Por otro lado, se generaron agregados de huntingtina mediante transfección celular utilizando el plásmido EGFP-Htt-Q74. Esta transfección se realizó en células N2a (Figura 7.7.).

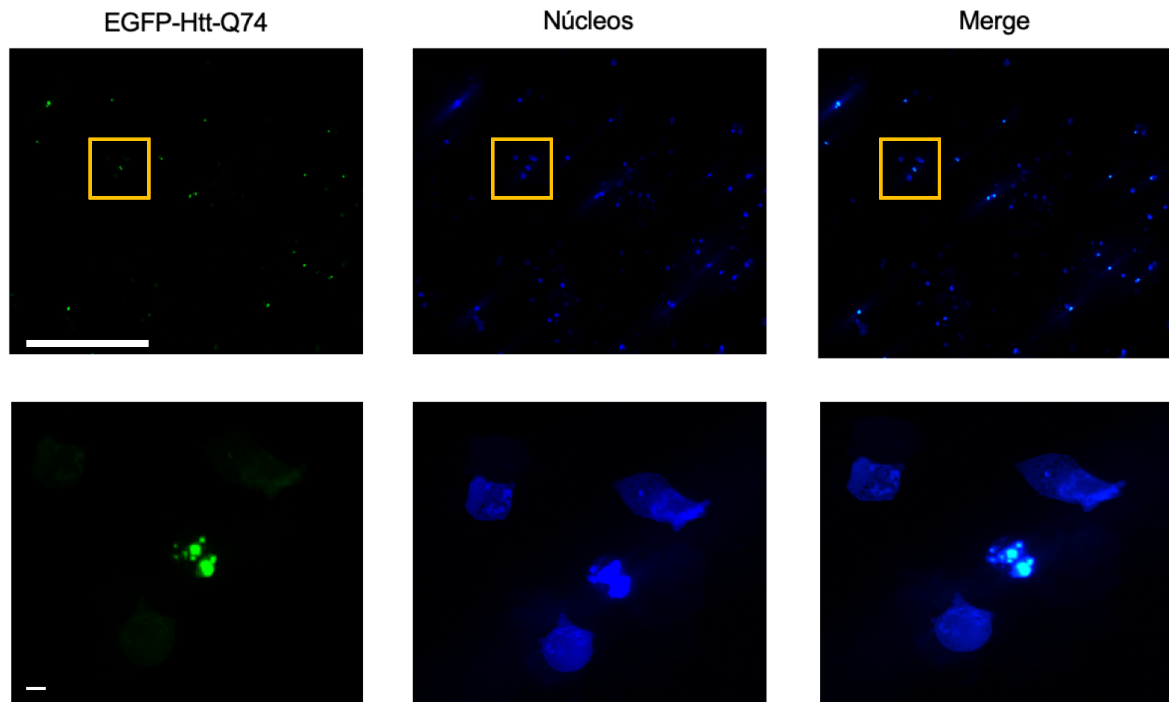


Figura 7. 7. Generación de agregados por EGFP-Htt-Q74, in vitro. Las células N2a fueron sembradas a una concentración de 100.000 células/ml. 24 horas tras la siembra fueron transfectadas con el plásmido EGFP-Htt-Q74. Posteriormente la placa fue fijada y los núcleos teñidos con Hoechst. Finalmente se procedió a la visualización de los agregados, los cuales aparecen como puntos verdes muy brillantes. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 154 μm .

En la figura 7.8.A se analizaron por *western blotting* los niveles de lipídación de LC3, tras la transfección con EGFP-Htt-Q74, observándose un aumento de los mismos cuando la autofagia está bloqueada con CQ y un incremento aun mayor tras combinar CQ con QBA. También se analizaron los niveles de ubiquitina total (P4D1) tanto de la fracción soluble como de la insoluble. Combinando los resultados de ambas fracciones celulares podemos observar como el número de agregados disminuye tras tratar con QBA respecto a las células sin tratar y como este efecto se ve revertido tras bloquear la autofagia con CQ. Además, confirmamos la degradación de los agregados de Htt-Q74 analizando los niveles de GFP, una proteína fluorescente verde que lleva asociada el plásmido. Podemos ver como GFP disminuye tras el tratamiento con QBA, como el bloqueo de la autofagia aumenta sus niveles y como QBA, pese a estar bloqueada la autofagia, es capaz de aumentar los niveles de GFP en la fracción soluble y disminuirlos en la insoluble.

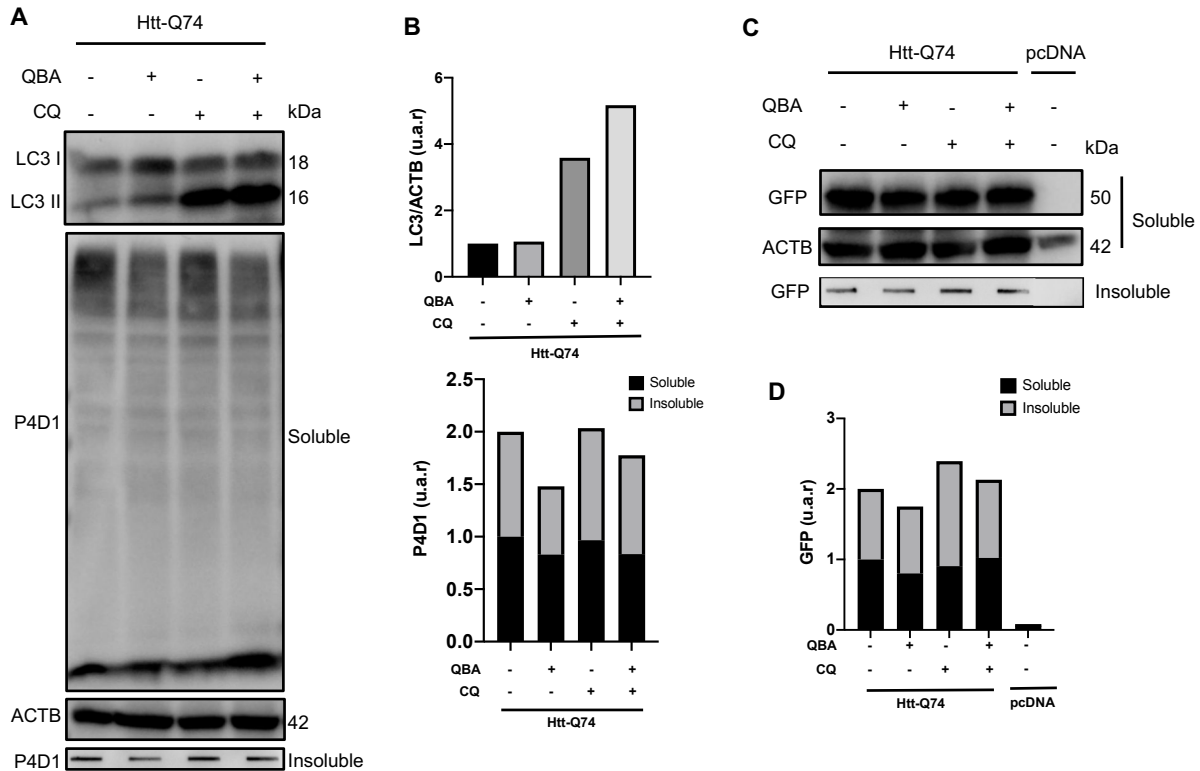


Figura 7. Efecto de QBA sobre los agregados generados con EGFP-Htt-Q74, in vitro. Las células N2a fueron sembradas a una concentración de 100.000 células/ml. 24 horas tras la siembra fueron transfectadas con el plásmido EGFP-Htt-Q74 o un plásmido vacío (pcDNA). 24 horas después se realizaron los tratamientos QBA 50 μ M en ausencia o presencia de CQ 50 μ M durante 4 horas. A,C) Los niveles de LC3 fueron determinados por *western blotting*, utilizando ACTB como control de carga; los niveles de ubiquitina total (P4D1) y GFP se determinaron en la parte soluble de la muestra por inmunoblotting, utilizando ACTB como control de carga y en la parte insoluble mediante FTA. B,D) Análisis densitométrico de los niveles de LC3 P4D1 y GFP, representados en unidades arbitrarias relativas (u.a.r.).

Finalmente, y para terminar con la evaluación del efecto de QBA sobre los agregados y la proteostasis, se realizó un experimento de recuperación de la actividad luciferasa después de la inducción de un estrés proteotóxico. Las células U2OS-Lu-Fluc-EGFP, presentan una luminiscencia basal, la cual desaparece tras un estrés proteotóxico, en este caso un choque térmico. Estudiando la actividad luciferasa evaluamos el índice de recuperación de luminiscencia perdida, por el choque térmico, tras el tratamiento con QBA. Utilizamos rapamicina inductor de autofagia, es decir como control positivo. Tras el choque térmico se produce un estrés proteotóxico que se puede medir como una pérdida de luminiscencia. En la figura 7.9. podemos ver como QBA es capaz de recuperar la pérdida de luminosidad asociada al choque térmico; es decir es capaz de revertir los efectos del estrés provocado, de manera similar a rapamicina.

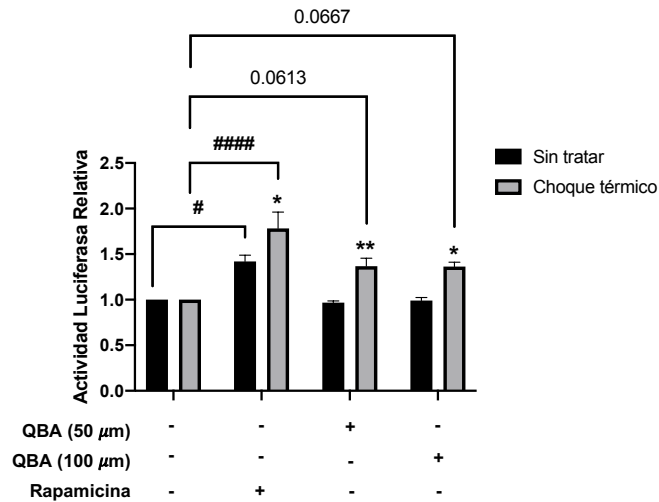


Figura 7. 9. Recuperación de la actividad luciferasa tras un choque térmico, al tratar las células con QBA, in vitro. Las células U2OS-Lu-Fluc-EGFP fueron sembradas en dos placas a una concentración de 70.000 células/ml. 24 horas tras la siembra fueron tratadas con medio normal (Co) o medio con rapamicina 1 μM, QBA 50 μM o 100 μM durante otras 24 horas. Posteriormente una placa fue sometida a un choque térmico, 43°C durante 30 minutos mientras que la otra se mantuvo a 37°C. La luminosidad fue medida utilizando el kit “Steady Glo” de Promega. Cuantificación de la actividad luciferasa relativa tras el choque térmico. Datos de tres experimentos ± su error estándar (*p<0.05, ** p< 0,005 respecto a su equivalente sin choque térmico; #p<0.05 ####p<0.0001 respecto al control sin tratamiento con choque térmico).

El conjunto de todos estos datos parece indicar que el tratamiento con QBA reduce el número de agregados proteicos pero este efecto no es totalmente dependiente de la activación de la autofagia.

8. Efecto de QBA sobre los agregados *in vivo*

Tras evaluar el papel neuroprotector de QBA frente al estrés proteotóxico *in vitro*, evaluamos el efecto de QBA en la degradación de agregados en un modelo animal. Para ello se utilizaron ratones R6/1, un modelo transgénico cuya base genética son los ratones C57BL/6, que expresan el exón 1 del gen que codifica la Huntingtina humana. Los agregados de huntingtina se acumulan y provocan disfunción celular y muerte por apoptosis, causando atrofia en diferentes partes del cerebro (98,99). Mayoritariamente las áreas del cerebro más afectadas son el estriado (St) y la corteza (Cx) pero también se ha visto atrofia en otras partes del cerebro como el cerebelo (Cb) o el hipocampo (Hc), entre otras (100). Tras la administración de QBA en el agua de bebida en estos ratones evaluamos los niveles de la huntingtina endógena, la huntingtina mutada y las

proteínas ubiquitinadas de la fracción insoluble en distintas áreas del cerebro. En la figura 8.1.A, C y E podemos ver los resultados del FTA para corteza (Cx), estriado (St), hipocampo (Hc) y cerebelo (Cb) para las proteínas de huntingtina total (HTT), huntingtina mutada (mHTT) y ubiquitina total (P4D1).

Los resultados muestran que no hay cambios significativos en los niveles de la proteína HTT endógena tras la administración de QBA en todas las regiones del cerebro analizadas.

Sin embargo, se aprecia un aumento de mHTT significativo en estriado. En cuanto a P4D1, parece que sube ligeramente en estriado, sin embargo, en el resto de las áreas estudiadas baja, siendo muy significativa la bajada en cerebelo.

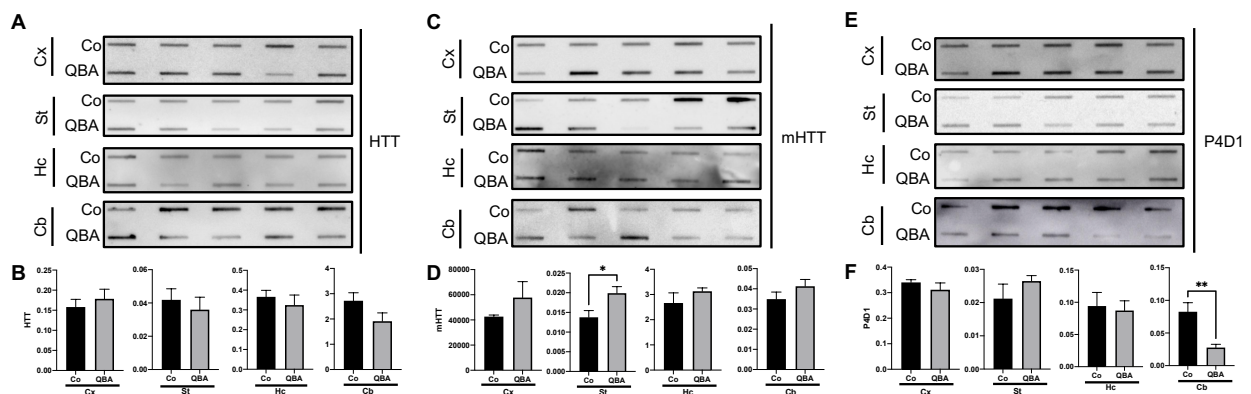


Figura 8. 1. Evaluación de los niveles de agregados en la fracción insoluble en cerebro tras el tratamiento con QBA. Los ratones R6/1 de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el agua de bebida durante 4 semanas. El cerebro fue extraído y separado en corteza (Cx), estriado (St), hipocampo (Hc) y cerebelo (Cb). A,C,E) Los niveles de HTT, mHTT y P4D1 se determinaron mediante FTA. B,D,F) Análisis densitométrico de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 10 ratones. (* $p < 0.05$ respecto al control; ** $p < 0.005$ respecto al control).

A continuación, evaluamos los niveles de distintas proteínas implicadas en el proceso de autofagia. Los niveles de LC3-II tras el tratamiento con QBA se encuentran aumentados de forma significativa en hipocampo y muy significativamente en corteza. En cerebelo parece que suben los niveles, al igual que en estriado, aunque sin llegar a ser significativos (Figura 8.2.A).

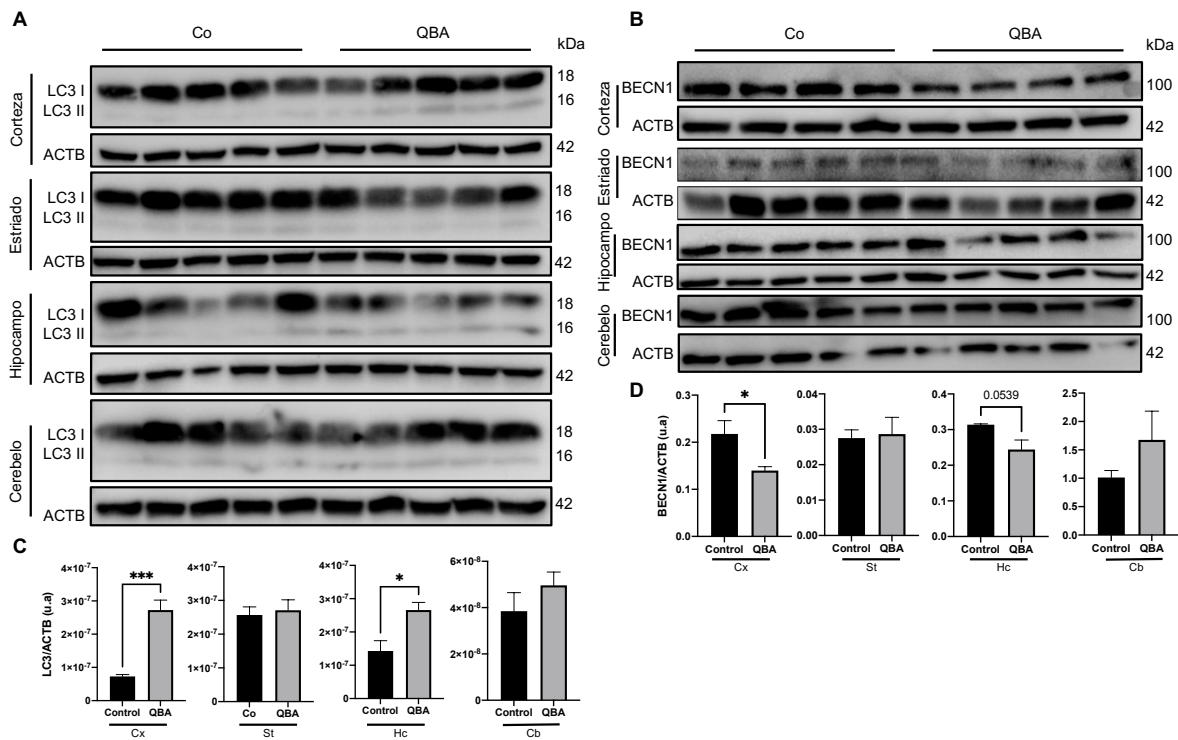


Figura 8. 2. Análisis de los niveles de proteínas de autofagia en la fracción soluble de cerebro tras el tratamiento con QBA. Los ratones R6/1 de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el agua de bebida durante 4 semanas. El cerebro fue extraído y separado en corteza, estriado, hipocampo y cerebelo. A,B) Los niveles de LC3 y BECN1 se determinaron en las cuatro partes mediante *western blotting*. ACTB se utilizó como control de carga. C,D) Análisis densitométrico de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 5 ratones, representados como unidades arbitrarias (u.a.). (* $p < 0.05$ respecto al control; *** $p < 0.001$ respecto al control).

En el caso de BECN1 (Figura 8.2.B), los niveles disminuyen tras el tratamiento con QBA de forma significativa en corteza y muy cerca de significancia en hipocampo no obstante, en cerebelo parece que esos niveles aumentan y en estriado apenas hay diferencias entre los ratones tratados y sin tratar.

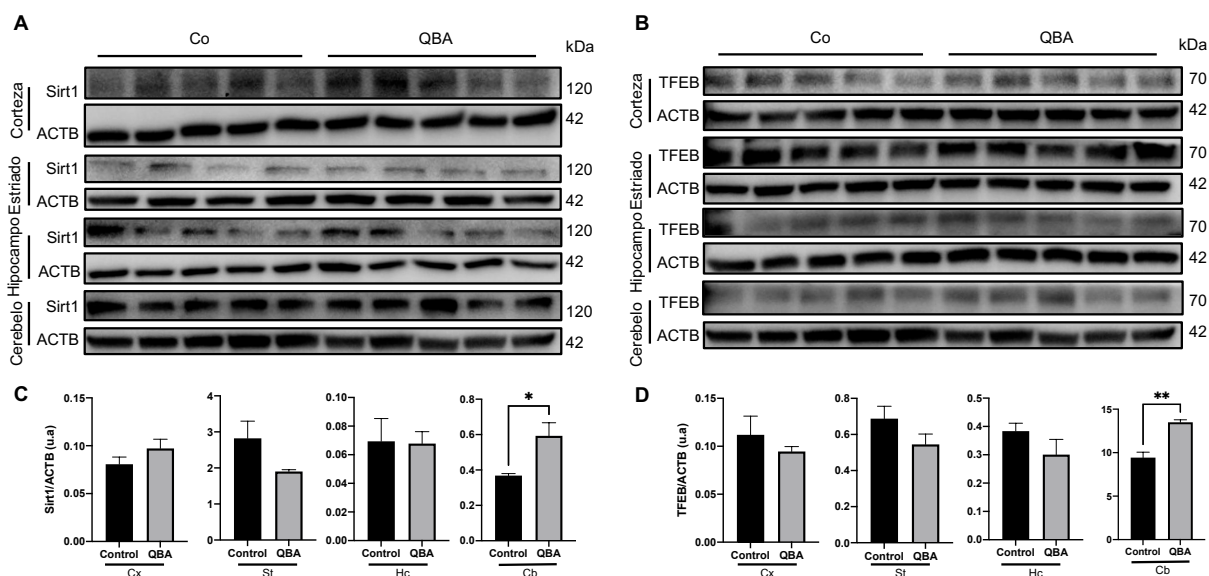


Figura 8.3. Determinación de los niveles de proteínas de autofagia de la fracción soluble en cerebro tras el tratamiento con QBA. Los ratones R6/1 de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el agua de bebida durante 4 semanas. El cerebro fue extraído y separado en corteza, estriado, hipocampo y cerebelo. A,B) Los niveles de Sirt1 y TFEB se determinaron en las cuatro partes mediante western blotting. ACTB se utilizó como control de carga. C,D) Análisis densitométrico de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 5 ratones, representados como unidades arbitrarias (u.a.). (* $p < 0.05$ respecto al control; *** $p < 0.001$ respecto al control).

En cuanto a la figura 8.3., los resultados muestran que tras el tratamiento con QBA hay un incremento significativo de los niveles de SIRT1 y TFEB en cerebelo sin apreciarse cambios significativos en el resto de las áreas estudiadas.

Finalmente analizamos el factor de transcripción NRF2 (Figura 8.4.), el cual protege frente al daño provocado por radicales libres y observamos que, tras el tratamiento con QBA sus niveles disminuyen de forma significativa en estriado y muy cerca de significancia en cerebelo, mientras que en corteza e hipocampo no se aprecian diferencias.

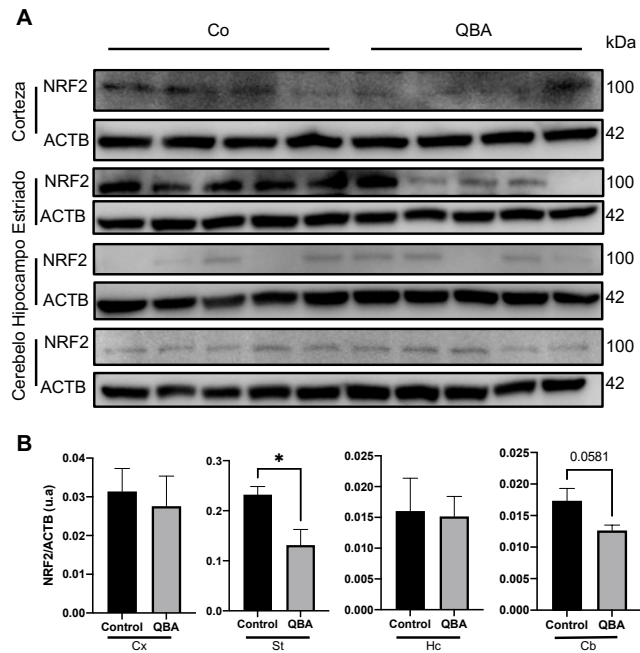


Figura 8.4. Estudio de los niveles de NRF2 en la parte soluble de cerebro tras el tratamiento con QBA. Los ratones R6/1 de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el agua de bebida durante 4 semanas. El cerebro fue extraído y separado en corteza, estriado, hipocampo y cerebelo. A) Los niveles de NRF2 se determinaron en las cuatro partes mediante western blotting. ACTB se utilizó como control de carga. B) Análisis densitométrico de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 5 ratones, representados como unidades arbitrarias (u.a.). (* $p < 0.05$ respecto al control; *** $p < 0.001$ respecto al control).

Estos resultados parecen indicar un efecto de QBA en las distintas áreas del cerebro estudiadas, siendo más evidente en cerebelo.

9. Efecto de QBA sobre la senescencia

Finalmente quisimos estudiar si QBA tiene un efecto sobre la senescencia. La senescencia celular es un estado en el que entran las células bien porque han alcanzado su número máximo de replicaciones o bien como una adaptación a un daño celular. En cualquier caso, se trata de un envejecimiento celular. Estas células senescentes sufren una serie de cambios morfológicos, funcionales y secretores de factores, los cuales pueden ser cuantificados.

Por ello que quisimos estudiar si QBA afecta a la actividad mitocondrial en células senescentes empleando el analizador metabólico *Seahorse* y el kit *Cell Mito Stress Test*. Se utilizaron células SH-SY5Y que habían sido mantenidas poco tiempo en cultivo, denominadas controles, y células SH-SY5Y que habían sido mantenidas en cultivo y sometidas a bastantes pases celulares considerándose, por tanto, senescentes. En ambos grupos celulares se realizó un tratamiento con QBA 50 μ M. En la figura 9.1. podemos apreciar diferencias significativas entre las células control y las senescentes, y cómo QBA disminuye de forma significativa la respiración basal, máxima, SRC y proton leak. Sin embargo, no se aprecian cambios en la producción de ATP y el consumo de oxígeno tras el tratamiento de QBA en las células senescentes.

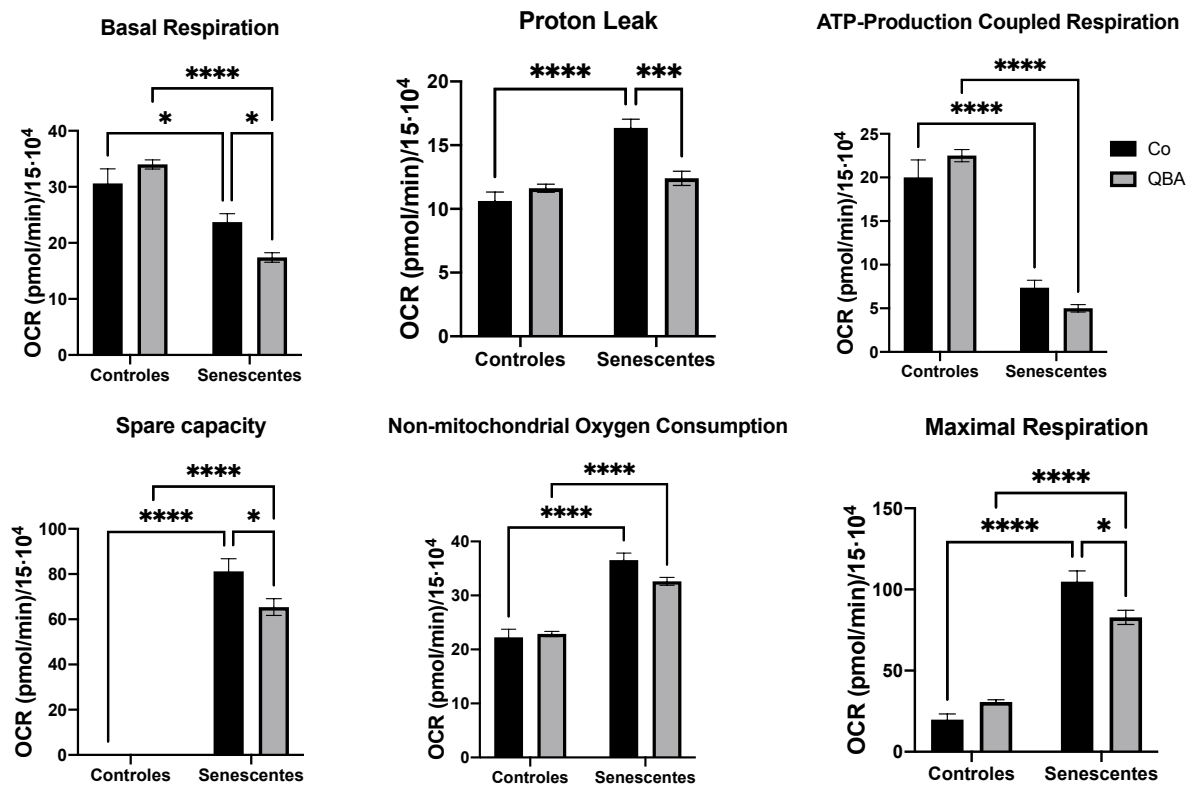


Figura 9. 1.Efecto de QBA sobre el metabolismo mitocondrial en células senescentes. Las células SH-SY5Y fueron sembradas a una concentración de 15.000 células/ml, a pase 10 (controles) y pase 25 (senescentes), en placas de Seahorse. Al día siguiente las células fueron tratadas durante 4 horas con QBA 50 μ M. Tras el tratamiento se siguió el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Los datos de OCR fueron normalizados respecto al número de células. Los resultados se representan como la media del OCR \pm su error estándar de los valores normalizados (* p <0.05; *** p <0.001; **** p <0.0001).

Tras observar que QBA tiene un efecto en el metabolismo mitocondrial en células senescentes, nos centramos en evaluar si este compuesto tiene la capacidad de eliminar las células senescentes o por el contrario es capaz de prevenir que las células entren en el estado de senescencia. Para ello, realizamos distintos experimentos en los cuales inducimos la senescencia empleando distintos compuestos. El primer experimento que se realizó fue de tipo senomórfico. En este experimento se indujo senescencia utilizando dos inductores, doxorubicin y palbociclib, de forma independiente sobre la línea celular SK-Mel-103, de melanoma humano. Esto va a producir un cambio en la morfología de las células y la producción de una serie de factores específicos de senescencia (SASP), que pueden ser cuantificados. Tras la inducción de la senescencia, tratamos las células con QBA. Queremos estudiar si QBA tiene algún efecto sobre esas células senescentes. Los cambios de morfología en la senescencia pueden ser observados mediante la tinción de las células con β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal), ya que su actividad se encuentra aumentada en las células senescentes (101).

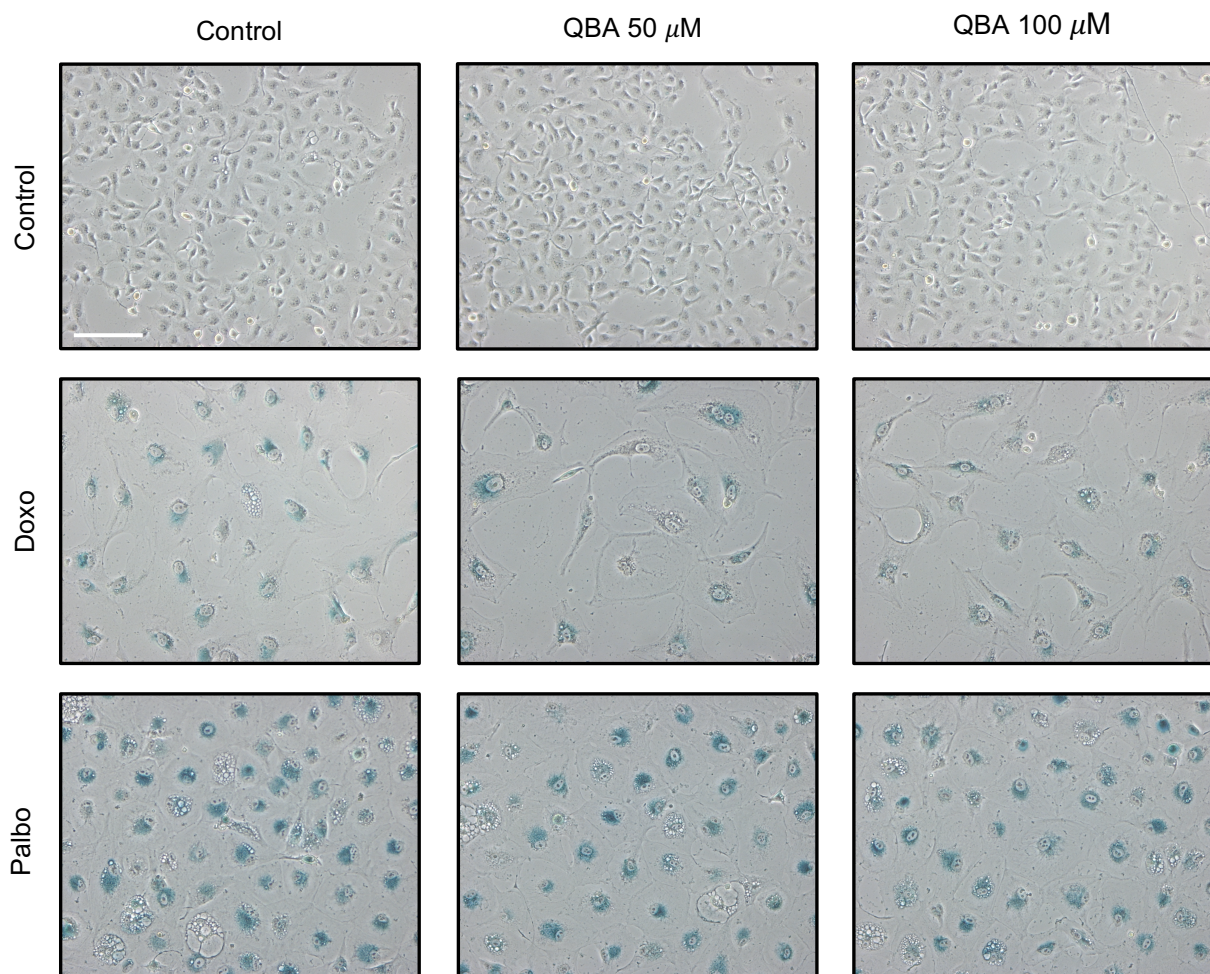


Figura 9. 2. Imágenes representativas de la tinción con β -galactosidasa en un experimento senomórfico en células humanas tras su tratamiento con QBA. Las células SK-Mel-103 fueron sembradas a una concentración de 30.000 células/ml. 24 horas después de la siembra se añadió el inductor de senescencia Doxorubicin 50 nM o Palbociclib 5 μ M. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 5 días y, posteriormente se trataron con QBA 50 o 100 μ M durante 2 días. Una semana después de la siembra se realiza la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) de un pocillo de cada condición. Se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones. La barra de escala representa 50 μ m.

Se puede confirmar la inducción de senescencia por parte de ambos inductores, observándose un cambio en el tamaño y morfología de las células, así como un marcaje azul asociado a la β -galactosidasa pero no se aprecian diferencias entre las células senescentes sin tratar respecto a las tratadas, en ninguna de las dos concentraciones de QBA (figura 9.2).

A continuación, evaluamos el efecto de QBA en la senescencia estudiando diferentes SASP, IL-1 α y β , IL-6p16, p21 y CCL2, producidos por las células senescentes, mediante PCR. Los resultados fueron similares a los anteriores; es decir, se pueden apreciar cambios en los niveles de expresión de dichos factores entre las células no senescentes y las senescentes pero no se aprecian cambios significativos en estos factores tras el tratamiento con QBA en ninguna de las dos concentraciones (figura 9.3).

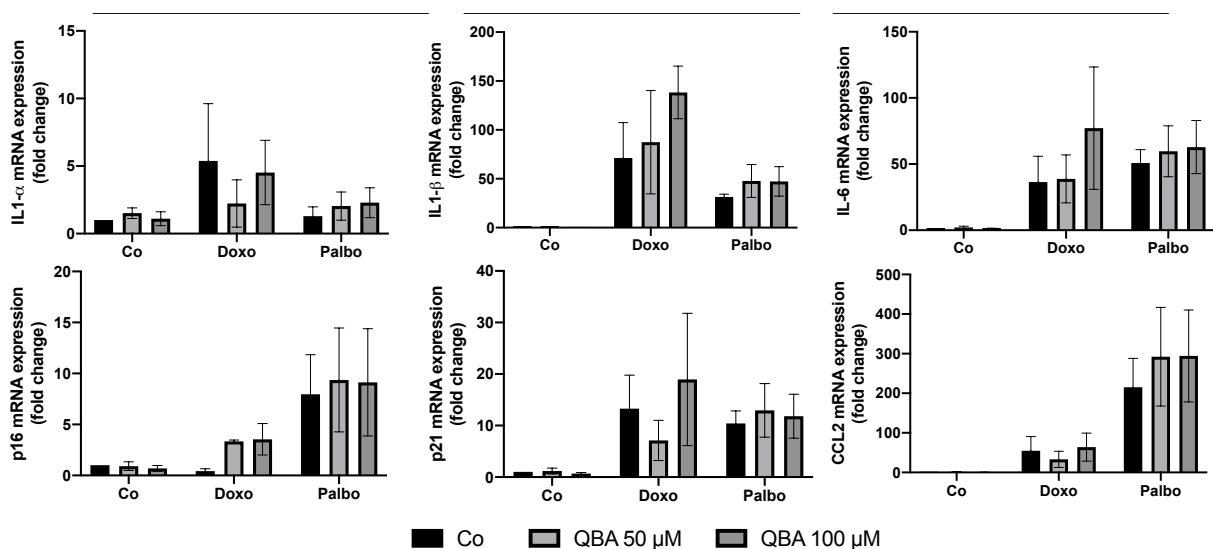


Figura 9. 3. Análisis de los niveles de SASP en células senescentes tras el tratamiento con QBA por PCR cuantitativa. Las células SK-Mel-103 fueron sembradas a una concentración de 30.000 células/ml. 24 horas después de la siembra se añadió el inductor de senescencia Doxorubicin 50 nM o Palbociclib 5 μ M. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 5 días y, posteriormente se trataron con QBA 50 o 100 μ M durante 2 días. Los niveles de expresión de ARN mensajero se determinaron

mediante PCR cuantitativa utilizando los *primers* específicos para IL-1 α y β , IL-6, p16, p21 y CCL2. Se utilizó GAPDH como control endógeno.

Se realizó un experimento similar empleando cultivos primarios procedentes de orejas de ratón, para descartar que la falta de efecto de QBA sobre las células senescentes se deba al fenotipo de la línea celular utilizada anteriormente.

En este caso el inductor de senescencia utilizado fue solo palbociclib y los resultados que se obtuvieron para la tinción con β -galactosidasa fueron similares a los anteriores. Las células presentan la morfología asociada a senescencia pero no se aprecian cambios tras el tratamiento con QBA (figura 9.4).

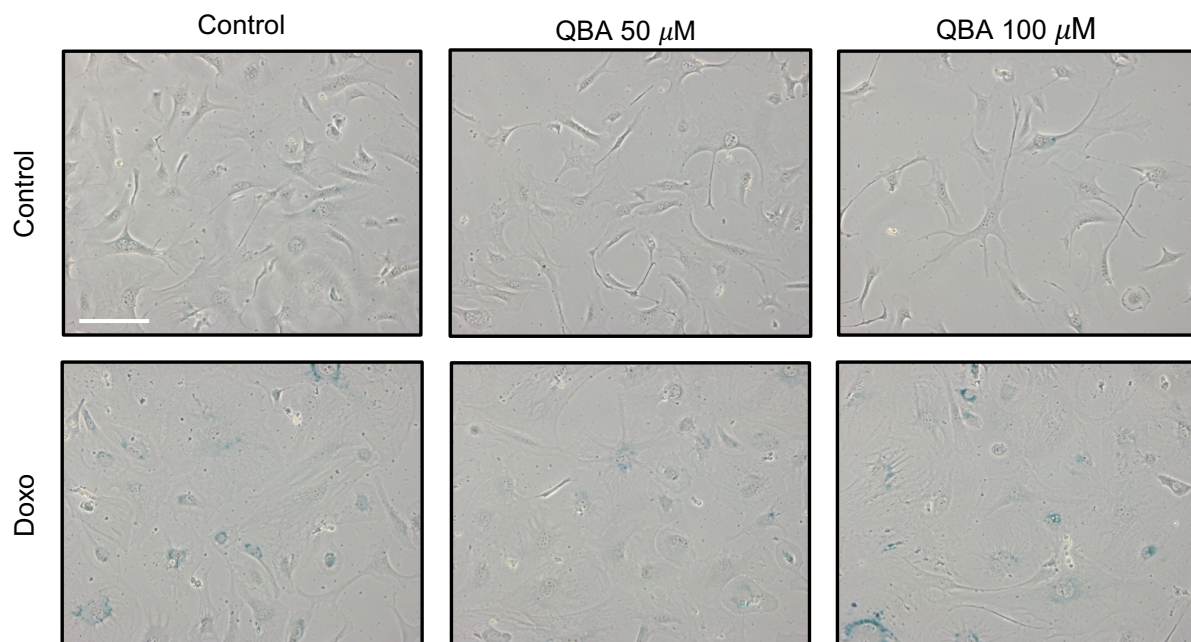


Figura 9. 4. Imágenes representativas de la tinción con β -galactosidasa en un experimento senomórfico en células de ratón tras su tratamiento con QBA. Los fibroblastos de oreja de ratón fueron sembrados a una concentración de 25.000 células/ml. 24 horas después de la siembra se añadió el inductor de senescencia Doxorubicin 50 nM. Las células fueron mantenidas en cultivo durante 5 días y, posteriormente se trataron con QBA 50 o 100 μ M durante 2 días. Una semana después de la siembra se realiza la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) de un pocillo de cada condición. Se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones. La barra de escala representa 50 μ m.

Hasta el momento no se aprecia un efecto evidente de QBA en las células que ya se encuentran en senescencia. Por ello, nos planteamos si QBA puede evitar la inducción del proceso de senescencia, lo que se conoce como experimentos de senopreención. Se llevan a cabo de manera similar a los experimentos anteriores pero la inducción de

senescencia, con Doxo y/o Palbo, y el tratamiento con el compuesto en estudio, en este caso QBA, se realizan de forma simultánea. En la figura 9.5. podemos observar la tinción con β -galactosidasa de las células SK-Mel-103 tras tratarlas con Doxo y/o Palbo con y sin QBA 50 y 100 μ M, sin cambios aparentes en la senescencia inducida.

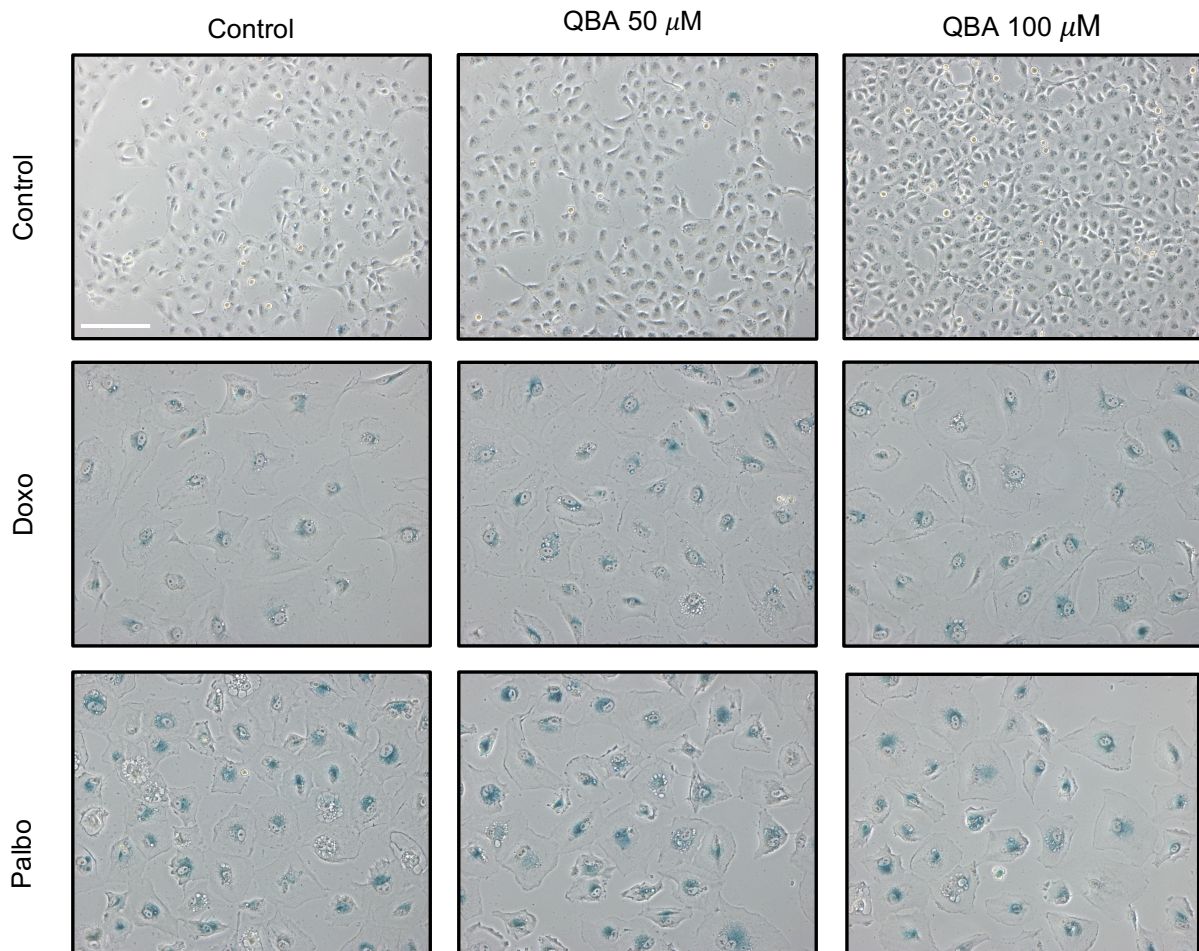


Figura 9. 5. Imágenes representativas de la tinción con β -galactosidasa en un experimento de **senopreención** tras el tratamiento con QBA. Las células SK-Mel-103 fueron sembradas a una concentración de 30.000 células/ml. 24 horas después de la siembra se añadió el inductor de senescencia Doxorubicin 50 nM o Palbociclib 5 μ M junto con QBA 50 o 100 μ M durante 7 días. Pasado el tiempo se realiza la tinción con β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -Gal) de un pocillo de cada condición. Se muestran imágenes representativas para cada una de las condiciones. La barra de escala representa 10 μ m.

Estos resultados parecen mostrar que QBA afecta a la función mitocondrial de las células senescentes pero no parece evitar que las células entren en ese proceso.

10. Efecto de QBA sobre el envejecimiento

Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado un incremento sobre la longevidad en moscas tras su tratamiento con QBA. Es por eso que nos planteamos estudiar el efecto de QBA sobre la longevidad utilizando un modelo murino que presenta un envejecimiento precoz. Los ratones presentan una mutación en el gen *LMNA* (*p.G609G*) de forma heterocigota (*Lmna*^{G609G/WT}) u homocigota (*Lmna*^{G609G/G609G}).

Son en estos últimos, los denominados “lakis” en los que centraremos nuestros estudios.

Comenzamos realizando estudios para medir la supervivencia o longevidad de los ratones. Para ello se emplearon al menos 35 ratones de 6 semanas de edad a los que se les administró QBA (10 mg/ml) o su vehículo (control) en el alimento hasta el momento de su muerte de forma natural. En la figura 10.1. se representan los datos de supervivencia de ambos grupos. Se realizó una distinción de los datos por sexo.

No se observaron cambios significativos en la supervivencia tras el tratamiento con QBA en ambos sexos.

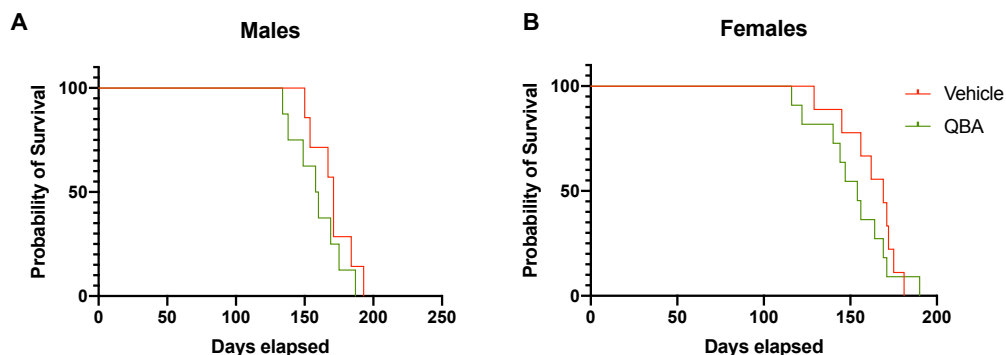


Figura 10. 1.Efecto de QBA sobre la longevidad en ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tras el tratamiento con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo, administrado en el alimento hasta el momento de su muerte de forma natural. A) Gráfica comparativa de la supervivencia entre machos. B) Gráfica comparativa de la supervivencia entre hembras.

Los ratones fueron pesados semanalmente para realizar un seguimiento de los posibles cambios que un tratamiento continuado como el que estaban recibiendo pudiera tener sobre ellos.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

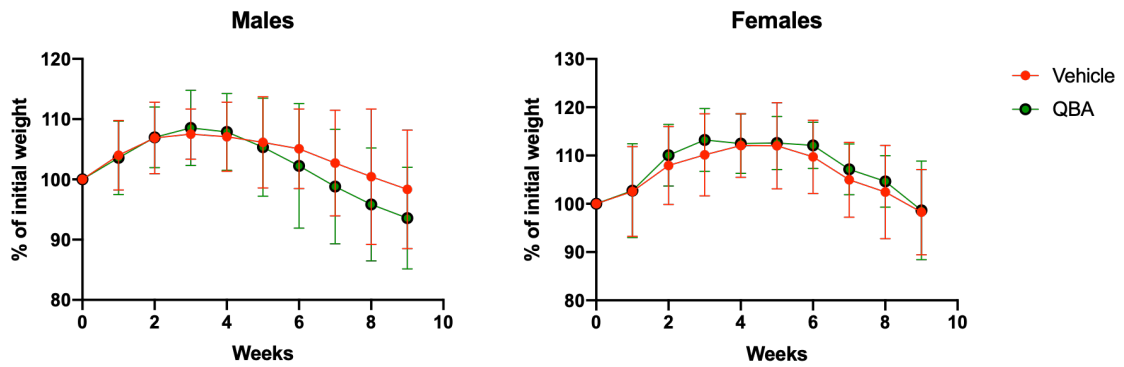


Figura 10. 2.Efecto de QBA sobre el peso de ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tras el tratamiento con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo, administrado en el alimento hasta el momento de su muerte de forma natural. A) Gráfica comparativa de la oscilación de peso entre machos. B) Gráfica comparativa de oscilación de peso entre hembras.

A continuación, evaluamos si QBA modula los niveles de distintas proteínas implicadas en diferentes procesos celulares.

Se emplearon al menos 10 ratones, machos y hembras, de 6 semanas de edad, a los cuales se les administró QBA (10 mg/ml) o su vehículo (control) en el alimento hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento (Figuras 10.3-10.5). Posteriormente los ratones fueron sacrificados y se extrajeron diferentes órganos para su posterior análisis por *western blotting* o FTA. Corazón, hígado y músculo fueron analizados.

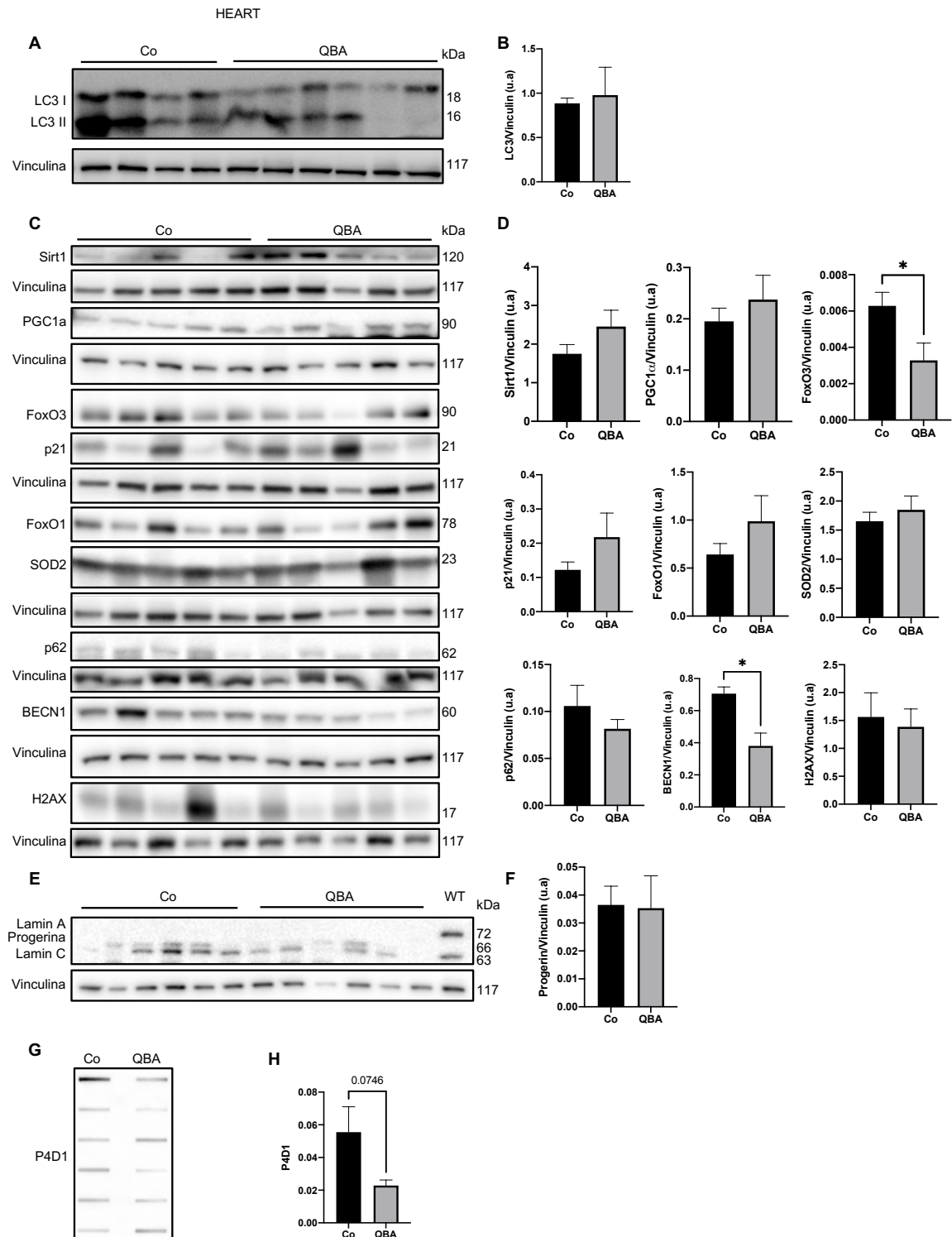


Figura 10. 3. Análisis de los niveles de proteínas de autofagia en corazón de ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tratados con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el alimento hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento. El corazón fue extraído para su análisis. A, C, E) Blots representativos de las proteínas LC3, Sirt1, PGC1a, FoxO3, p21, FoxO1, SOD2, p62, BECN1, H2AX y progerina. Vinculina fue utilizada como control de carga. G) P4D1 se determinó en la parte insoluble de la muestra mediante FTA. B, D, F, H) Análisis densitométricos de las medias \pm su error estándar (SEM)

de, al menos 5 ratones por condición, representados como unidades arbitrarias (u.a.). * $p < 0.05$ respecto al control.

En los resultados del análisis del corazón, en la figura 10.3., podemos apreciar como en los ratones tratados con QBA disminuyen de forma significativa los niveles de FoxO3 y BECN1. En cuanto a los niveles de progerina, no se aprecian cambios entre los ratones no tratados, controles y los tratados con QBA. Finalmente, se analizaron los niveles de ubiquitina total (P4D1) por FTA, y podemos ver como se produce una bajada de los niveles cerca de significancia.

Analizamos también hígado (Figura 10.4.), donde observamos una subida significativa de los niveles de LC3-II tras el tratamiento con QBA y una subida cerca de significancia de los niveles de PGC1a. También existe una ligera bajada de los niveles de progerina tras el tratamiento con QBA. En cuanto a los niveles de ubiquitina total (P4D1) analizados por FTA, podemos ver como se produce una bajada significativa de los niveles respecto a los controles sin tratar.

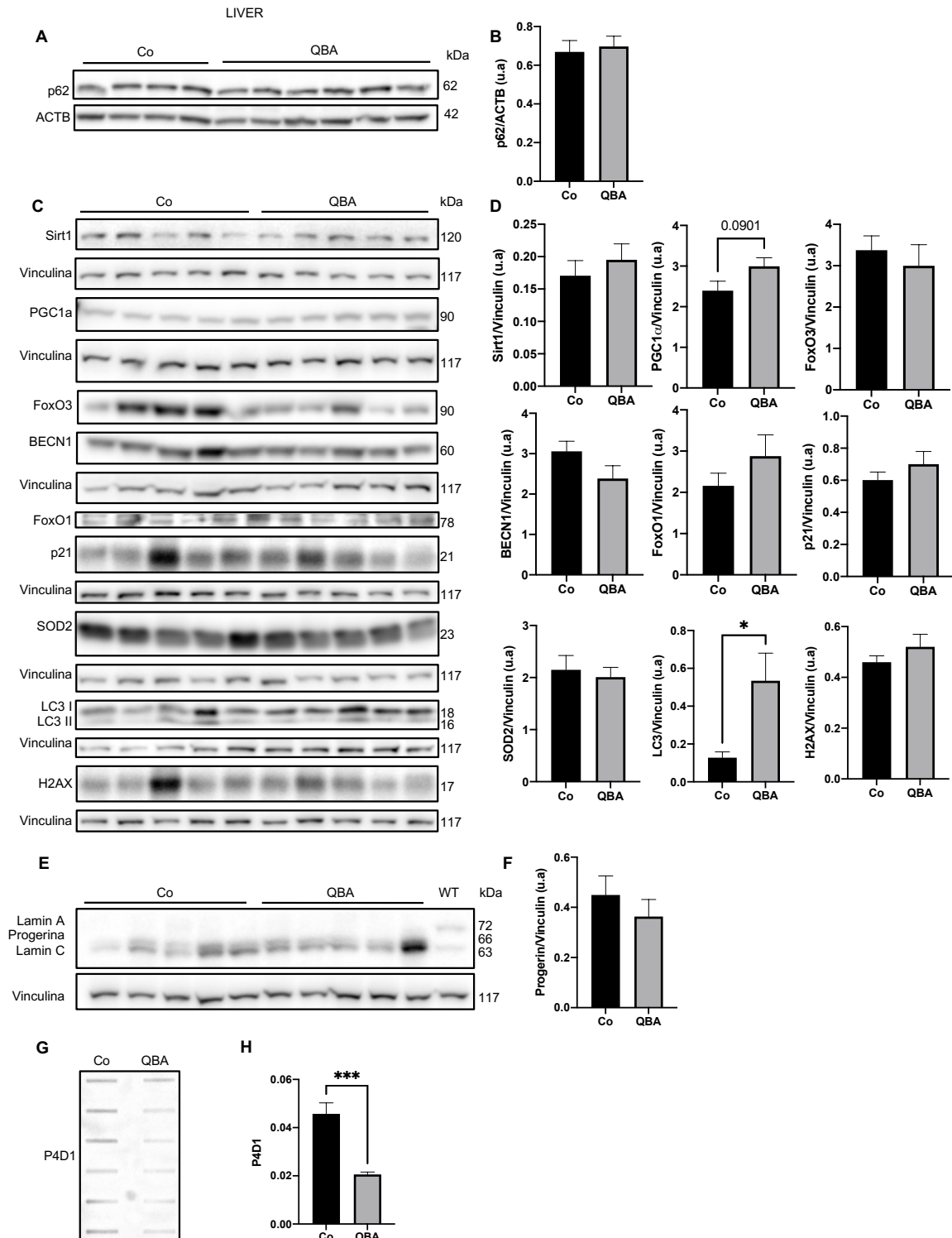


Figura 10. 4. Análisis de los niveles de proteínas de autofagia en hígado de ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tratados con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el alimento hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento. El hígado fue extraído para su análisis. A,C,E) *Blots* representativos de p62, Sirt1, PGC1 α , FoxO3, BECN1, FoxO1, p21, SOD2, lipídación de LC3, H2AX y progerina. Vinculina fue utilizada como control de carga. G) P4D1 se determinó en la parte insoluble de la muestra mediante FTA. B,D,F,H) Análisis densitométricos de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 5 ratones por condición,

representados como unidades arbitrarias (u.a.). * $p < 0.05$ respecto al control. *** $p < 0.001$ respecto al control.

Finalmente analizamos músculo ya que es uno de los órganos donde los efectos de la enfermedad son más acusados. Entre los resultados obtenidos (figura 10.5.) podemos ver como QBA provoca una bajada significativa de los valores de BECN1 y Sirt1 y un aumento significativo de SOD1. En cuanto a la progerina, no se observan cambios. Y, en contraposición a los resultados obtenidos en corazón e hígado, QBA está provocando un aumento de los niveles de P4D1, por FTA, aunque de forma no significativa.

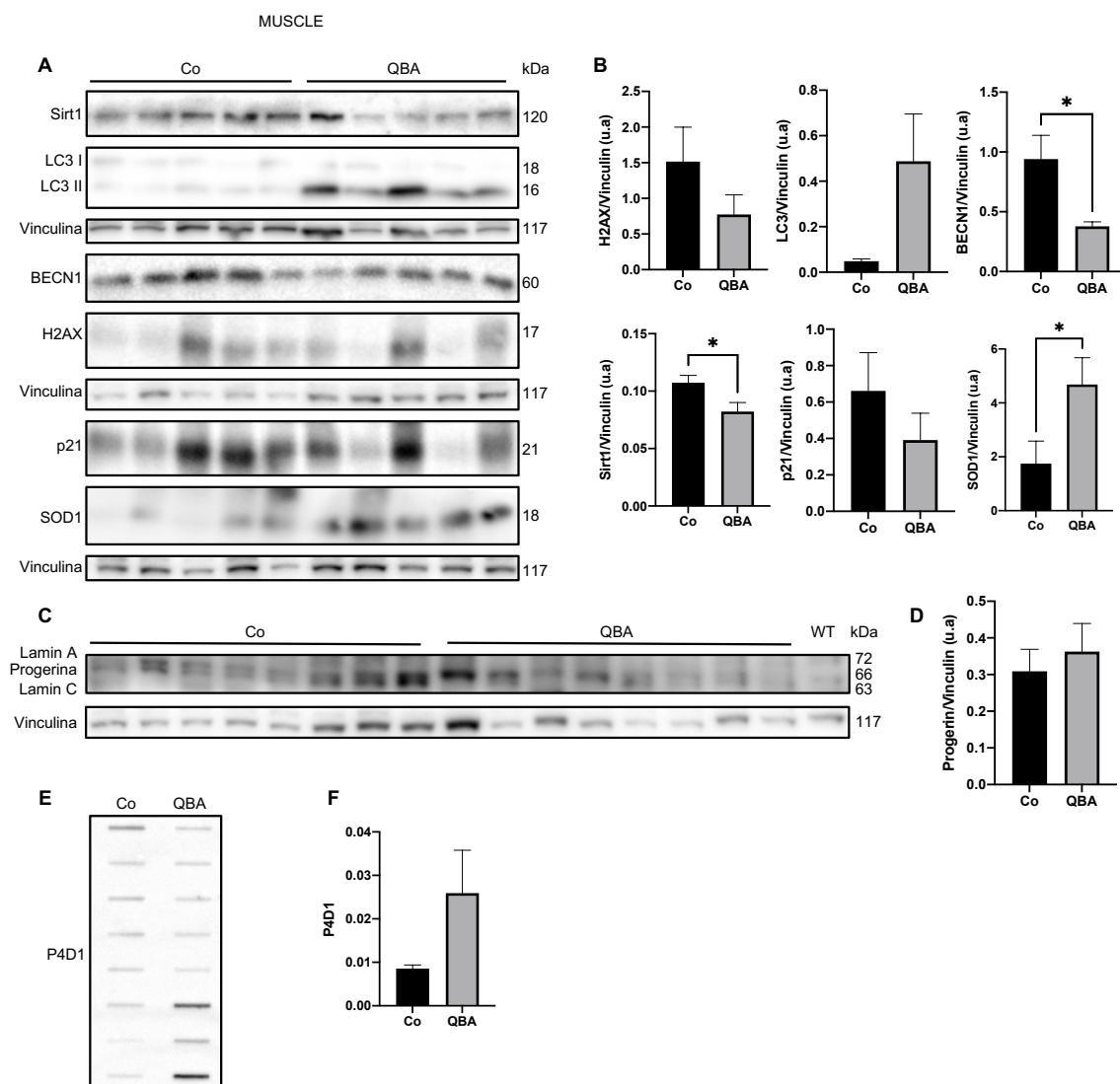


Figura 10. 5. Análisis de los niveles de proteínas de autofagia en músculo de ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tratados con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el alimento hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento. El músculo fue extraído para su análisis. A, C) Los niveles de Sirt1, lipidación de LC3, BECN1, H2AX, p21, SOD1, y progerina fueron determinados mediante *western blotting*. Vinculina fue utilizada como control de carga. E) P4D1 se determinó en la parte insoluble de la

muestra mediante FTA. B,D, F) Análisis densitométricos de las medias \pm su error estándar (SEM) de, al menos 5 ratones por condición, representados como unidades arbitrarias (u.a.). * $p < 0.05$ respecto al control.

Por último, un día antes del sacrificio de los ratones, se les realizó una medida de fuerza tras 12 semanas de tratamiento. Comprobamos que se produjo un aumento de la fuerza ejercida por los ratones tratados con QBA respecto a los controles, confirmando un posible efecto de QBA (figura 10.6.).

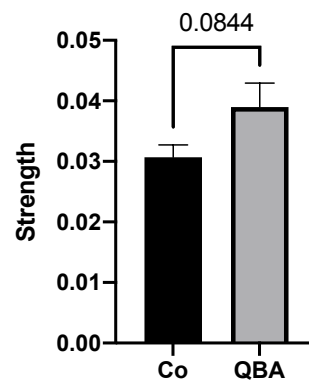


Figura 10. 6. Determinación de la fuerza de agarre de los ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tras el tratamiento con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el alimento hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento. Análisis de los niveles de fuerza ejercida por los ratones sobre un tensiómetro. Los datos representan la media \pm su error estándar (SEM) de, al menos 20 ratones.

También se realizó una medida de los niveles de glucosa justo tras su sacrificio. Una de las características de los ratones enfermos es que presentan hipoglucemia (figura 10.7.). Nuestros resultados muestran que, tras el tratamiento con QBA esta bajada en los niveles de glucosa es significativa.

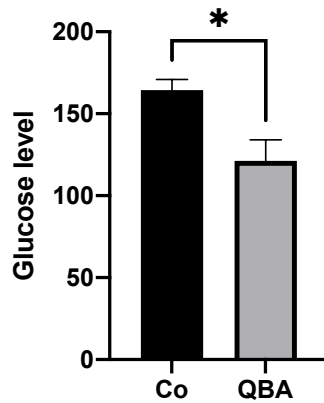


Figura 10. 7. Medida de la glucosa en sangre en ratones *Lmna*^{G609G/G609G} tras el tratamiento con QBA. Los ratones de *Lmna*^{G609G/G609G} de 6 semanas de edad fueron tratados con QBA (10 mg/kg) o su vehículo (Co), administrado en el alimento hasta el momento de su sacrificio tras 12 semanas de tratamiento. Análisis de los niveles de glucosa tras el sacrificio de los ratones tras 24 horas de ayuno. Los datos representan la media ± su error estándar (SEM) de, al menos 10 ratones *p<0.05 respecto al control.

Estos resultados podrían indicar un aumento del metabolismo y actividad de los ratones tratados con QBA pero son necesarios más análisis para determinar que otros efectos puede estar teniendo y las consecuencias de los mismos.

Todos estos resultados parecen indicar que QBA está produciendo una modulación de diferentes proteínas relacionadas con la enfermedad y este efecto es diferente dependiendo del órgano estudiado y de cómo de afectado esté por la enfermedad. Pero es necesario continuar realizando análisis para poder obtener conclusiones.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El envejecimiento es un proceso fisiológico que conlleva un descenso progresivo e irreversible de las funciones del organismo. Dado que la edad es el principal factor de riesgo en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, es lógico pensar que la búsqueda de sustancias capaces de prevenir o retrasar el envejecimiento debe ser una prioridad.

Como la autofagia es un proceso muy importante en el mantenimiento de la homeostasis neuronal, una disfunción de esta puede tener un efecto negativo sobre muchos procesos (102). Sin embargo, su inducción se ha visto que entre otros efectos beneficiosos promueve la eliminación de agregados proteicos o proteínas en mal estado, que son una de las principales características de las enfermedades neurodegenerativas.

Hay numerosos estudios que muestran las propiedades fisiológicas y farmacológicas de QBA, un compuesto de origen natural, como antitumoral, anti-inflamatorio, antibiótico o anti-hipercolesterolémico entre otras (90,91,103–106). Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han permitido dilucidar el papel de QBA como inductor de autofagia (82), así como su implicación en el incremento de la longevidad de diferentes especies (82,102).

El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha pretendido, por tanto, estudiar el impacto de QBA en diferentes procesos celulares implicados en envejecimiento y neurodegeneración.

Hemos confirmado la capacidad de QBA de inducir autofagia *in vitro* implicando a la vía de SIRT1, ya que la inhibición tanto farmacológica como genética de SIRT1 en distintas líneas celulares (Figuras 3.1.-3.4.) induce un descenso de los niveles de proteínas de autofagia. Estos resultados son similares a los que se observan al inducir autofagia con resveratrol e inhibir SIRT1 utilizando EX527 (107).

Pero QBA no solo parece modular SIRT1, también otras sirtuínas (Figura 4.) como SIRT 3 y SIRT5 que se localizan exclusivamente en la mitocondria (108) pudiendo tener un efecto sobre este orgánulo. De hecho, al igual que resveratrol, QBA mejora la función mitocondrial (109). Nuestros datos muestran que QBA promueve un incremento de los niveles de diferentes proteínas mitocondriales respecto a CCCP, como es el caso de MNF1, BNIP3L/NIX, Cox IV, TOMM20 o TIMM23, lo que puede ser indicativo de un aumento en el número de mitocondrias sanas o de nueva síntesis (Figura 5.2.). A nivel

metabólico, QBA no modula significativamente distintos parámetros mitocondriales analizados mediante la tecnología *Seahorse*. Sin embargo, al bloquear la autofagia o al inhibir SIRT1 si se produce una disminución significativa del metabolismo mitocondrial en las células tratadas con QBA. Otro hecho que confirma la importancia que tiene la activación de la autofagia promovida por QBA en la función mitocondrial, es que QBA es capaz no sólo de reducir la toxicidad inducida por 6-OHDA, en varias líneas celulares (Figuras 6.1. y 6.2.), sino que también disminuye la muerte celular asociada a ella (Figura 6.3.). Estos resultados son similares a los observados en neuronas primarias de hipocampo en las cuales QBA reduce la muerte celular y mejora la función mitocondrial (92) o en células de microglía donde mejora la neuroinflamación a través de la inducción de la autofagia regulada por FOXO1 (91).

Una de las características patológicas de las enfermedades neurodegenerativas es la aparición y acumulación de agregados proteicos. La activación de la autofagia es clave en la eliminación de estos agregados (110,111). Por ejemplo, la inhibición del proteasoma promueve la acumulación de proteínas que iban a ser eliminadas y proteínas como TRIM16, HDAC6 o la proteína α -tubulina regulan la eliminación de estos agregados (112–114). Nuestros datos muestran como QBA, el cual se ha demostrado que es un inhibidor de histonas deacetilasas (115), aumentó los niveles de α -tubulina acetilada en la lisina 40 (Figura 7.4.), de lo cual se encarga HDAC6 (116). La inhibición de la autofagia promovió una mayor acumulación de proteínas ubiquitinadas y de agregados de p62, esto fue parcialmente revertido con el tratamiento de QBA. Por tanto, al igual que rapamicina (117), nuestros datos indicarían un papel de QBA en la eliminación de agregados proteicos.

Otro de los mecanismos patogénicos característicos de las enfermedades neurodegenerativas es la inducción de senescencia celular (118). Este proceso ocurre de forma natural en las células y es necesario para determinadas funciones en el organismo, pero una sobreactivación del mismo, ya sea por fallos en sus mecanismos de control o por acumulación de señales de inducción, pueden hacer que se acumulen las células senescentes y que provoquen efectos negativos. La búsqueda de sustancias senolíticas, que eliminen estas células o sus efectos citotóxicos es muy importante (119). Analizamos si QBA podía tratarse de un compuesto senolítico ya que se ha demostrado que la inducción de autofagia en células senescentes reduce los factores específicos de senescencia (SASP) y su actividad β -galactosidasa (120). Los resultados de las figuras 9.2. y 9.3. confirman la inducción de senescencia mediante los

inductores doxorubicin y palbociclib pero no la disminución de los SASP ni la actividad β -galactosidasa en las células tratadas con QBA. Lo mismo ocurre cuando evaluamos la capacidad de QBA de prevenir que las células entren en un estado de senescencia (Figura 9.5.). Es necesario seguir realizando experimentos para confirmar una posible implicación de QBA sobre la senescencia celular. Sin embargo, sí observamos un efecto de QBA a nivel metabólico en las células senescentes. Durante la senescencia se producen cambios en el metabolismo mitocondrial. Alteraciones en la fosforilación oxidativa tienen como consecuencia que las células senescentes dependan menos de la mitocondria y más de la glucólisis como fuente de energía (121,122). En la figura 9.1. observamos una diferencia en el metabolismo mitocondrial entre células sanas y células senescentes y cómo QBA es capaz de mejorar la función mitocondrial en las células senescentes. Teniendo en consideración los resultados obtenidos *in vitro*, nos propusimos estudiar los efectos de QBA *in vivo*. La administración de QBA mediante inyección intraperitoneal en ratones ICR produjo la inducción de autofagia en corazón e hígado (Figura 2.1). El análisis del flujo de autofagia en el cerebro no mostró diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando se administró QBA de forma oral, durante un periodo de tiempo largo sí que observamos cambios significativos en los niveles de varias proteínas de autofagia en cerebro (Figura 2.2.). QBA aumentó significativamente los niveles de SIRT1 (123), incremento que lleva aparejado un aumento de PGC1 α , FoxO3 y otras proteínas implicadas en autofagia como BECN1. Además, también vimos un aumento de TFEB el cual se ha visto que es un regulador de la vía autofagia-lisosoma (124). Resultados similares se han observado al administrar concentraciones diez veces más altas de QBA, de forma oral, durante menos tiempo (125). Esto podría confirmar, no solo la activación por parte de QBA del proceso de autofagia, sino que QBA podría estar atravesando la membrana hematoencefálica, ya que se ha demostrado que ácidos grasos insaturados de mayor tamaño que QBA tienen un efecto sobre proteínas neurotóxicas (87). Esta capacidad puede ser muy importante a la hora de eliminar proteínas neurotóxicas ya que encontrar sustancias que atraviesen la barrera hematoencefálica es muy complicado debido a su baja permeabilidad (126).

Además de su implicación en autofagia, PGC1 α se ha identificado como un regulador clave de la biogénesis mitocondrial además de aumentar la actividad metabólica mitocondrial (127,128). Por otro lado, FOXO3 está implicado en la regulación de la mitofagia, mediante la regulación de la expresión de PINK1 (129,130). Por lo tanto, el

aumento de PGC1 α y FOXO3 *in vivo*, parece indicar que, efectivamente QBA tiene un efecto sobre las mitocondrias, como ya habíamos visto *in vitro*.

Es más, en base a los elevados niveles de PGC1 α , QBA podría tratarse de un mimético de restricción calórica ya que, pese a que PGC1 α suele tener unos niveles elevados en el cerebro, este incremento tan claro que observamos es similar a los que se producen en condiciones de ayuno (128,131).

Ese aumento de TFEB y BECN1 que observamos *in vivo* es parecido al que observamos en el cerebelo de ratones R6/1 que presentan la enfermedad de Huntington y a los cuales también se les administró QBA en el agua de bebida (Figura 8.2.B. y 8.3.B.). Se ha visto que una activación de TFEB disminuye la toxicidad asociada a los agregados proteicos. Además, la sobreexpresión de BECN1 retrasa la aparición y ralentiza la progresión de la enfermedad de Huntington a través de la activación de la autofagia (132). Sin embargo, en el resto de las partes del cerebro analizadas no se vio dicho efecto.

Pese a que los agregados proteicos, o cuerpos de inclusión, de mHTT causan deterioro, atrofia y muerte neuronal, cada vez hay más estudios que confirman que la toxicidad en la EH ocurre por la mHTT soluble (133,134). Los fragmentos de mHTT tienen tendencia a agregarse en forma de oligómeros solubles altamente tóxicos, que luego se van a transformar en cuerpos de inclusión, lo que reduce su citotoxicidad, indicando que los agregados no son las estructuras asociadas con la enfermedad sino que pueden proteger a las células (135,136).

De manera preliminar, nuestros resultados (Figura 8.1.) parecen indicar que se está produciendo un incremento en el número de agregados de mHTT, sobre todo en el estriado, donde ese incremento es significativo. Podríamos suponer que el efecto citoprotector de QBA, en este caso, es mediante la generación de agregados de mHTT para disminuir su citotoxicidad.

Por otro lado, nuestros resultados de la fracción soluble (Figura 8.2.-8.4.) parecen indicar que en la corteza y en el hipocampo se podría estar produciendo un bloqueo de la autofagia por parte de QBA, teniendo en cuenta los niveles de LC3 y BECN1. Un incremento de la autofagia y del SUP tiene un importante papel en la eliminación de mHTT. Sin embargo, lo que ocurre en la EH es que mHTT, antes de agregarse, inhibe el SUP y provoca una desregulación del proceso de autofagia (133,134). Se produce un defecto del reconocimiento de los cargos (137), provocando una acumulación de los agregados marcados, los cuales, pese a ser ubiquitinados no son buenos sustratos

para ser eliminados por el proteasoma (138), así como una acumulación de algunas de las proteínas implicadas en el proceso de autofagia como LC3 (Figura 8.2.A.). QBA no parece ser capaz de revertir esta desregulación.

En el caso del cerebelo si que podría estar ocurriendo una inducción de autofagia o, al menos, un inicio del proceso ya que, al ser una de las últimas partes del cerebro en verse afectadas, QBA puede estar teniendo un mayor efecto, de la misma manera que se ha visto que la inducción de autofagia por rapamicina disminuía los agregados de mHTT (138,139) pero que dicho efecto es mucho mayor en las primeras horas de la generación de los agregados (140).

Puede ser por este motivo que, en el estriado, la parte más afectada del cerebro en EH, no se aprecien efectos tras el tratamiento con QBA.

Algunos agregados son más tóxicos que otros. Los diferentes tamaños de las repeticiones de poliQ tienen diferentes efectos en la fisiología celular (141). Lo que explica por qué unas neuronas pueden morir sin inclusiones o sobrevivir con ellas. La identificación de las conformaciones que son particularmente tóxicas puede ayudar en la búsqueda de moléculas terapéuticas, que puedan inhibir ciertos tipos de agregados (142).

El principal factor de riesgo implicado en la aparición de enfermedades neurodegenerativas es el envejecimiento (143). Hay estudios que demuestran que QBA puede incrementar la vida de diferentes especies como *C. Elegans* (80) o *D. melanogaster* (82). Además, la regulación genética o farmacológica de la autofagia promueve la longevidad en los animales (144), por lo que nos propusimos estudiar si este nuevo inductor de autofagia tiene un efecto en un modelo de ratón que presenta un envejecimiento prematuro, *Lmna*^{G609G/G609G}. Nuestros resultados no muestran un incremento en la longevidad de dichos ratones tras el tratamiento con QBA administrado en el alimento (Figura 10.1.), como si se ha observado que ocurre con rapamicina (145). Tampoco cambios en su peso (Figura 10.2.). Lo que si hemos percibido es una disminución significativa de los niveles de glucosa en sangre en condiciones de ayuno (Figura 10.7.) tras el tratamiento con QBA. Varios estudios han demostrado que estos ratones suelen presentar una alteración en las actividades metabólicas, cambiando el metabolismo de lípidos y glucosa a una situación similar a ayuno, provocando una hipoglucemia basal, y una activación basal del proceso de autofagia, al contrario de lo que suele ocurrir en un envejecimiento normal (39,48). El hecho de que con QBA observemos una disminución significativa de los niveles de

glucosa podría significar que se está produciendo una inducción de autofagia, al menos en el hígado (Figura 10.4.) donde encontramos un incremento significativo de los niveles de LC3 II y un aumento cerca de significancia de PGC1 α , el cual se trata de un regulador esencial de la gluconeogénesis hepática y la oxidación de ácidos grasos (48). En cuanto a los efectos en los otros órganos analizados, no observamos un incremento de los niveles de proteínas de autofagia (Figuras 10.3. y 10.5.), que si se observó en corazón y músculo tratados con rapamicina (145). Pudiendo deberse a una necesidad de dosis mayores de QBA para inducir autofagia o a la cantidad de QBA que llega a los distintos órganos. Hay estudios que administran el tratamiento, en este caso rapamicina, encapsulada. De esta manera la fracción que sobrevive al proceso de preparación de la comida es hasta 4 veces mayor y además está más protegida de la digestión que se produce en el estómago (146).

Finalmente, se ha visto que los ratones con progeria presentan una menor fuerza de agarre (147), al afectar la enfermedad a los músculos. Rapamicina no mejora la fuerza de agarre (148), sin embargo, resveratrol, solo o en combinación con ejercicio físico en ratas envejecidas si que mejoraba la fuerza de agarre relativa que estas ratas ejercían (149). Con QBA también observamos un aumento de la fuerza de agarre ejercida por los ratones tras el tratamiento, que está muy cerca de significancia (Figura 10.6.), lo que puede significar que QBA está mejorando la fuerza muscular. Es más, el ejercicio puede regular los niveles de glucosa en sangre. Un experimento que demuestra que resveratrol mejora la fuerza muscular observó asociada una disminución en los niveles de glucosa, indicando que podría estar promoviendo la utilización de glucosa por los tejidos periféricos (150). Esto iría también de acuerdo con la bajada que observamos en los niveles de glucosa tras el tratamiento con QBA (Figura 10.7.)

En cualquier caso, es necesario seguir realizando análisis y experimentos para poder extraer conclusiones de lo que está ocurriendo en este proceso.

Teniendo en consideración todos los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral, y pese a la necesidad de seguir realizando estudios, podemos concluir que QBA parece modular distintas vías de señalización que tienen un papel clave en envejecimiento y neurodegeneración. En vista de que su mecanismo de acción es similar al de otras sustancias naturales las cuales son consideradas miméticos de restricción calórica, QBA podría postularse como uno más. Esto, junto a su capacidad para inducir autofagia y participar en la eliminación de agregados proteicos, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo convierten en una sustancia de especial interés frente a las

enfermedades neurodegenerativas, así como otras enfermedades asociadas al envejecimiento.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta tesis doctoral, podemos obtener las siguientes conclusiones:

1. QBA tiene la capacidad de inducir autofagia tanto *in vitro* como *in vivo*.
2. QBA modula los niveles de distintas sirtuinas, y en particular SIRT1, a través de la cual induce autofagia.
3. QBA mejora la función mitocondrial, reduciendo la toxicidad inducida por 6-OHDA y la muerte celular asociada a ella.
4. QBA elimina agregados de proteínas *in vitro* (*modelo*). En los ratones R6/1 (*modelo de EH*), QBA aumenta los niveles de mHTT insoluble en estriado y disminuye los niveles de agregados proteicos ubiquitinados en cerebelo.
5. QBA es capaz de mejorar el metabolismo mitocondrial en células senescentes y muestra una tendencia a la mejora de la fuerza de agarre de los ratones *Lmna*^{G609G/G609G}.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

The following conclusions can be obtain from the results presented in this doctoral thesis:

1. QBA has the ability to induce autophagy both *in vitro* and *in vivo*.
2. QBA modulates the levels of different sirtuins, and in particular SIRT1, through which it induces autophagy.
3. QBA improves mitochondrial function, reducing 6-OHDA-induced toxicity and associated cell death.
4. QBA eliminates protein aggregates *in vitro* (SH-SY5Y). In R6/1 mice (HD model), QBA increases levels of insoluble mHTT in striatum and decreases levels of ubiquitinated protein aggregates in cerebellum.
5. QBA is able to improve mitochondrial metabolism in senescence cells and shows a tendency to improve grip strength in *Lmna*^{G609G/G609G} mice.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Cheng F-F, Liu Y-L, Du J, Lin J-T. Metformin's Mechanisms in Attenuating Hallmarks of Aging and Age-Related Disease. *Aging Dis* [Internet]. 2022 Jul 11;13(4):970–86. Available from: <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2021.1213>
2. Li Z, Zhang Z, Ren Y, Wang Y, Fang J, Yue H, et al. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* [Internet]. 2021;22(2):165–87. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10522-021-09910-5>
3. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243–78.
4. López-Otín C, Pietrocola F, Roiz-Valle D, Galluzzi L, Kroemer G. Meta-hallmarks of aging and cancer. *Cell Metab*. 2023;35(1):12–35.
5. Wang K, Liu H, Hu Q, Wang L, Liu J, Zheng Z, et al. Epigenetic regulation of aging: implications for interventions of aging and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1).
6. De Ruijter AJM, Van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, Van Kuilenburg ABP. Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*. 2003;370(3):737–49.
7. Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics*. 2015;7(1):103–18.
8. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
9. Ren Z, He H, Zuo Z, Xu Z, Wei Z, Deng J. The role of different SIRT1-mediated signaling pathways in toxic injury. *Cell Mol Biol Lett*. 2019;24(1):1–10.
10. Hwang ES, Song SB. Nicotinamide is an inhibitor of SIRT1 in vitro, but can be a stimulator in cells. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(18):3347–62.
11. Chang AR, Ferrer CM, Mostoslavsky R. SIRT6, a mammalian deacylase with multitasking abilities. *Physiol Rev*. 2020;100(1):145–69.
12. Ariosa AR, Lahiri V, Lei Y, Yang Y, Yin Z, Zhang Z, et al. A perspective on the role of autophagy in cancer. *Biochim Biophys acta Mol basis Dis* [Internet]. 2021 Dec

- 1;1867(12):166262. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443921001952>
13. Lahiri V, Hawkins WD, Klionsky DJ. Watch What You (Self-) Eat: Autophagic Mechanisms that Modulate Metabolism. *Cell Metab* [Internet]. 2019 Apr 2;29(4):803–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413119301317>
 14. Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2011 Jun;14(11):2201–14. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2010.3482>
 15. Kaamiranta K, Blasiak J, Liton P, Boulton M, Klionsky DJ, Sinha D. Autophagy in age-related macular degeneration. *Autophagy* [Internet]. 2023 Feb;19(2):388–400. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2069437>
 16. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*. 2017;130(7):1209–16.
 17. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* [Internet]. 2011;147(4):728–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
 18. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(9):709–30.
 19. Miller DR, Thorburn A. Autophagy and organelle homeostasis in cancer. *Dev Cell* [Internet]. 2021 Apr 5;56(7):906–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33689692>
 20. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell* [Internet]. 2013 Jun 6;153(6):1194–217. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836174/pdf/emss-55354.pdf>
 21. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000;10(12):524–30.
 22. Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2018;20(3):233–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0037-z>

23. Baechle JJ, Chen N, Makhijani P, Winer S, Furman D, Winer DA. Chronic inflammation and the hallmarks of aging. *Mol Metab* [Internet]. 2023 Jun 15;(June):101755. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212877823000893>
24. López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F, Kroemer G. Metabolic Control of Longevity. *Cell*. 2016;166(4):802–21.
25. Grande de França NA, Rolland Y, Guyonnet S, Souto Barreto P de. The role of dietary strategies in the modulation of hallmarks of aging. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2023;87(March):101908. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2023.101908>
26. Xie Y, Liu J, Kang R, Tang D. Mitophagy Receptors in Tumor Biology. *Front cell Dev Biol* [Internet]. 2020;8(November):594203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33262988>
27. Wang Y, Xu E, Musich PR, Lin F. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(7):816–24.
28. Alula KM, Delgado-Deida Y, Callahan R, Till A, Underwood L, Thompson WE, et al. Inner mitochondrial membrane protein Prohibitin 1 mediates Nix-induced, Parkin-independent mitophagy. *Sci Rep* [Internet]. 2023 Jan 2;13(1):18. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26775-x>
29. Zeng K, Yu X, Mahaman YAR, Wang J-Z, Liu R, Li Y, et al. Defective mitophagy and the etiopathogenesis of Alzheimer’s disease. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2022 Jun 3;11(1):32. Available from: <https://translationalneurodegeneration.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40035-022-00305-1>
30. Pickles S, Vigié P, Youle RJ. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr Biol*. 2018;28(4):R170–85.
31. Lin C, Tsai C. PINK1/parkin-mediated mitophagy pathway is related to neuroprotection by carnitine acid in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019 Mar;125(January):430–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.027>
32. Rodolfo C, Campello S, Cecconi F. Mitophagy in neurodegenerative diseases.

- Neurochem Int [Internet]. 2018;117:156–66. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.004>
33. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular senescence: Aging, cancer, and injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047–78.
 34. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2010;5(9):99–118. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078217>
 35. Campisi J. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685–705.
 36. Freund A, Orjalo A V., Desprez PY, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238–46.
 37. Villa-Bellosta R. ATP-based therapy prevents vascular calcification and extends longevity in a mouse model of Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(47):23698–704.
 38. Villa-Bellosta R. Dietary magnesium supplementation improves lifespan in a mouse model of progeria. *EMBO Mol Med*. 2020;12(10):1–13.
 39. Fanjul V, Jorge I, Camafeita E, Macías Á, González-Gómez C, Baretino A, et al. Identification of common cardiometabolic alterations and deregulated pathways in mouse and pig models of aging. *Aging Cell*. 2020;19(9):1–17.
 40. Koblan LW, Erdos MR, Wilson C, Cabral WA, Levy JM, Xiong Z, et al. In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* [Internet]. 2021 Jan;589(7843):608–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33408413>
 41. Chen X, Yao H, Kashif M, Revêchon G, Eriksson M, Hu J, et al. A small-molecule icmt inhibitor delays senescence of hutchinson-gilford progeria syndrome cells. *Elife*. 2021;10:1–10.
 42. Sola-Carvajal A, Revêchon G, Helgadottir HT, Whisenant D, Hagblom R, Döhla J, et al. Accumulation of Progerin Affects the Symmetry of Cell Division and Is Associated with Impaired Wnt Signaling and the Mislocalization of Nuclear Envelope Proteins. *J Invest*

- Dermatol. 2019;139(11):2272-2280.e12.
43. Aguado J, Sola-Carvajal A, Cancila V, Revêchon G, Ong PF, Jones-Weinert CW, et al. Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13018-3>
 44. Whisenant D, Lim K, Revêchon G, Yao H, Bergo MO, Machtel P, et al. Transient expression of an adenine base editor corrects the Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation and improves the skin phenotype in mice. *Nat Commun*. 2022;13(1):1–13.
 45. Harhour K, Frankel D, Bartoli C, Roll P, De Sandre-Giovannoli A, Lévy N. An overview of treatment strategies for hutchinson-gilford progeria syndrome. *Nucleus*. 2018;9(1):265–76.
 46. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol* [Internet]. 2007 Jan;211(2):134–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17200947>
 47. Cuervo AM. Autophagy: In sickness and in health. *Trends Cell Biol*. 2004;14(2):70–7.
 48. Mariño G, Ugalde AP, Salvador-Montoliu N, Varela I, Quirós PM, Cadiñanos J, et al. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum Mol Genet*. 2008;17(14):2196–211.
 49. Graziotto JJ, Cao K, Collins FS, Krainc D. Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders. *Autophagy* [Internet]. 2012 Jan;8(1):147–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170152>
 50. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* [Internet]. 2009 Jul 16;460(7253):392–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22837538>
 51. Liu B, Ghosh S, Yang X, Zheng H, Liu X, Wang Z, et al. Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-

- based progeria. *Cell Metab* [Internet]. 2012;16(6):738–50. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.007>
52. Vaquer-Alicea J, Diamond MI. Propagation of protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Biochem*. 2019;88:785–810.
 53. Camandola S, Mattson MP. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J* [Internet]. 2017 Jun 1;36(11):1474–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438892>
 54. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2019;15(10):565–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
 55. Luo F, Sandhu AF, Rungratanawanich W, Williams GE, Akbar M, Zhou S, et al. Melatonin and autophagy in aging-related neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(19):1–31.
 56. Watanabe Y, Taguchi K, Tanaka M. Ubiquitin, Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Cells* [Internet]. 2020 Sep 2;9(9):1–15. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32887381>
 57. Park H, Kang J-H, Lee S. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: A Hunter for Aggregates. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 10;21(9):1–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32397599>
 58. Pan L, Feigin A. Huntington’s Disease: New Frontiers in Therapeutics. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2021;21(3).
 59. Luthi-Carter R, Cha J-HJ. Mechanisms of transcriptional dysregulation in Huntington’s disease. *Clin Neurosci Res* [Internet]. 2003 Sep;3(3):165–77. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566277203000598>
 60. Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pagès M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelières FP, et al. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* [Internet]. 2004 Jul 9;118(1):127–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242649>

61. Trushina E, Dyer RB, Badger JD, Ure D, Eide L, Tran DD, et al. Mutant Huntingtin Impairs Axonal Trafficking in Mammalian Neurons In Vivo and In Vitro. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2004 Sep 1;24(18):8195–209. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1128/MCB.24.18.8195-8209.2004>
62. Wong YC, Holzbaur ELF. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J Neurosci* [Internet]. 2014 Jan 22;34(4):1293–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453320>
63. Martin DDO, Ladha S, Ehrnhoefer DE, Hayden MR. Autophagy in Huntington disease and huntingtin in autophagy. *Trends Neurosci* [Internet]. 2015 Jan;38(1):26–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.09.003>
64. Heng MY, Duong DK, Albin RL, Tallaksen-Greene SJ, Hunter JM, Lesort MJ, et al. Early autophagic response in a novel knock-in model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2010 Oct 1;19(19):3702–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16787406>
65. Ochaba J, Lukacsovich T, Csikos G, Zheng S, Margulis J, Salazar L, et al. Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Nov 25;111(47):16889–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385587>
66. Rui Y-N, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, et al. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2015 Mar;17(3):262–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686248>
67. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*. 2010 May;13(5):567–76.
68. Franco-Iborra S, Plaza-Zabala A, Montpeyo M, Sebastian D, Vila M, Martinez-Vicente M. Mutant HTT (huntingtin) impairs mitophagy in a cellular model of Huntington disease. *Autophagy* [Internet]. 2021;17(3):672–89. Available from:

- <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1728096>
69. Franco-Iborra S, Vila M, Perier C. Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases: Focus on Parkinson's Disease and Huntington's Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 May 23;12(MAY):342. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00342/full>
 70. Kim J, Moody JP, Edgerly CK, Bordiuk OL, Cormier K, Smith K, et al. Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2010 Oct 15;19(20):3919–35. Available from:
<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddq306>
 71. Mochel F, Durant B, Meng X, O'Callaghan J, Yu H, Brouillet E, et al. Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jan 6;287(2):1361–70. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22123819>
 72. Shirendeb U, Reddy AP, Manczak M, Calkins MJ, Mao P, Tagle DA, et al. Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2011 Apr 1;20(7):1438–55. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257639>
 73. Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, Krainc D. Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration. *Cell*. 2006;127(1):59–69.
 74. Chang DTW, Rintoul GL, Pandipati S, Reynolds IJ. Mutant huntingtin aggregates impair mitochondrial movement and trafficking in cortical neurons. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2006 May;22(2):388–400. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16473015>
 75. Weydt P, Pineda V V., Torrence AE, Libby RT, Satterfield TF, Lazarowski ER, et al. Thermoregulatory and metabolic defects in Huntington's disease transgenic mice implicate PGC-1 α in Huntington's disease neurodegeneration. *Cell Metab* [Internet].

- 2006 Nov;4(5):349–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055784>
76. Naia L, Ferreira IL, Cunha-Oliveira T, Duarte AI, Ribeiro M, Rosenstock TR, et al. Activation of IGF-1 and insulin signaling pathways ameliorate mitochondrial function and energy metabolism in Huntington's Disease human lymphoblasts. *Mol Neurobiol* [Internet]. 2015 Feb;51(1):331–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24841383>
 77. Stack EC, Matson WR, Ferrante RJ. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2008 Dec;1147:79–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19076433>
 78. Shirendeb UP, Calkins MJ, Manczak M, Anekonda V, Dufour B, McBride JL, et al. Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2012 Jan 15;21(2):406–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997870>
 79. Soares TR, Reis SD, Pinho BR, Duchen MR, Oliveira JMA. Targeting the proteostasis network in Huntington's disease. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2019 Jan;49(January 2019):92–103. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.11.006>
 80. Honda Y, Araki Y, Hata T, Ichihara K, Ito M, Tanaka M, et al. 10-Hydroxy-2-decenoic Acid, the Major Lipid Component of Royal Jelly, Extends the Lifespan of *Caenorhabditis elegans* through Dietary Restriction and Target of Rapamycin Signaling. *J Aging Res* [Internet]. 2015;2015:425261. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jar/2015/425261/>
 81. Salminen A, Kaarniranta K. Regulation of the aging process by autophagy. *Trends Mol Med*. 2009;15(5):217–24.
 82. Martínez-Chacón G, Paredes-Barquero M, Yakhine-Diop SMS, Uribe-Carretero E, Bargiela A, Sabater-Arcis M, et al. Neuroprotective properties of queen bee acid by autophagy induction. *Cell Biol Toxicol* [Internet]. 2021 Aug 27; Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10565-021-09625-w>

83. Niso-Santano M, González-Polo RA, Paredes-Barquero M, Fuentes JM, Aschner M. Natural Products in the Promotion of Healthspan and Longevity. *Clin Pharmacol Transl Med* [Internet]. 2019;3(1):149–51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6666427/pdf/nihms-1042095.pdf>
84. Sugiyama T, Takahashi K, Mori H. Royal Jelly Acid, 10-Hydroxy-trans-2-Decenoic Acid, as a Modulator of the Innate Immune Responses. *Endocrine, Metab Immune Disord Targets*. 2012;12(4):368–76.
85. Honda Y, Fujita Y, Maruyama H, Araki Y, Ichihara K, Sato A, et al. Lifespan-extending effects of royal jelly and its related substances on the nematode *caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2011;6(8):1–10.
86. Mihajlovic D, Rajkovic I, Chinou I, Colic M. Dose-dependent immunomodulatory effects of 10-hydroxy-2-decenoic acid on human monocyte-derived dendritic cells. *J Funct Foods*. 2013;5(2):838–46.
87. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. Royal jelly and its unique fatty acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, promote neurogenesis by neural stem/progenitor cells in vitro. *Biomed Res*. 2007 Oct;28(5):261–6.
88. Lin XM, Liu S Bin, Luo YH, Xu WT, Zhang Y, Zhang T, et al. 10-HDA Induces ROS-Mediated Apoptosis in A549 Human Lung Cancer Cells by Regulating the MAPK, STAT3, NF- κ B, and TGF- β 1 Signaling Pathways. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
89. Yang YC, Chou WM, Widowati DA, Lin IP, Peng CC. 10-Hydroxy-2-Decenoic Acid of Royal Jelly Exhibits Bactericide and Anti-Inflammatory Activity in Human Colon Cancer Cells. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):1–7.
90. Peng CC, Sun HT, Lin IP, Kuo PC, Li JC. The functional property of royal jelly 10-hydroxy-2-decenoic acid as a melanogenesis inhibitor. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–9.
91. You M, Miao Z, Tian J, Hu F. Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid protects against LPS-induced neuroinflammation through FOXO1-mediated activation of autophagy. *Eur J Nutr* [Internet]. 2020;59(7):2875–92. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00394->

019-02128-9

92. Weiser MJ, Grimshaw V, Wynalda KM, Mohajeri MH, Butt CM. Long-Term Administration of Queen Bee Acid (QBA) to Rodents Reduces Anxiety-Like Behavior, Promotes Neuronal Health and Improves Body Composition. *Nutrients*. 2017 Dec;10(1).
93. Usui S, Soda M, Iguchi K, Abe N, Oyama M, Nakayama T, et al. Down-regulation of aquaporin 9 gene transcription by 10-hydroxy-2-decenoic acid: A major fatty acid in royal jelly. *Food Sci Nutr [Internet]*. 2019 Nov;7(11):3819–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31763031>
94. Watadani R, Kotoh J, Sasaki D, Someya A, Matsumoto K, Maeda A. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a natural product, improves hyperglycemia and insulin resistance in obese/diabetic KK-Ay mice, but does not prevent obesity. *J Vet Med Sci*. 2017;79(9):1596–602.
95. Tsuchiya Y, Hayashi M, Nagamatsu K, Ono T, Kamakura M, Iwata T, et al. The key royal jelly component 10-hydroxy-2-decenoic acid protects against bone loss by inhibiting NF- κ B signaling downstream of FFAR4. *J Biol Chem*. 2020;295(34):12224–32.
96. Paredes-Barquero M, Niso-Santano M, Fuentes JM, Martínez-Chacón G. In vitro and in vivo models to study the biological and pharmacological properties of queen bee acid (QBA, 10-hydroxy-2-decenoic acid): A systematic review. *J Funct Foods [Internet]*. 2022 Jul;94(May):105143. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464622002134>
97. Martínez-Chacón G, Paredes-Barquero M, Yakhine-Diop SMS, Uribe-Carretero E, Bargiela A, Sabater-Arcis M, et al. Neuroprotective properties of queen bee acid by autophagy induction. *Cell Biol Toxicol*. 2021 Aug;
98. Reiner A, Dragatsis I, Dietrich P. Genetics and Neuropathology of Huntington's Disease. In 2011. p. 325–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813282000146>
99. Jimenez-Sanchez M, Licitra F, Underwood BR, Rubinsztein DC. Huntington's disease:

- Mechanisms of pathogenesis and therapeutic strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(7):1–22.
100. Sorolla MA, Rodríguez-Colman MJ, Tamarit J, Ortega Z, Lucas JJ, Ferrer I, et al. Protein oxidation in Huntington disease affects energy production and vitamin B6 metabolism. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010;49(4):612–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.016>
 101. Hernandez-Gonzalez F, Prats N, Ramponi V, López-Domínguez JA, Meyer K, Aguilera M, et al. Human senescent fibroblasts trigger progressive lung fibrosis in mice. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2023 Jul 1;15:1–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37393107>
 102. Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, et al. Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*. 2017;93(5):1015–34.
 103. TOWNSEND GF, MORGAN JF, TOLNAI S, HAZLETT B, MORTON HJ, SHUEL RW. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. I. 10-Hydroxy-2-decenoic acid from royal jelly. *Cancer Res* [Internet]. 1960 May;20:503–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13839101>
 104. Blum MS, Novak AF, Taber S. 10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science* [Internet]. 1959 Aug 21;130(3373):452–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13675771>
 105. Xu D, Mei X, Xu S. [The research of 10-hydroxy-2-decenoic acid on experiment hyperlipoidemic rat]. *Zhong Yao Cai* [Internet]. 2002 May;25(5):346–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583195>
 106. Izuta H, Chikaraishi Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. 10-Hydroxy-2-decenoic acid, a major fatty acid from royal jelly, inhibits VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2009 Dec;6(4):489–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955252>
 107. Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, et al. Deacetylation of nuclear LC3

- drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell*. 2015 Feb;57(3):456–66.
108. Maldonado M, Chen J, Duan H, Huang T, Jiang G, Zhong Y. High calorie diet background alters the expression of sirtuins in the testes of mice under caloric restriction. *Transl Med Aging [Internet]*. 2021;5:10–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tma.2021.02.001>
109. Cheema NJ, Cameron JM, Hood DA. Effect of rapamycin on mitochondria and lysosomes in fibroblasts from patients with mtDNA mutations. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2021 Jul;321(1):C176–86.
110. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20567–74.
111. Riley BE, Kaiser SE, Shaler TA, Ng ACY, Hara T, Hipp MS, et al. Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: A potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. *J Cell Biol*. 2010;191(3):537–52.
112. Jena KK, Kolapalli SP, Mehto S, Nath P, Das B, Sahoo PK, et al. TRIM16 controls assembly and degradation of protein aggregates by modulating the p62-NRF2 axis and autophagy. *EMBO J*. 2018;37(18).
113. Lee J-Y, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao Y-S, et al. HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J*. 2010 Mar;29(5):969–80.
114. Xie R, Nguyen S, McKeehan WL, Liu L. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol [Internet]*. 2010;11(1):89. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/11/89>
115. Spannhoff A, Kim YK, Raynal NJ-M, Gharibyan V, Su M-B, Zhou Y-Y, et al. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Rep [Internet]*. 2011 Mar;12(3):238–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331099>

116. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J*. 2003 Mar;22(5):1168–79.
117. Lin D-S, Huang Y-W, Lee T-H, Chang L, Huang Z-D, Wu T-Y, et al. Rapamycin Alleviates Protein Aggregates, Reduces Neuroinflammation, and Rescues Demyelination in Globoid Cell Leukodystrophy. *Cells* [Internet]. 2023 Mar 24;12(7):993. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/7/993>
118. Crouch J, Shvedova M, Thanapaul RJRS, Botchkarev V, Roh D. Epigenetic Regulation of Cellular Senescence. *Cells*. 2022 Feb;11(4).
119. Triana-Martínez F, Picallos-Rabina P, Da Silva-Álvarez S, Pietrocola F, Llanos S, Rodilla V, et al. Identification and characterization of Cardiac Glycosides as senolytic compounds. *Nat Commun*. 2019 Oct;10(1):4731.
120. Llanos S, Megias D, Blanco-Aparicio C, Hernández-Encinas E, Rovira M, Pietrocola F, et al. Lysosomal trapping of palbociclib and its functional implications. *Oncogene* [Internet]. 2019;38(20):3886–902. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-019-0695-8>
121. Kang HT, Park JT, Choi K, Choi HJC, Jung CW, Kim GR, et al. Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell*. 2017 Jun;16(3):541–50.
122. Kang HT, Park JT, Choi K, Kim Y, Choi HJC, Jung CW, et al. Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2017;13(6):616–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2342>
123. Suzuki M, Bartlett JD. Sirtuin1 and autophagy protect cells from fluoride-induced cell stress. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2014 Feb;1842(2):245–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443913003542>
124. Liu Y, Xue X, Zhang H, Che X, Luo J, Wang P, et al. Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia. *Autophagy* [Internet]. 2019;15(3):493–509. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1531196>

125. You M, Miao Z, Pan Y, Hu F. Trans-10-hydroxy-2-decenoic acid alleviates LPS-induced blood-brain barrier dysfunction by activating the AMPK/PI3K/AKT pathway. *Eur J Pharmacol*. 2019 Dec;865:172736.
126. Boland B, Yu WH, Corti O, Mollereau B, Henriques A, Bezard E, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2018 Sep;17(9):660–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30116051>
127. Tsunemi T, Ashe TD, Morrison BE, Soriano KR, Au J, Roque RAV, et al. PGC-1 α rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci Transl Med*. 2012 Jul;4(142):142ra97.
128. Cheng A, Wan R, Yang J-L, Kamimura N, Son TG, Ouyang X, et al. Involvement of PGC-1 α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. *Nat Commun* [Internet]. 2012;3(1):1250. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
129. Mei Y, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H. FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5153–8.
130. Audesse AJ, Dhakal S, Hassell L-A, Gardell Z, Nemtsova Y, Webb AE. FOXO3 directly regulates an autophagy network to functionally regulate proteostasis in adult neural stem cells. *PLoS Genet*. 2019 Apr;15(4):e1008097.
131. Liang H, Ward WF. PGC-1 α : A key regulator of energy metabolism. Vol. 30, *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*. 2006. p. 145–51.
132. Brattås PL, Hersbach BA, Madsen S, Petri R, Jakobsson J, Pircs K. Impact of differential and time-dependent autophagy activation on therapeutic efficacy in a model of Huntington disease. *Autophagy* [Internet]. 2021;17(6):1316–29. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1760014>
133. Leitman J, Ulrich Hartl F, Lederkremer GZ. Soluble forms of polyQ-expanded huntingtin rather than large aggregates cause endoplasmic reticulum stress. *Nat Commun*.

- 2013;4:2753.
134. Long J, Luo X, Fang D, Song H, Fang W, Shan H, et al. Discovery of an autophagy inducer J3 to lower mutant huntingtin and alleviate Huntington's disease-related phenotype. *Cell Biosci* [Internet]. 2022 Oct 8;12(1):167. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00906-3>
 135. Takahashi T, Kikuchi S, Katada S, Nagai Y, Nishizawa M, Onodera O. Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Hum Mol Genet*. 2008 Feb;17(3):345–56.
 136. Luis-Ravelo D, Estévez-Silva H, Barroso-Chinea P, Afonso-Oramas D, Salas-Hernández J, Rodríguez-Núñez J, et al. Pramipexole reduces soluble mutant huntingtin and protects striatal neurons through dopamine D3 receptors in a genetic model of Huntington's disease. *Exp Neurol*. 2018 Jan;299(Pt A):137–47.
 137. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* [Internet]. 2010 May;13(5):567–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20383138>
 138. Shibata M, Lu T, Furuya T, Degterev A, Mizushima N, Yoshimori T, et al. Regulation of intracellular accumulation of mutant huntingtin by beclin 1. *J Biol Chem* [Internet]. 2006;281(20):14474–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M600364200>
 139. Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, Oroz LG, Underwood BR, Pangalos MN, et al. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2006 Feb 1;15(3):433–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16368705>
 140. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*. 2004;36(6):585–95.
 141. Morton AJ, Glynn D, Leavens W, Zheng Z, Faull RLM, Skepper JN, et al. Paradoxical delay in the onset of disease caused by super-long CAG repeat expansions in R6/2

- mice. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2009;33(3):331–41. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.015>
142. Hoffner G, Djian P. Polyglutamine Aggregation in Huntington Disease: Does Structure Determine Toxicity? *Mol Neurobiol*. 2015 Dec;52(3):1297–314.
143. Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*. 2019 Oct;15(10):565–81.
144. Vellai T, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends Cell Biol*. 2009;19(10):487–94.
145. Ramos FJ, Chen SC, Garelick MG, Dai D-F, Liao C-Y, Schreiber KH, et al. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Jul 25;4(144):144ra103. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
146. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* [Internet]. 2009 Jul 16;460(7253):392–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08221>
147. Osorio FG, Navarro CL, Cadiñanos J, López-Mejía IC, Quirós PM, Bartoli C, et al. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med*. 2011 Oct;3(106):106ra107.
148. Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schröder S, Adler T, et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest*. 2013 Aug;123(8):3272–91.
149. Liao ZY, Chen JL, Xiao MH, Sun Y, Zhao YX, Pu D, et al. The effect of exercise, resveratrol or their combination on Sarcopenia in aged rats via regulation of AMPK/Sirt1 pathway. *Exp Gerontol* [Internet]. 2017;98(May):177–83. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.08.032>
150. Kan NW, Ho CS, Chiu YS, Huang WC, Chen PY, Tung YT, et al. Effects of resveratrol supplementation and exercise training on exercise performance in middle-aged mice.

Molecules. 2016;21(5):1–12.

