



# PROCEDIMIENTOS, EXPERIMENTACIÓN E INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

## PROTOSCOLOS PARA UN LABORATORIO DE NEUROCIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA  
DE LA FACULTAD DE ENFERMERÍA Y TERAPIA OCUPACIONAL  
DE LA UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Guadalupe Martínez Chacón y José Manuel Fuentes Rodríguez (coordinadores)

S.M.S. Yakhine Diop, M. Rodríguez Arribas, M. Paredes Barquero,  
E. Alegre Cortés, S. Canales Cortés, G. Duque González, A. Giménez Bejarano,  
M. P. Delgado Luceño, E. Uribe Carretero, M. Niso Santano, R. A. González Polo

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA





---

# Procedimientos, experimentación e investigación en enfermedades neurodegenerativas

Protocolos para un laboratorio de neurociencias



---

Guadalupe Martínez Chacón  
José Manuel Fuentes Rodríguez (coords.)

# Procedimientos, experimentación e investigación en enfermedades neurodegenerativas

Protocolos para un laboratorio de neurociencias



Cáceres  
2021

Esta obra ha sido objeto de una doble evaluación, una interna, llevada a cabo por el Consejo Asesor del Servicio de Publicaciones de la Universidad de Extremadura, y otra externa, efectuada por evaluadores independientes de reconocido prestigio en el campo temático de la misma.

- © Guadalupe Martínez-Chacón y José Manuel Fuentes-Rodríguez (coords.), para esta edición
- © De los autores, para esta edición
- © Universidad de Extremadura, para esta edición

Las figuras de *Western blotting* fueron realizadas y obtenidas en el laboratorio por Guadalupe Martínez Chacón. Las figuras de microscopía fueron realizadas y obtenidas en el laboratorio por Mario Rodríguez Arribas. Las ilustraciones que aparecen en el libro se diseñaron con el programa biorender (<<https://biorender.com/>>) por Guadalupe Martínez Chacón

Tipografía utilizada: Minion Pro (para cubierta), Adobe Caslon Pro, Antique Olive Std e ITC Goudy Sans Std (para páginas iniciales y para el texto de la obra)

Diseño de cubierta: Raquel Lozano Delgado

Edita:

Universidad de Extremadura. Servicio de Publicaciones  
Plaza de Caldereros, 2. 10003 Cáceres (España)  
Tel. 927 257 041; Fax 927 257 046  
[publicac@unex.es](mailto:publicac@unex.es)  
<http://www.unex.es/publicaciones>

I.S.B.N.: 978-84-09-30816-3 (edición digital)

*Maquetación y pdf multimedia:* Dosgraphic, s. l.

Cáceres, 2021





Dedicado a mi hijo Enrique,  
que antes de su nacimiento, me acompañó en la elaboración.



Esta obra coordinada por la Dra. Guadalupe Martínez Chacón y el Dr. José Manuel Fuentes Rodríguez ha sido llevada a cabo por los autores constituidos en el equipo investigador.

Este grupo de investigación está adscrito a la Universidad de Extremadura, Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, perteneciente a CIBERNED y a INUBE.

El grupo PARK, quiere seguir mejorando, por ello ha querido plasmar en este libro diez años de trabajo. Esta obra pretende ser un complemento de laboratorio, ese cuaderno de protocolos que irá actualizándose y mejorando con el paso de los años y de la experiencia.

Todos los protocolos usados en estos años quedan registrados en este libro titulado: *Procedimientos, Experimentación e Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas: Protocolos para un laboratorio en Neurociencias* llevadas a cabo en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética de la Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional de la Universidad de Extremadura.



# ÍNDICE

	<u>Páginas</u>
<b>Capítulo 1. Reactivos y tampones .....</b>	<b>15</b>
<i>M.P. Delgado Luceño, M. Rodríguez Arribas y G. Martínez Chacón</i>	
1.1. Reactivos y tampones usados en cultivos celulares.....	15
1.1.1. Solución madre tampón fosfato salino (PBS 10X) .....	15
1.1.2. Tampón fosfato salino (PBS 1X).....	16
1.1.3. Solución de congelación celular .....	16
1.2. Tampones usados para la técnica de <i>Western blotting</i> .....	17
1.2.1. Tampón de carga 5X para geles de acrilamida.....	17
1.2.2. Tampón de electroforesis TGS 10X ( <i>Tris Glycine SDS Buffer</i> ) (Laemmli) .....	18
1.2.3. Tampón CAPS 10X (100 mM).....	18
1.2.4. Tampón CAPS 1X (10 mM).....	18
1.2.5. Tampón Tris Glicina Metanol.....	19
1.2.6. Tampón salino: <i>Tris buffer saline</i> (TBS 10X) .....	19
1.2.7. Tampón salino: <i>Tris Tween</i> (TTBS 1X del inglés <i>Tween tris buffer saline</i> ).....	20
1.2.8. Azul Brillante de <i>Coomassie</i> : teñidor de gel de acrilamida.....	21
1.2.9. Rojo <i>Ponceau</i> : Compuesto para teñir membrana de PVDF .....	22
1.2.10. Borrador de membrana PVDF .....	22
1.3. Tampones usados para la técnica de inmunofluorescencia .....	23
1.3.1. Tritón X-100 al 0,1%.....	23
1.3.2. Paraformaldehído (PFA) al 4% .....	23
1.3.3. BSA 0,1% .....	23
1.4. Tampones usados para lisado celular y de tejidos .....	24
1.4.1. Tampón NP40 0,5% .....	24
1.4.2. SB 1X al 2% .....	25

1.4.3. Tampón RIPA Buffer .....	25
1.4.4. Tritón X-100 (hígado y corazón) .....	26
1.4.5. Tampón de lisis Tritón X-100.....	27
1.4.6. Tampón de lisis SDS 2%.....	27
1.4.7. Tampón de lisis nuclear .....	28
1.4.8. Tampón de lisis citosólico .....	28
<b>Capítulo 2. Cultivos celulares .....</b>	<b>29</b>
<i>E. Alegre Cortés, G. Martínez Chacón, S.M.S. Yakhine Diop, M. Rodríguez Arribas, M. Paredes Barquero, S. Canales Cortés, G. Duque González, A. Giménez Bejarano, M.P. Delgado Luceño, E. Uribe Carretero, M. Niso Santano, R.A. González Polo y J.M Fuentes Rodríguez</i>	
2.1. Descongelación.....	29
2.2. Mantenimiento celular.....	30
2.3. Congelación.....	31
2.4. Siembra celular.....	31
2.5. Protocolo para obtener diferenciación de la línea celular SH-SY5Y.....	33
<i>A. Giménez Bejarano y M. Niso Santano</i>	
2.5.1. Preparación de medios y reactivos .....	33
2.5.2. Diferenciación de SH-SY5Y .....	33
<b>Capítulo 3. Extracción de proteínas .....</b>	<b>35</b>
<i>G. Martínez Chacón, J.M. Fuentes Rodríguez, S.M.S. Yakhine Diop, M. Rodríguez Arribas, M. Paredes Barquero, E. Alegre Cortés, S. Canales Cortés, G. Duque González, A. Giménez Bejarano, M.P. Delgado Luceño, E. Uribe Carretero, M. Niso Santano y R.A. González Polo</i>	
3.1. Lisado a partir de cultivos celulares .....	35
3.2. Aislamiento de proteínas: fracción soluble e insoluble .....	36
3.3. Aislamiento de proteínas: fracción nuclear y citosólica.....	37
3.4. Aislamiento de proteínas: fracción mitocondrial y citosólica .....	38
<i>S.M.S. Yakhine Diop, S. Canales Cortés, R.A. González Polo y G. Duque González</i>	
3.5. Aislamiento de proteínas partir de tejidos.....	40
<i>G. Martínez Chacón y M. Paredes Barquero</i>	
<b>Capítulo 4. Análisis de extracto proteico por Western blotting .....</b>	<b>43</b>
<i>G. Martínez Chacón, J.M. Fuentes Rodríguez, S.M.S. Yakhine Diop, M. Rodríguez Arribas, M. Paredes Barquero, E. Alegre Cortés, S. Canales Cortés, G. Duque González, A. Giménez Bejarano, M.P. Delgado Luceño, E. Uribe Carretero, M. Niso Santano y R.A. González Polo</i>	
4.1. Electroforesis .....	43
4.2. Transferencia de proteínas .....	45
4.3. Detección de proteínas.....	46

4.4. Revelado .....	46
4.5. Borrado de membranas .....	47
<b>Capítulo 5. Extracción de RNA.....</b>	<b>49</b>
<i>G. Martínez Chacón y S.M.S. Yakhine Diop</i>	
5.1. A partir de cultivos celulares mediante TRIsure .....	49
5.2. A partir de sangre humana mediante TRIsure.....	50
5.3. A partir de tejidos animales mediante TRIsure .....	51
5.4. <i>RNeasy Mini Kit</i> .....	52
5.5. Retrotranscripción de RNA a cDNA.....	53
5.6. Protocolo de qPCR.....	54
<b>Capítulo 6. Microscopia electrónica.....</b>	<b>57</b>
<i>S.M.S. Yakhine Diop, G. Martínez Chacón, S. Canales Cortés, M. Paredes Barquero, M. Niso Santano y R. González Polo</i>	
<b>Capítulo 7. Técnica de inmunoprecipitación .....</b>	<b>59</b>
<i>S.M.S. Yakhine Diop y G. Martínez Chacón</i>	
<b>Capítulo 8. Técnica de inmunofluorescencia .....</b>	<b>61</b>
<i>M. Rodríguez Arribas y E. Uribe Carretero</i>	
<b>Capítulo 9. Técnica de silenciamiento génico .....</b>	<b>65</b>
<i>G. Martínez Chacón, J.M. Fuentes Rodríguez, S.M.S. Yakhine Diop, M. Rodríguez Arribas, M. Paredes Barquero, E. Alegre Cortés, S. Canales Cortés, G. Duque González, A. Giménez Bejarano, P. Delgado Luceño, E. Uribe Carretero, M. Niso Santano y R.A. González Polo</i>	
9.1. Utilizando <i>Hiperfect</i> .....	65
9.2. Utilizando <i>RNAiMAX</i> .....	66
9.3. Utilizando <i>Lipofectamine 2000</i> .....	67
<i>G. Duque González y R.A. González Polo</i>	
<b>Capítulo 10. Técnica de sobreexpresión génica .....</b>	<b>69</b>
<i>G. Martínez Chacón, J.M. Fuentes Rodríguez, S.M.S. Yakhine Diop, M. Rodríguez Arribas, M. Paredes Barquero, E. Alegre Cortés, S. Canales Cortés, G. Duque González, A. Giménez Bejarano, P. Delgado Luceño, E. Uribe Carretero, M. Niso Santano y R.A. González Polo</i>	
<b>Capítulo 11. Análisis <i>Pulse-Chase</i> .....</b>	<b>71</b>
<i>M. Paredes Barquero, E. Uribe Carretero y M. Niso Santano</i>	
<b>Capítulo 12. Citometría de flujo.....</b>	<b>75</b>
<i>S.M.S. Yakhine Diop, S. Canales Cortés y R.A. González Polo</i>	

Capítulo 13. Análisis <i>Seahorse</i> .....	77
<i>M. Paredes Barquero, E. Alegre Cortés y M. Niso Santano</i>	
Capítulo 14. Análisis: <i>Filter Trap</i> .....	83
<i>M. Paredes Barquero</i>	
Bibliografía.....	87
Índice de tablas.....	89
Índice de autores.....	91

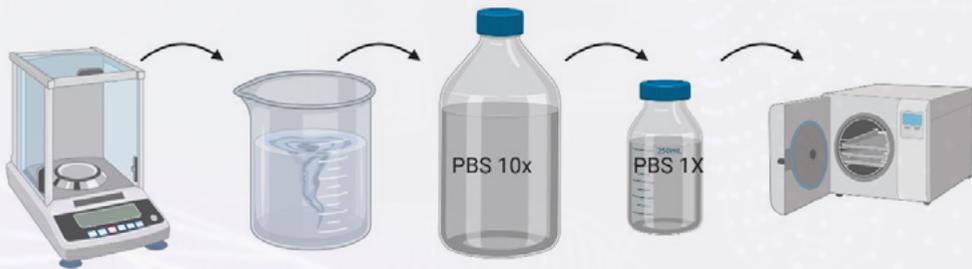
## CAPÍTULO 1

# REACTIVOS Y TAMPONES

### CULTIVOS CELULARES

#### 1.1. REACTIVOS Y TAMPONES USADOS EN CULTIVOS CELULARES

##### 1.1.1. Solución madre tampón fosfato salino (PBS 10X)



1. Pesar las sales y depositar en un vaso de precipitado de 1 L.
2. Agregar suficiente agua (80%) y mezclar sobre la plancha agitadora con barra magnética hasta que se disuelvan las sales.
3. Filtrar para eliminar las partículas no disueltas. Utilizar filtros con poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .
4. Pasar el litro de PBS 10X a botella de 1 L.
5. Esterilizar en autoclave.

NOTA: A la solución 10X (concentrada) no se ajusta el pH. El ajuste se realiza una vez diluida a la concentración tampón PBS 1X (dilución 1:10). Ajustar a pH 7,35. La función del tampón fosfato salino es mantener un pH fisiológico constante junto a una concentración electrolítica similar a la que se encuentra en el interior del organismo. En este ambiente las células son capaces de mantenerse estables, pues se simula en lo posible las condiciones fisiológicas.

### 1.1.2. Tampón fosfato salino (PBS 1X)

1. Preparar el PBS 1X a partir de la solución madre 10X: Realizar una dilución 1:10. Preparar 1 litro de PBS 1X, medir 100 ml de la solución madre y agregar 700 ml de agua destilada estéril.
2. Ajustar el pH y completar la cantidad de agua hasta llegar a 1.000 ml.
3. Distribuir aseptícamente en campana de flujo laminar en botellas de vidrio de 250 ml y autoclavar.

NOTA: El PBS 1X puede prepararse de forma directa, pesando las cantidades correspondientes de cada sal o puede prepararse diluyendo la solución madre (1:10) con agua destilada estéril. El PBS preparado es incoloro y transparente. El PBS de uso diario se puede guardar a T<sup>a</sup> ambiente y el resto en nevera.

**Tabla 1. Tampón fosfato salino**

Compuestos	Concentración	PBS 10X	PBS 1X
		g/l	g/l
NaCl	137 mM	80	8
KCl	2,7 mM	2	0,2
NaHPO <sub>4</sub>	9,6 mM	11,5	1,15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	2	0,2
Agua destilada	Enrasar hasta 1 L		

### 1.1.3. Solución de congelación celular

**Tabla 2. Solución de congelación celular**

Compuestos	Volumen
FBS	0,45 ml/vial
DMSO	0,05 ml/vial

NOTA: Todas las células se encuentran congeladas en nitrógeno líquido en tubos de criogenización (*Fisherbrand 11321675*) en un medio con suero fetal bovino (FBS) (*Sigma F7524*) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma D8779*). El DMSO es un crioprotector que protege a las células frente a los cristales de hielo, impidiendo su muerte a temperaturas extremas.



**WESTERN BLOTTING: ELECTROFORESIS Y TRANSFERENCIA****1.2. TAMPONES USADOS PARA LA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING***Electroforesis***1.2.1. Tampón de carga 5X para geles de acrilamida**

Para 10 ml:

1. Añadir 5 ml de glicerol (*211339, Sigma*) puro para una concentración final de 50%.
2. Añadir 2,5 ml de Tris 1M (*T6066, Sigma*) para una concentración final de 250 mM.
3. Añadir 1 g de dodecil sulfato sódico (SDS) (*161-0301, Bio-Rad*) para una concentración final de 10%.
4. Añadir 2,5  $\mu$ l del 0,1% o 0,25  $\mu$ l del 1% de Azul Bromofenol (*318744, Sigma*) para una concentración final de 0,025%.
5. Enrasar a 10 ml y ajustar a pH 6,8.
6. Mezclar bien.
7. Alicuotar y guardar en congelador.

NOTA: El tampón de carga 5X, se utiliza para mezclar con los lisados de proteínas para cargar directamente en el pocillo. El  $\beta$ -mercaptoetanol (*M2128, Sigma*) se añade cuando se va a usar, 5  $\mu$ l en 100  $\mu$ l de tampón.

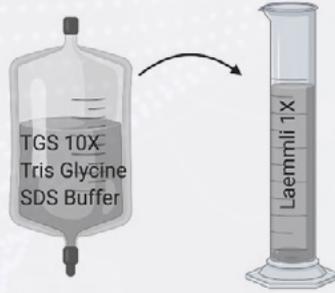
**Tabla 3. Tampón de carga 5X (10 ml)**

Compuestos	Volumen/Concentración	Concentración final	Casa comercial
Azul de bromofenol 0,1%	2,5 $\mu$ l	0,025 %	
$\beta$ -mercaptoetanol	0,5 ml	5 %	Sigma
Glicerol puro	5 ml	50 %	Sigma
SDS	1 g	10 %	Bio-Rad
Tris HCl 1 M pH 6,8	0,242 g	250 mM	Sigma
Agua destilada	Enrasar hasta 10 ml pH 6,8		

### 1.2.2. Tampón de electroforesis TGS 10X (Tris Glycine SDS Buffer) (Laemmli) [1]

1. Usar un concentrado 10X TRIS-GLYCINE-SDS 10X (*Bio-Rad 161-0772*).
2. Diluir con agua destilada (100 ml del preparado 10X + 900 ml de agua).

Para uso 1X.



### TRANSFERENCIA

#### 1.2.3. Tampón CAPS 10X (100 mM)

1. Disolver 22,13 g CAPS (*Sigma C2632*) en 900 ml de agua destilada.
2. Ajustar el pH a 11,1 añadiendo sosa 10 M.
3. Enrasar hasta 1 litro.
4. Mantener a 4 °C.

#### 1.2.4. Tampón CAPS 1X (10 mM)

5. Añadir en una probeta graduada de 1 litro, 100 ml de CAPS 10X.
6. Añadir 200 ml de metanol (*141091, Panreac*).
7. 700 ml de agua destilada.

NOTA: Preparar y mantener en frío el mismo día de su uso. Este es el tampón que vamos a usar en las transferencias en húmedo.

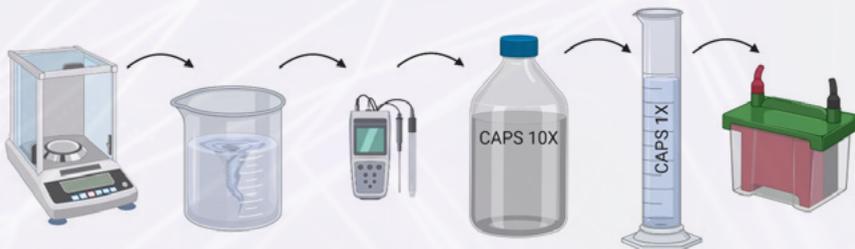


Tabla 4

## CAPS 10X (100 mM) (1 L)

## CAPS 1X (10 mM) (1 L)

Compuestos	Volumen/masa	Compuestos	Volumen
CAPS	22,13 g	CAPS	100 ml
		Metanol	200 ml
Agua destilada	Hasta 1 L, pH 11,1	Agua destilada	700 ml

## 1.2.5. Tampón Tris Glicina Metanol [1]

1. Añadir 100 ml de Tris-Glicina (10X) (*Bio-Rad 161-0772*).
2. Añadir 200 ml de metanol (*141091, Panreac*).
3. Agua destilada hasta 700 ml.

NOTA: Tampón utilizado para la transferencia en semiseco y transferencia en húmedo en cubetas *Criterion* para más de 15 pocillos.

Tabla 5. Tris Glicina Metanol

Compuestos	Volumen	Casa Comercial
<i>Laemmli 10X</i>	100 ml	Biorad
Metanol	200 ml	Panreac
Agua destilada	700 ml	
Volumen	Enrasar hasta 1 L	

## 1.2.6. Tampón salino: Tris buffer saline (TBS 10X)

Para 1 litro de agua.

1. Disolver 12,11 g de Trizma base (*T8154, Sigma*) en 900 ml de agua.
2. Añadir 29,22 g ClNa (*14165, Panreac*).
3. Ajustar pH a 7,6.

NOTA: Hay que usar HCl concentrado (Al manipularlo, usar mascarilla y guantes). Cuidado con no bajar demasiado el pH porque se satura la solución y ya no se puede volver a ajustar. Enrasar hasta 1 L. Guardar en frío.

### 1.2.7. Tampón salino: *Tris Tween* (TTBS 1X del inglés *Tween tris buffer saline*) [1]

Hacer dilución del concentrado TBS 10X y añadir Tween 20 (Sigma P1379).

1. Añadir 100 ml de TBS 10X en una probeta de 1 L.
2. Enrasar a 1 L con agua destilada.
3. Añadir 2 ml de *Tween* 20 y homogeneizar.

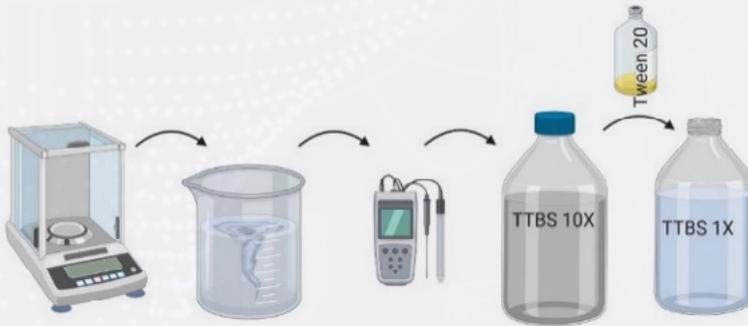


Tabla 6

#### Tampón TTBS 10X

#### Tampón TTBS 1X

Compuestos	Masa	Compuestos	Volumen
NaCl 500 mM	29,25 g	Tampón TBS 10X	100 ml
Tris 100 mM	12,11 g	<i>Tween</i> 20 (0,2%)	2 ml
Agua destilada	Hasta 1 L, pH 7,6	Agua destilada	900 ml

*Finalizada la electroforesis***1.2.8. Azul Brillante de Coomassie: teñidor de gel de acrilamida**

Para 1 litro.

1. Añadir 450 ml de metanol (141091, Panreac) una concentración final del 45%.
2. Añadir 100 ml de ácido acético (1.00063,1011, Merck) para una concentración final del 10%.
3. Añadir 2 ml de *Coomassie Brilliant blue* (Bio-Rad 161-0436) para una concentración final de 0,2%.
4. Enrasar hasta 1 litro.

**Tabla 7. *Coomassie Brilliant Blue***

Compuestos	Volumen
<i>Brilliant Blue</i> R250	2 ml
Metanol	450 ml
Ácido Acético	100 ml
Agua destilada	Enrasar hasta 1 L

Para 200 ml.

1. Añadir 90 ml metanol.
2. Añadir 20 ml de acético.
3. Pesar 0,4 g de azul (254932.1606, Panreac), disolver en metanol (141091, Panreac) y acético.
4. Agitar.
5. Añadir el resto de agua.
6. Filtrar con embudo y papel de filtro.

### 1.2.9. Rojo Ponceau: Compuesto para teñir membrana de PVDF

Para 1 litro.

1. Añadir 1 ml de rojo *Ponceau* (*Sigma P7170*) para una concentración final 0,1%.
2. Añadir 50 ml de ácido acético (*1.00063,1011, Merck*) para una concentración final del 10%.
3. Enrasar hasta 1 litro.

**Tabla 8. Rojo Ponceau**

Compuestos	Volumen
Rojo <i>Ponceau</i> 0,1%	1 ml
Ácido Acético 10%	50 ml
Agua destilada	Enrasar hasta 1 L

### 1.2.10. Borrador de membrana PVDF

Para 1 litro:

1. Preparar 200 ml SDS 10% (*161-0301, Bio-Rad*).
2. Añadir 622 ml Tris HCl (*T6066, Sigma*) 1 M pH 6,8.
3. Añadir 6,94 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol (*M7522, Sigma*) (se añade al usarlo 69,4  $\mu$ l/10 ml de tampón).

NOTA: También podemos usar el reactivo *Restore PLUS Stripping Buffer* (*ThermoFisher 46430*).

### 1.3. TAMPONES USADOS PARA LA TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

#### Permeabilizar

#### 1.3.1. Tritón X-100 al 0,1%

1. Añadir 100  $\mu$ l de Tritón X-100 (*Sigma T9284*) a un volumen final de PBS de 49,9 ml [1].

**Tabla 9. Tritón X-100**

Compuestos	Volumen
Tritón X-100	100 $\mu$ l
PBS 1X	49,9 ml

#### Fijación

#### 1.3.2. Paraformaldehído (PFA) al 4% [1]

Para 500 ml PBS 1X (el que se usa para cultivo celular. pH 7,4) + 20 g PFA (76240, *Fluka Chemika*).

1. Pesar 20 g de PFA con mascarilla. Llevar a campana extractora.
2. Añadir PBS, y poner en un vaso de 1 litro, mantener en agitación con T<sup>a</sup> 60°.
3. Cuando este caliente añadir el PFA.
4. Seguir en agitación hasta que esté trasparente (necesita unas gotas de sosa a 10 M, para que quede totalmente disuelto y trasparente).
5. Dejar enfriar y alicuotar en tubos de 50 ml. Guardar en congelador hasta su uso.

**Tabla 10. PFA 4%**

Compuestos	Volumen/masa
PBS 1X pH 7,4	500 ml
PFA	20 g

#### Bloqueo

#### 1.3.3. BSA 0,1%

1. Pesar 50 mg de albumina sérica bovina (BSA) (*Sigma A7906*).
2. Añadir a 50 ml de PBS 1X.

**Tabla 11. BSA 1 mg/ml**

Compuestos	Volumen/masa
PBS 1X pH 7,4	50 ml
BSA	50 mg

## 1.4. TAMPONES USADOS PARA LISADO CELULAR Y DE TEJIDOS

### Lisado de proteínas procedentes de cultivos celulares

#### 1.4.1. Tampón NP40 0,5% [1-3]

Volumen total para 100 ml con pH 7,4:

1. Añadir 20 ml de Tris-HCl (*T6066, Sigma*) 0,5 M para una concentración final de 100 mM.

$$\text{Tris-HCl [100 mM]}_f; C_i \times V_i = C_f \times V_f; 0,5 \text{ M} \times V_i = 0,1 \times 100 \text{ ml}; \\ V_i = 20 \text{ ml de Tris } 0,5 \text{ M.}$$

2. Añadir 1,75 g de NaCl (*141659, Panreac*) para una concentración final de 300 mM o añadir 20 ml de NaCl de una concentración 1,5 M.

NaCl [300 mM]<sub>f</sub>:

$$P_m = 58,44; G_r = P_m \times \text{Molaridad} \times \text{Litros}; g = 58,44 \times 0,300 \text{ M} \times 0,100 \text{ L} = 1,75 \text{ g}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f; 1,5 \text{ M} \times V_i = 0,3 \times 100 \text{ ml}; V_i = 20 \text{ ml de NaCl } 1,5 \text{ M.}$$

3. Añadir 0,5 ml de NP40 (*11754599001, Roche*) para una concentración final de 0,5%.
4. Enrasar a 100 ml con agua destilada.

NOTA: Hacer alícuotas de 10 ml y congelar. Cuando se descongele para usar, añadir una pastilla de cóctel inhibidor de proteasas y 1 pastilla de cóctel inhibidor de fosfatasa: *PhosSTOP phosphatase inhibitor* (04906837001, Roche) y *cOmplete mini EDTA free* (11836170001, Roche).

**Tabla 12. Composición del tampón de lisis NP40 al 0,5%**

Compuestos	Concentración final	Volumen	Casa comercial
NP40	0,5%	0,5 ml	Roche
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	100 mM	20 ml	Sigma
NaCl 1,5 M	300 mM	20 ml	Panreac
Inhibidor de fosfatasa	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 100 ml		

**1.4.2. SB 1X al 2% [1]**

1. Añadir 5 ml de Tris 0,5 M (*T6066, Sigma*) una concentración final de 50 mM a pH 6,8.
2. Añadir 5 ml de Glicerol (*211339, Sigma*) para una concentración final de 10%.
3. Añadir 10 ml de SDS al 10% (*161-0301, Bio-Rad*) para una concentración final del 2%.
4. Añadir 30 ml de agua destilada.

**Tabla 13. Composición del tampón de lisis SB 1X**

Compuestos	Concentración final	Volumen
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	50 mM	5 ml
Glicerol	10%	5 ml
SDS 10%	2%	10 ml
Agua destilada	Enrasar hasta 50 ml	

**Lisado de proteínas procedentes de células [1] o de tejidos (Cerebro) [4]****1.4.3. Tampón RIPA Buffer**

Volumen total para 100 ml:

1. Pesar 1,21 g de Tris HCl (*T6066, Sigma*) para una concentración final 100 mM pH 7,4.
2. Añadir 10 ml de EDTA 0,1 M (*131026, Panreac*) para una concentración final de 10 mM.
3. Añadir 0,87 g de NaCl (*141659, Panreac*) para una concentración final de 150 mM.
4. Añadir 1 ml de Triton X-100 puro (*T9284, Sigma*) para una concentración final del 1%.
5. Añadir 1 ml de SDS 10% (*161-0301, Bio-Rad*) para una concentración final del 0,1%.
6. Disolver en agua destilada. Y ajustar pH a 7,4.

NOTA: Alicuotar en 10 ml y congelar. Cuando se vaya a usar añadir 1 pastilla de inhibidor fosfatasa y 1 de inhibidor proteasas. *PhosSTOP phosphatase inhibitor (04906837001, Roche)* y *cOplete mini EDTA free (11836170001, Roche)*.

**Tabla 14. Composición del tampón de lisis RIPA para células y cerebro**

Compuestos	Concentración final	Volumen o gramos	Casa comercial
NaCl	150 mM	0,87 g	Panreac
Tris HCl	100 mM	1,21 g	Sigma
Tritón X-100	1 %	1 ml	Sigma
EDTA 0,1 M	10 mM	10 ml	Panreac
SDS 10 %	0,1 %	1 ml	Bio-Rad
Inhibidor de fosfatasa	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 100 ml		

Lisado de proteínas procedentes de tejidos (Hígado y corazón) [5, 6]

#### 1.4.4. Tritón X-100 (hígado y corazón)

1. Añadir 5 ml de NaCl 1,5 M (141659, Panreac) o pesar 0,435 g.
2. Añadir 12,5 ml de Tris HCl 20 mM (T6066, Sigma) para una concentración final de 5 mM.
3. Añadir 0,05 ml de Triton X-100 (T9284, Sigma) para una concentración final Triton 0,1%.
4. Añadir 14,6 mg de EDTA (131026, Panreac) para una concentración final de 1 mM.
5. Enrasar con agua destilada hasta 50 ml.

NOTA: Alicuotar en 10 ml y congelar. Añadir 1 pastilla de inhibidor fosfatasa y 1 de inhibidor proteasas: *PhosSTOP phosphatase inhibitor* (04906837001, Roche) y *cOmplete mini EDTA free* (11836170001, Roche).

**Tabla 15. Composición del tampón de lisis Tritón X-100 para hígado y corazón**

Compuestos	Concentración final	Volumen	Casa comercial
NaCl 1,5 M	150 mM	5 ml	Panreac
Tris HCl 200 mM pH 7,5	20 mM	12,5 ml	Sigma
Tritón X-100	0,1 %	0,05 ml	Sigma
EDTA 0,1 M	1 mM	14,6 mg	Panreac
Inhibidor de fosfatasa	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 50 ml		

*Lisado de proteínas procedentes de cultivos celulares que presentan agregados proteicos [7]*

#### 1.4.5. Tampón de lisis Tritón X-100

**Tabla 16. Composición del tampón de lisis Tritón X-100. Fracción soluble**

Compuestos	Concentración final	Volumen	Casa comercial
Tris-HCl 200 mM pH 7,5	10 mM	5 ml	Sigma
NaCl 1,5 M	50 mM	3,3 ml	Panreac
Tritón X-100	1%	1 ml	Sigma
EDTA 0,1 M	5 mM	146 mg	Panreac
Inhibidor de fosfatasas	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 100 ml		

#### 1.4.6. Tampón de lisis SDS 2%

**Tabla 17. Composición del tampón de lisis SDS 2%. Fracción insoluble**

Compuestos	Concentración final	Volumen	Casa comercial
Tris HCl 200 mM pH 7,5	50 mM	12,5 ml	Sigma
SDS 10%	2%	1 ml	Biorad
EDTA 0,1 M	1 mM	14,6 mg	Panreac
Inhibidor de fosfatasas	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 50 ml		

### Lisado de proteínas procedentes de cultivos celulares para extracción nuclear y citosólica

#### 1.4.7. Tampón de lisis nuclear

**Tabla 18. Composición del tampón de lisis: Nuclear**

Compuestos	Concentración final	Volumen/masa	Casa comercial
HEPES 50 mM	20 mM	0,48 g	Sigma
NaCl 1,5 M	500 mM	33,3 ml	Panreac
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	0,3 g	Panreac
EDTA 0,1 M	0,5 mM	0,5 ml	Panreac
Glicerol	25 %	25 ml	Sigma
Inhibidor de fosfatasas	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 100 ml		

#### 1.4.8. Tampón de lisis citosólico

**Tabla 19. Composición del tampón de lisis: citosólico**

Compuestos	Concentración final	Volumen	Casa comercial
Tris HCl 200 mM pH 7,5	50 mM	12,5	Sigma
EDTA 0,1 M	1 mM	0,1 ml	Panreac
NP40	0,1 %	0,1 ml	Roche
Inhibidor de fosfatasas	1 pastilla		Roche
Inhibidor de proteasas	1 pastilla		Roche
Agua destilada	Enrasar hasta 50 ml		

## CAPÍTULO 2

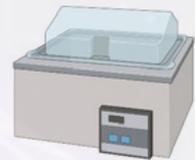
# CULTIVOS CELULARES

NOTA: Se utilizan diferentes modelos celulares para validar los resultados en todas las líneas según la procedencia de la línea celular. Los siguientes protocolos se realizan en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), células de astrocitoma (U251), células de neuroglioma (H4), fibroblastos humanos (FH) y células de osteosarcoma (U2OS). El modelo celular basado SH-SY5Y nos permitirá realizar una buena aproximación a los mecanismos que median la muerte celular en células nerviosas. Estas células son ampliamente utilizadas en estudios de neurodegeneración, incluyendo estudios de modelos *in vitro* de la Enfermedad de Parkinson. Así también el modelo de las células U251 nos permitirán realizar el estudio en unas condiciones más fisiológicas de las células de la glía y así aproximarnos a la interacción de estas células con las células nerviosas [8].

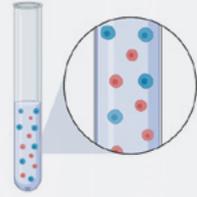
### 2.1. DESCONGELACIÓN



1. Calentar el medio celular en un baño a 37 °C.
2. Sacar los tubos de criocongelación donde están las células que queremos descongelar.
3. Preparar tubos de centrifugación de 15 ml (*Corning 430791*) con 5 ml del medio de cultivo correspondiente dependiendo de la línea celular.
4. Coger un poco de medio con una pipeta p1000 y añadir con cuidado al tubo de criocongelación Intentar ser bastante cuidadosos y rápidos, porque las células están disueltas en la solución de congelación (FBS + 10% DMSO) (**1.1.3, Tabla 2**) y el DMSO es tóxico para las células a temperaturas diferentes a la congelación.
5. Trasvasar el líquido de los viales de criocongelación a los tubos de 15.



6. Centrifugar, 1.200 rpm, 12 min, T<sup>a</sup> ambiente.
7. Retirar el sobrenadante.
8. Resuspender el pellet en 1 ml de medio.
9. Este ml de medio es añadido al flask de 25 cm<sup>2</sup> (156340, *ThermoScientific*) a los que hemos añadido previamente 5 ml del medio celular correspondiente.



NOTA Las células SH-SY5Y, FH y las U251 se incuban y se siembran en medio DMEM (del inglés *Dulbecco's modified eagle médium*) (D6546, *Sigma*), suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*) (F7524, *Sigma*) al 10%, 5 ml de glutamina (2 mM) (G7513, *Sigma*), 2 ml de los antibióticos penicilina (100 U/ml) y estreptomocina (100 µg/ml) (456-1046, *HyClone*). Las células MEF, se siembran e incuban en el mismo medio DMEM, suplementado con suero de crecimiento bovino (BGS, del inglés *bovine growth serum*) (W9912H, *HyClone*) al 15%, suplementado también con glutamina y antibióticos. Las células H4 y U2OS, se siembran e incuban en medio DMEM con alto contenido en glucosa y piruvato (11995, *Gibco*), suplementado con 50 ml de FBS, 5 ml de HEPES, 2 ml de los antibióticos penicilina/estreptomocina, y 5 ml del antibiótico geneticina (G418, *Thermofisher*) (50 mg/ml) cuando expresan proteínas marcadas [1, 9, 10].

## 2.2. MANTENIMIENTO CELULAR

NOTA: Las células se incuban a 37 °C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

1. Mirar las células al microscopio. Si han alcanzado el 80% de confluencia podemos pasar las células de un flask de 25 cm<sup>2</sup> (156340, *ThermoScientific*) a un flask de 75 cm<sup>2</sup> (130190, *Biolite*). O de un flask de 75 cm<sup>2</sup> a uno de 150 cm<sup>2</sup> (130191, *Biolite*). O duplicar el número de flask, es decir, de uno de 75 cm<sup>2</sup> a 2 flask de 75 cm<sup>2</sup> y así.
2. Rotulamos tubos de 50 ml (05-539-8, *Fisherbrand*), uno por cada flask.
3. Vaciar el medio de cada flask en su tubo correspondiente.
4. Lavar los flask con PBS 1X (1.1.2, **Tabla 1**). Eliminar el PBS 1X. Añadir a cada flask 2-3 ml de tripsina (*Sigma T4049*), para despegar y recoger las células. Dejar actuar unos min. Una vez se han despegado las células, recogerlas con el medio del flask que habíamos dejado en cada tubo de 50 ml correspondiente y trasvasar a este tubo.
5. Centrifugar a 1.200 rpm, 12 min, a T<sup>a</sup> ambiente.

Nota: Dependiendo del tipo celular.

6. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de medio nuevo.
7. Este ml de células (dependiendo del tamaño del pellet) lo podemos pasar a un flask de mayor tamaño o a dos flask del mismo tamaño (previamente se añadió el medio de cultivo correspondiente).



### 2.3. CONGELACIÓN

1. El protocolo de congelación es similar al protocolo de pasaje celular.

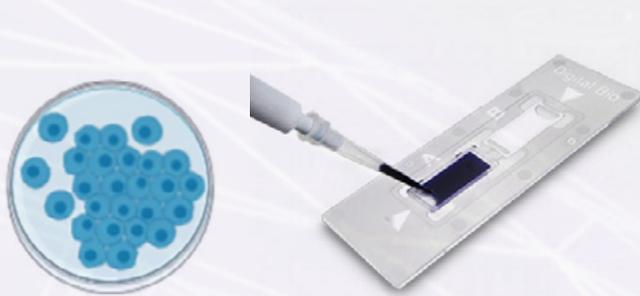


2. Resuspender el pellet procedente del cultivo celular que queremos congelar en 1 ml de FBS (*F7524, Sigma*) + 10% DMSO (*D8779, Sigma*) (**1.1.3, Tabla 2**).
3. Trasvasar a un tubo de criocongelación (*11321675, Fisherbrand*) previamente rotulado.
4. Congelar el vial a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

NOTA: Este proceso tiene que ser muy ágil.

### 2.4. SIEMBRA CELULAR

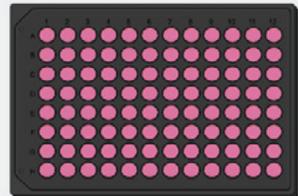
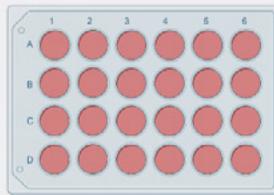
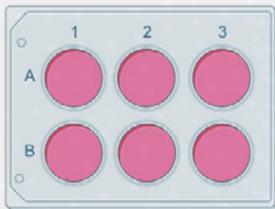
1. Realizar el protocolo anterior para tener el pellet de células.
2. Resuspender el pellet en 1 ml de medio fresco.
3. Mezclar en un tubo de 0,5 ml: 10  $\mu\text{l}$  *Trypan Blue Solution* (*Sigma T8154*) + 10  $\mu\text{l}$  de células.
4. Coger 10  $\mu\text{l}$  y contar el número de células en *cell counter*.



## 5. Cálculos:

- a.  $(\text{Número de pocillos} + 1 \text{ pocillo de error}) \times \text{Volumen del pocillo} \times \text{Número de células/ml} = \text{células calculadas que se necesitan.}$
- b.  $\frac{\text{Número de células calculadas (necesito)}}{\text{Número de } \frac{\text{células}}{\text{ml}} \text{ (cell counter)}} \times 1000 = \mu\text{l de células que cogeremos del ml donde hemos resuspendido el pellet.}$
- c. Volumen de células que necesitamos por pocillo: Placas de 6 pocillos (2 ml/pocillo) (130184, *Biolite*), placa de 24 pocillos (500  $\mu\text{l}$ /pocillo) (3524, *Corning*) y placa de 96 pocillos (100  $\mu\text{l}$ /pocillo) (353219, *Corning*).

NOTA: El número de células/ml varía dependiendo del tipo celular.



6. Poner en un tubo de 50 ml (05-539-8, *Fisherbrand*), el volumen correspondiente de medio para repartir en cada uno de los pocillos.
7. Añadir a este medio los ml totales de células calculados.
8. Repartir el volumen de medio y células en los pocillos de las placas correspondientes.

## 2.5. PROTOCOLO PARA OBTENER DIFERENCIACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR SH-SY5Y

### 2.5.1. Preparación de medios y reactivos

Preparar una solución madre de ácido retinoico (RA) (*R2625, Sigma*) 5 mM en etanol 95% y medio DMEM

1. Mezclar 47,5 ml de etanol absoluto (*141086, Panreac*) con 2,5 ml de agua destilada en condiciones de esterilidad en un tubo de 50 ml (*05-539-8, Fisherbrand*).
2. Filtrar esta solución con la ayuda de una jeringuilla en campana de flujo laminar.
3. Trasvasar 33,3 ml de etanol 95% a un nuevo tubo de 50 ml. Apagar las luces (el RA es sensible a la luz).
4. Sacar una ampolla de 50 mg de RA y llevar a campana. Abrir la ampolla y añadir su contenido al Falcon con 33,3 ml de etanol 95%. Para ello, tomar una aguja y una jeringuilla y lavar con etanol 95% la ampolla para arrastrar todo el RA al tubo de 50 ml.

NOTA: Hacer alícuotas en tubos opacos de 1 ml y guardar a 4 °C (estable durante 6 semanas) o a -80 °C (el resto con el que no se hagan alícuotas).

Preparar una botella de medio sin suero: DMEM/F12 (*21331-020, Gibco*)

2 mM Glutamina (*G7513, Sigma*)

1X Penicilina/Estreptomicina (*456-1046, HyClone*)

1:1000 Plasmocin (*antt.mpp, Nucliber*)

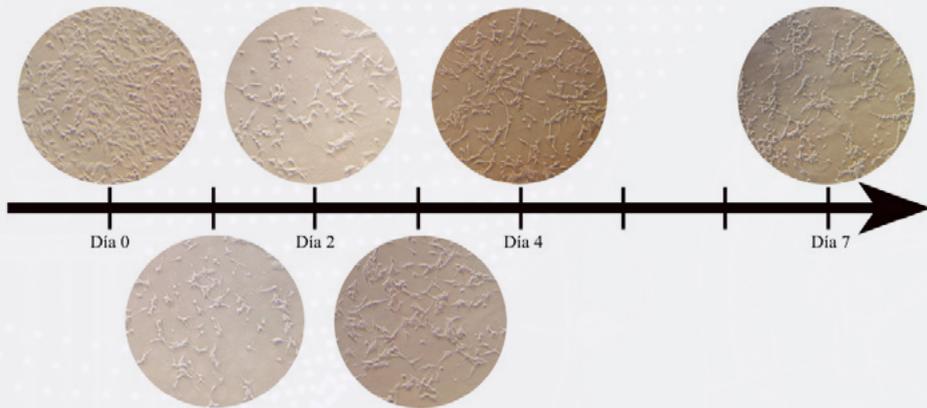
5. Inactivar mediante calor una alícuota de FBS (iFBS) (*F7524, Sigma*), al calentarla 30 min a 57 °C, agitándola cada 10 min. Cuando el medio se vaya a emplear, añadir iFBS.

### 2.5.2. Diferenciación de SH-SY5Y

1. Cultivar células SH-SY5Y, hasta alcanzar una confluencia del 80-90%.

NOTA: Realizar cambios de medio y pases con tripsina cuando sea necesario.

2. Para sembrar en placa, tripsinizar las células.
3. Recoger las células con medio y centrifugar a 1.200 rpm, 10 min.
4. Eliminar sobrenadante y resuspender en 2 ml de medio.
5. Calcular el volumen de suspensión de células necesario para que haya 110.000 células/ml en el volumen deseado a sembrar con medio DMEM sin suero al que se le añade un 2% de iFBS.
6. Incubar a 37 °C. Observar las células cada día.



**Día 0:** Siembra de SH-SY5Y en DMEM/F12 + 2% iFBS  
**Día 2:** Cambio de medio a DMEM/F12 + 1% iFBS + RA 10  $\mu$ M  
**Día 4:** Cambio de medio (DMEM/F12 + 1% iFBS + RA 10  $\mu$ M)  
**Día 7:** Células diferenciadas

7. 2 días después del cambio de medio anterior, cambiar el medio de las placas por medio DMEM sin suero al que se le añade 1% de iFBS y RA 5 mM, de forma que la concentración de RA en el medio sea de 10  $\mu$ M (medio 2). Este medio se debe preparar en oscuridad antes de su uso, añadiendo en último lugar el RA.
8. 2 días después del cambio a medio 2, reemplazar el medio de las placas por medio 2 fresco.
9. 3 días después del último cambio de medio, las células están diferenciadas y listas para su uso.

NOTA: Las células en proceso de diferenciación son más sensibles a la tripsina, si se usa hay que tener extremado cuidado con ellas. Además, su adherencia es menor, por lo que se recomienda tratar previamente las placas donde se siembren con poli-lisina (si se van a utilizar para inmunofluorescencia o para realizar un *Seahorse*).

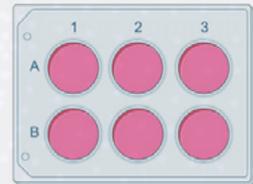
## CAPÍTULO 3

# EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

### 3.1. LISADO A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES

#### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*), usando 2 o 3 pocillos por condición dependiendo de la línea celular.



#### Día 2. Tratamiento

2. Tras 24 horas, retirar el medio de los pocillos. Añadir los tratamientos correspondientes a cada uno de los pocillos a concentración y tiempo indicados.
3. Retirar el medio con el tratamiento que contiene cada pocillo donde están sembradas las células y trasvasar con pipeta de p1000 a tubo de centrifugación de 15 ml (*Corning 430791*).
4. Lavar cada pocillo con PBS 1X (**1.1.2, Tabla 1**) y trasvasar el PBS al tubo de 15 ml correspondiente previamente rotulado con los tratamientos.
5. Añadir 300  $\mu$ l de tripsina para despegar las células. Dejar actuar unos min.
6. Coger un ml de medio de cada tubo de 15 ml para recoger las células con tripsina de cada pocillo. Pasar cada tubo al hielo, una vez recogida las células.
7. Centrifugar a 2.500 rpm, 7 min, 4 °C.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de PBS 1X frío para retirar restos de medio y tripsina. Transvasar a tubo de microcentrifugación de 1,5 ml.
9. Centrifugar a 6.500 rpm, 4 min a 4 °C. Se retira el PBS 1X.
10. Congelar el pellet de las células a -80 °C o continuamos con el protocolo.  
Procedemos al lisado con NP40 al 0,5% (**1.4.1, Tabla 12**).
11. Resuspender el pellet en el tampón de lisis correspondiente normalmente con 50  $\mu$ l de NP40 al 0,5%.

NOTA: Esta cantidad es variable atendiendo al volumen celular, pero es una buena aproximación.

12. Incubar 10-15 min en hielo.
13. Centrifugar a 13.000 rpm, 15 min, 4 °C.
14. Trasvasar el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml previamente rotulado (línea celular, fecha y tratamiento). Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo ácido bicinchonínico (BCA) (*Sigma B9643*).
15. Seguir protocolo de *Western blotting*.

### 3.2. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS: FRACCIÓN SOLUBLE E INSOLUBLE

Tras realizar los pasos del 1-9 del apartado anterior (3.1). Procedemos al lisado con diferentes tampones de lisis para obtener un extracto proteico de la fracción soluble e insoluble.

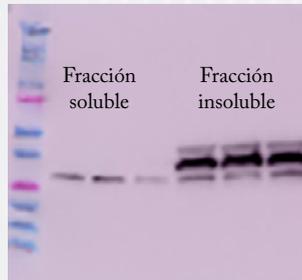


1. Resuspender el pellet en 100  $\mu$ l del primer tampón de lisis Tritón X-100 (1.4.5, Tabla 16).
2. Incubar las muestras 10-15 min en hielo.
3. Centrifugar a 17.000 xg, 10 min a 4 °C.
4. Trasladar el sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml nuevo y previamente rotulado con el nombre de la muestra y lo llamamos parte soluble.
5. Lavar el pellet con PBS. Centrifugar. Retirar PBS.

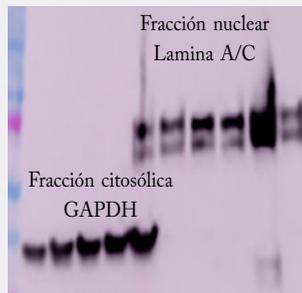


6. Añadir el segundo tampón de lisis SDS 2% (1.4.6, Tabla 17). Realizar sonicación de la muestra durante unos seg. A este mismo tubo lo rotulamos con el nombre de la muestra y parte insoluble.

7. Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo ácido bicinchonínico (BCA) (*Sigma B9643*) de las dos fracciones.
8. Seguir protocolo de *Western blotting*.



### 3.3. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS: FRACCIÓN NUCLEAR Y CITOSÓLICA



#### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*), usando 2 o 3 pocillos por condición dependiendo de la línea celular.

#### Día 2. Tratamientos

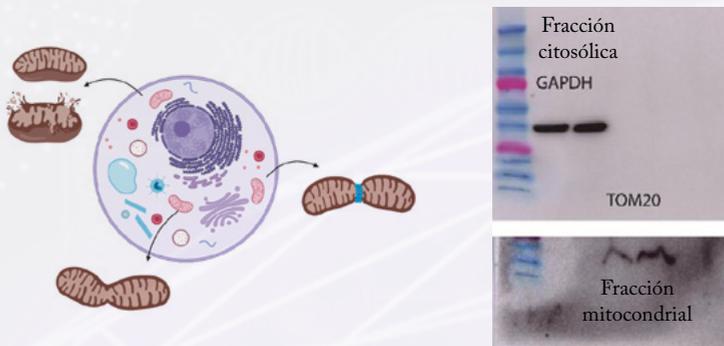
2. Añadir los diferentes tratamientos a cada pocillo correspondiente.
3. Retirar el medio, una vez finalizados los tiempos de tratamiento.
4. Realizar un lavado con PBS 1X, lo aspiramos.
5. Añadir tripsina para despegar las células. Recoger las células con medio.
6. Centrifugar a 1.800 rpm, 3 min, a T<sup>a</sup> ambiente. Desechar el sobrenadante. Añadir PBS 1X.
7. Centrifugar las células a 1.800 rpm, 1 min, 25 °C, para eliminar posibles restos de medio de cultivo y tripsina. Aspirar el PBS 1X con cuidado.

8. Adicionar 100  $\mu$ l del tampón citosólico (1.4.8, **Tabla 19**). Resuspender con cuidado y se pasa a un nuevo tubo de 0,5 ml (previamente rotulado como núcleo).
9. Centrifugar a 2.200 rpm, 5 min (meter estos tubos en recolectores de 1,5 ml).
10. En el sobrenadante tenemos el contenido citosólico (pasar a otro tubo rotulado como citosol).
11. En el pellet se encuentra el contenido del núcleo. Añadir 50  $\mu$ l de tampón citosólico por la pared.
12. Centrifugar a 2.200 rpm, 1 min para eliminar restos de proteínas citosólicas.
13. Eliminar el sobrenadante con aspirador sin apurar y el resto con pipeta.
14. Resuspender el pellet con 50  $\mu$ l de tampón nuclear (1.4.7, **Tabla 18**) y centrifugar a 1.200 rpm, 12 min. Nos quedamos con el sobrenadante (fracción nuclear).
15. Proceder a la determinación de la concentración proteica nuclear y citosólica mediante el reactivo BCA.

### 3.4. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS: FRACCIÓN MITOCONDRIAL Y CITOSÓLICA

#### Protocolo A: *Mitochondria Isolation kit for Cultured Cells (89874, ThermoFisher)* (OPCIÓN A) [3]

NOTA: Inmediatamente antes de usar, el reactivo A y reactivo B se complementaron con cóctel inhibidor de proteasa 10X (*Sigma-Aldrich, P2714*), ortovanadato de sodio al 0,5 M al 20% (*S6508, Sigma*) y fluoruro de sodio al 0,1 M al 1% (*131675, Panreac*). Las mitocondrias aisladas se lisaron en CHAPS al 2% (*C3023, Sigma*). Las extracciones citosólicas y mitocondriales se analizaron mediante transferencia *Western blotting*.



1. Partiendo de células recogidas después de los tratamientos. Centrifugar la suspensión celular ~850 xg, 2 min. Necesitamos  $2 \times 10^7$  células.
2. Retirar el sobrenadante.
3. Añadir 800  $\mu$ l del reactivo A.
4. Vortex e incubar en hielo 2 min. No exceder los 2 min de incubación.
5. Añadir 10  $\mu$ l del reactivo B.

6. Vortex a máxima velocidad durante 5 seg.
7. Incubar en hielo durante 5 min. Vortex a máxima velocidad cada min.
8. Añadir 800 µl del reactivo C. Invertir el tubo para mezclar, no vortear.
9. Centrifugar a 700 xg, 10 min, 4 °C.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo de 2,0 ml.
11. Centrifugar a 12.000 xg, 15 min, 4 °C.

NOTA: Para obtener una fracción más purificada de mitocondrias, con una reducción > 50% de las sustancias lisosomales y peroxisomales, centrifugar a 3.000 xg, 15 min.

12. Transferir el sobrenadante (fracción citosólica) a un nuevo tubo.
13. El pellet contiene las mitocondrias aisladas.
14. Añadir 500 µl del Reactivo C al pellet.
15. Centrifugar a 12.000 xg, 5 min.
16. Eliminar el sobrenadante. Mantener el pellet en hielo. La congelación y descongelación pueden comprometer la integridad de las mitocondrias. Seguir protocolo de *Western blotting*.

### Protocolo B

1. Sembrar 1 placa de 6 pocillos (130184, *Biolite*) por condición.
2. Recoger las células tras el tratamiento con medio nuevo.
3. Centrifugar la suspensión celular 2.500 rpm, 7 min, 4 °C.
4. Retirar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet en 1 ml de PBS 1X y pasar tubo de 1,5 ml.
6. Centrifugar 6.500 rpm, 4 min, 4 °C.
7. Tirar sobrenadante y trabajamos con los pellets.

Composición de <i>Lisis Buffer</i>	Adición extemporánea*	Composición <i>Sample Buffer 4X</i>
25 mM Tris pH 8 (102215153, <i>Sigma</i> )	0,05% Digitonina (D-141, <i>Sigma</i> )	Tris 200 mM pH 6,8 (102215153, <i>Sigma</i> )
250 mM Sucrose o sacarosa (141621, <i>Sacarosa Panreac</i> )	1 mM DTT (43816, <i>Sigma</i> )	Glicerol 40% (211339, <i>Panreac</i> )
EDTA 1 mM (131026, <i>Panreac</i> )	0,1 Mm PMSF (P-7626, <i>Sigma</i> )	SDS 8% (161-0301, <i>Bio-Rad</i> )

8. Añadir 80-150 µl del *lisis buffer* y resuspender con diez pipetazos.

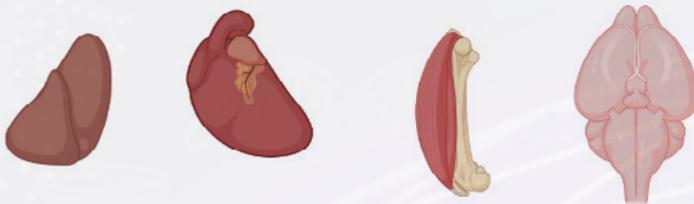
NOTA: este paso debe ser rápido, intentando no sobrepasar 30 segundos.

9. Centrifugar 13.000 rpm, 3 min, 4 °C.
10. Recoger sobrenadante en otro tubo de 1,5 ml sin tocar el pellet, llegando a dejar 10 µl del mismo.
11. Añadir 33 µl de *Sample Buffer 4X*.
12. Quitar los 10 µl que dejamos de margen en el pellet.
13. Resuspender en 150 µl de *Sample Buffer 1X*.
14. Calentar 95 °C 5 min.
15. Guardar ambas partes a -20 °C o cuantificar con el método BCA.
16. Seguir con el protocolo de *Western blotting*.

NOTA: \*Adición de: 1 µg/ml Leupeptina. 1 µg/ml Pepstatina. 1 µg/ml Aprotinina. 1 µg/ml Benzamida. El PMSF se diluye en 1 ml de etanol absoluto filtrado. Si hay problemas con el método, probar modificando la concentración de digitonina.

### 3.5. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS PARTIR DE TEJIDOS

1. Depositar las muestras congeladas en nitrógeno líquido.
2. Inmediatamente antes de que se descongelen. Trocear un fragmento del tejido a analizar de aproximadamente 10 mg en una placa de petri sobre hielo.



3. Introducir un fragmento de tejido en los tubos de centrifugación "*Hard tissue homogenizing CK28-R*" (*Precllys Lysing Kit, KT03961-1-007.2*). Todo se hará en condiciones de refrigeración.



4. Añadir a este tubo 500  $\mu$ l del tampón de lisis Tritón X-100 (1.4.4, **Tabla 15**) o tampón RIPA (1.4.3, **Tabla 14**) dependiendo del tejido u órgano a lisar.
5. Introducir los tubos en el sistema de lisis y homogenización (*Precellys 24. Bertin Technologies*).



6. Programar un ciclo de 2.850 xg 23 s, seguido de reposo 20 s y finalmente 2.850 xg 23 seg. [5, 6].
7. Dejar reposar las muestras en hielo durante 30-60 min.
8. Centrifugamos de forma habitual a 13.000 rpm, 15 min, 4 °C.
9. Descartar el pellet y nos quedamos con el sobrenadante donde se encuentran las proteínas a analizar.
10. Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo BCA.
11. Seguir con el protocolo de *Western blotting*.



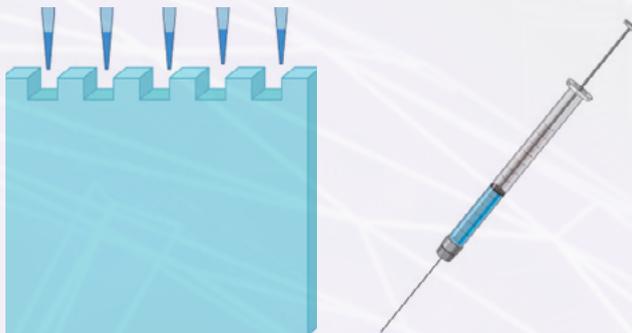
## CAPÍTULO 4

# ANÁLISIS DE EXTRACTO PROTEICO POR WESTERN BLOTTING

[1, 8, 10-14]

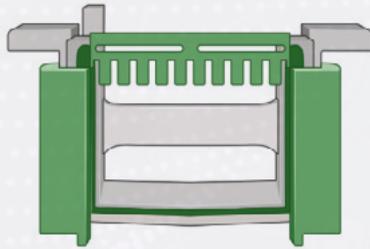
### 4.1. ELECTROFORESIS

1. Preparar los lisados celulares tras su cuantificación a la concentración de 15-35  $\mu\text{g}$ / muestra. En un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  para geles de 10 pocillos o un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  para geles de 15 pocillos.
2. Mezclar con el tampón de carga 5X (1.2.1, Tabla 3).
3. Calentar las muestras a 95°C, 5 min en el termobloque.
4. Dar un *spin* a las muestras para que baje todo el volumen que se ha evaporado por las paredes.
5. Cargar el volumen total de cada muestra en los pocillos en el orden correspondiente utilizando una jeringa *Hamilton*.

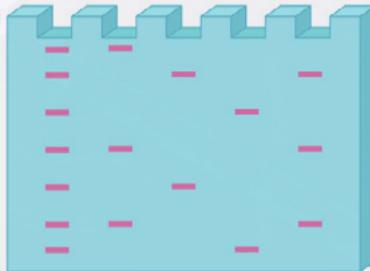


6. Someter las proteínas de cada muestra a una electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) del 4-12% (*Mini-Protean TGX*), 12% (*Mini-Protean TGX*), 4-20%

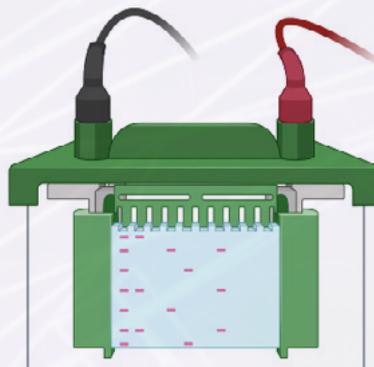
(*Criterion Gel TGX*) o 12% (*Criterion TGX*) en condiciones reductoras y desnaturizantes y así quedan separadas según su tamaño.



7. Para referenciar las masas moleculares de las proteínas del experimento se utiliza un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Bio-Rad*) (*Bio-Rad 161-0374*).

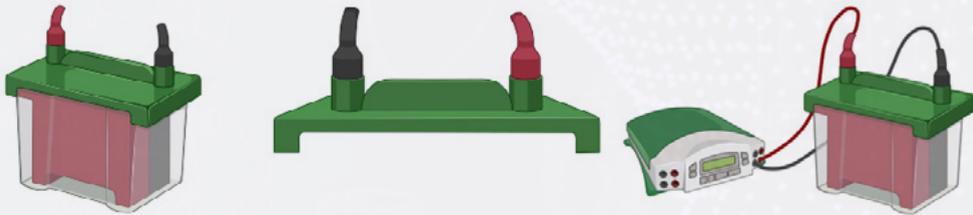


8. Realizar la electroforesis en un equipo de *Bio-Rad modelo Mini Protean Tetra System* o en un equipo de electroforesis *Bio-Rad Criterion Cell*, según el tamaño de gel utilizado, en presencia de tampón *Laemmli 1X* (1.2.2) durante un intervalo de tiempo comprendido entre 30 min y 1 hora, sometidas a un voltaje de 90 V (hasta que atraviesan el gel de apilamiento) y posteriormente se aumenta hasta los 120 V (gel de resolución). También puede realizarse a 100 V constante de principio a fin.



## 4.2. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

9. Transferir las proteínas a una membrana de polivinilo difluoruro (*Immun blot PVDF Membrane*) (*Bio-Rad 162-0177*), activar la membrana incubándola durante 1 min en metanol, 1 min en agua destilada y finalmente hay que embeberla en el tampón de transferencia CAPS 1X (1.2.4, **Tabla 4**) o tampón Tris Glicina Metanol (1.2.5, **Tabla 5**) durante al menos 5 min.
10. Para la transferencia en húmedo usamos el equipo de transferencia (*Mini Trans Blot electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*) para geles de 10 y 15 pocillos. Para geles de 18 pocillos hemos utilizado el sistema de transferencia en húmedo (*Criterion Blotter*).



NOTA: Preparar para la transferencia de cada gel, dos papeles *Whatman (Extra Thick Blot PAPER Bio-Rad)*, el uso de dos esponjillas y una membrana de PVDF. Todo deberá estar equilibrado en su tampón de transferencia antes de proceder a realizar el proceso de transferencia. Estas piezas deben estar embebidas durante al menos 10 min en tampón de transferencia.

12. Nombrar en la esquina derecha la membrana que vamos a utilizar. Activar la membrana de PVDF, y posteriormente introducirla en el tampón que vamos a utilizar para realizar esta transferencia junto con los papeles *Whatman* y las esponjillas.
13. Prepara el montaje para llevar a cabo la transferencia. Se realizará en un soporte de plexiglás que se introducirá en el sistema de transferencia correspondiente según el tamaño del gel. Se introduce un imán, un bloque de hielo y se enrasa la cubeta con el tampón de transferencia CAPS 1X (1.2.4, **Tabla 4**), se colocan los electrodos y todo el dispositivo al completo se introduce en el frigorífico para comenzar la transferencia.
14. Aplicar una tensión de 100 V para obtener un amperaje de partida de 0,25 A y migrar durante 1-1,5 hora en agitación continua y refrigeración, en el caso de los geles de 10-15 pocillos (*Mini Protean-TGX*).

NOTA: Aplicar una tensión de 75 V y migrar durante 45 min en agitación continua y refrigeración en el caso de los geles de 18 pocillos (*Criterion TGX*). El tampón que utilizamos en la transferencia de geles de 18 pocillos es el tampón Tris Glicina Metanol (1.2.5, **Tabla 5**).

15. Finalizada la transferencia, el gel se tiñe con el colorante azul brillante de *Coomassie (Bio-Rad 161-0436)* (1.2.8) y la membrana con rojo *Ponceau (Sigma P7170)* (1.2.9), con objeto de verificar la correcta transferencia de las proteínas y además sirve como control interno de carga.

### 4.3. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS

16. Incubar la membrana durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente y en agitación con una solución de bloqueo consistente en 10% de leche desnatada en polvo disuelto en tampón salino *Tris Tween* (TTBS del inglés *Tween tris buffer saline*) (1.2.7, Tabla 6).
17. Realizar tres lavados de 5 min con el tampón TTBS 1X.
18. Incubar la membrana con el anticuerpo primario de interés (puede estar diluido en una solución de BSA al 5% o leche desnatada al 10% en TTBS 1X dependiendo de la casa comercial y el anticuerpo) en agitación durante una hora a T<sup>a</sup> ambiente o toda la noche a 4°C.
19. Retirar la solución del anticuerpo primario.
20. Realizar tres lavados de 5 min cada uno con tampón TTBS 1X.
21. Incubar la membrana durante una hora a T<sup>a</sup> ambiente en agitación, con el anticuerpo secundario específico conjugado con peroxidasa de rábano picante, HRP (del inglés, *horseradish peroxidase*).
22. Lavar de nuevo las membranas dos veces durante 5 min en TTBS 1X.

NOTA: El anticuerpo secundario se diluye de 1:5.000 a 1:10.000 en 10% de leche desnatada en una solución de TTBS. La elección del anticuerpo secundario entre monoclonal o policlonal depende siempre del anticuerpo primario.

### 4.4. REVELADO

23. Exponer la membrana 5 min a una solución de ECL (del inglés, *Enhance chemiluminescent by luminol*) (32106, Pierce).
24. Realizar el revelado en *Amersham Imager 600*.



#### 4.5. BORRADO DE MEMBRANAS

25. Lavar la membrana en TTBS 1X para retirar el ECL.
26. Incubar la membrana 5-15 min a 37 °C en agitación con la solución de borrado *Stripping Buffer* o con el siguiente reactivo (1.2.10).
27. Realizar dos lavados con TTBS 1X durante 5 min.
28. Bloquear la membrana en agitación en TTBS 10% de leche, 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.
29. Lavar con TTBS 1X.

NOTA: Finalmente la membrana estará lista para ser reutilizada (al menos en dos o tres ocasiones más). Hay que tener en cuenta que antes del primer borrado, hay que incubar la membrana con los anticuerpos fosforilados de interés. Después se puede proceder al borrado de la membrana e incubar con los anticuerpos totales, específicos de los anticuerpos fosforilados.



## CAPÍTULO 5

# EXTRACCIÓN DE RNA

### 5.1. A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES MEDIANTE TRIsure

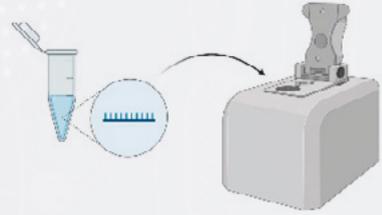
1. Sembrar 3 pocillos por condición en placa de 6 pocillos (130184, *Biolite*), tras el tratamiento correspondiente, aspirar el medio, lavar con PBS y aspirar de nuevo.
2. Añadir 1 ml de TRIsure (BIO-38032, *Bioline*) por condición.
3. Homogeneizar el TRIsure junto a las células adheridas al fondo.
4. Recoger todas las células.
5. Pasar el homogeneizado a un tubo de 1,5 ml.  
Almacenar a T<sup>a</sup> ambiente unas horas.  
Almacenar a -80 °C hasta un mes.  
Seguir protocolo.
6. Incubar la mezcla 5-10 min a T<sup>a</sup> ambiente.
7. Añadir 200 µl de cloroformo (404635000, *Acros organics*) por ml de trizol.
8. Remover tubo 15 s a mano vigorosamente.
9. Incubar 5-10 min a T<sup>a</sup> ambiente.
10. Centrifugar 12.000 xg, 15 min, 4 °C.
11. Pasar la fase acuosa (fase superior) a un nuevo tubo de 1,5 ml. El volumen recogido será aproximadamente igual a lo que hemos añadido de cloroformo. En este paso podemos almacenar a -20 °C hasta el día siguiente.
12. Añadir 500 µl de isopropanol 100% (141090, *Panreac*) por ml de TRIsure añadido previamente.
13. Incubar 10 min a T<sup>a</sup> ambiente.
14. Centrifugar a 12.000 xg, 10 min a 4 °C. Eliminar sobrenadante.



15. Añadir 1 ml de etanol al 75% (141086, Panreac) por ml de TRIsure añadido previamente. Vortex para que se despegue el pellet. Centrifugar a 7.500 xg 10 min a 4 °C. Eliminar sobrenadante. Tener especial cuidado con el pellet pequeño. Repetir 2 veces este paso.

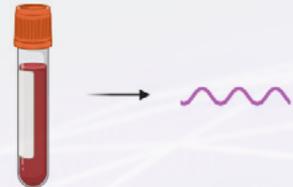
Podemos almacenar el RNA en etanol. 1 año a -20 °C. 1 semana a 4 °C.

16. Una vez eliminado el sobrenadante, dejar secar el pellet hasta que se vea transparente.
17. Resuspender pellet en 30 µl de agua libre de RNasas.
18. Dejar unas horas a T<sup>a</sup> ambiente para que se disuelva.
19. Cuantificar en espectrofotómetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*).
20. Hacer diluciones a 5 ng/µl.

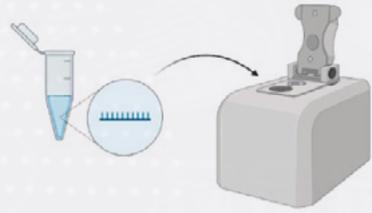


## 5.2. A PARTIR DE SANGRE HUMANA MEDIANTE TRIsure

1. Añadir 750 µl TRIsure (*BIO-38032, Biorline*) a 250 µl de sangre total.
2. Homogeneizar 30 s con vortex fuerte a máxima velocidad.
3. Centrifugar a 12.000 xg, 10 min a 4 °C.
4. Transferir sobrenadante a tubo de 1,5 ml.
5. Incubar muestras 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
6. Añadir 200 µl de cloroformo (*404635000, Acros organics*).
7. Homogeneizar 15 s con vortex a máxima velocidad.
8. Incubar las muestras 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
9. Centrifugar a 12.000 xg, 15 min a 4 °C.
10. Transferir fase acuosa a otro tubo.
11. Añadir 500 µl de isopropanol (*141090, Panreac*).
12. Incubar la muestra 10 min a T<sup>a</sup> ambiente.
13. Centrifugar a 12.000 xg, 10 min, 4 °C.
14. Eliminar sobrenadante.
15. Añadir 1 ml etanol 75% (*141086, Panreac*).
16. Homogeneizar con vortex 3 seg.
17. Centrifugar a 7.500 xg, 5 min, 4 °C.
18. Eliminar sobrenadante.
19. Spin para eliminar posteriormente el resto de sobrenadante.

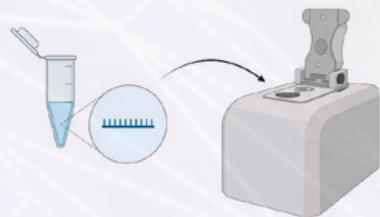


20. Eliminar sobrenadante, dejar secar el pellet con el tubo abierto hasta que se vea transparente.
21. Resuspender pellet en 30  $\mu$ l de agua libre de RNAsas.
22. Cuantificar en espectrofotómetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*).



### 5.3. A PARTIR DE TEJIDOS ANIMALES MEDIANTE TRIre

1. Cortar el tejido que está en  $-80^{\circ}\text{C}$  en trocitos.
2. Pesar unos 50-100  $\mu$ g. Puedes hacerlo de varias zonas del tejido y una vez obtienes el RNA lo juntas todo en un tubo. Para tener un resultado más homogéneo de toda la zona.
3. Añadir 1 ml de TRIre (*BIO-38032, Bioline*).
4. Incubar con TRIre 5 min a  $T^{\text{a}}$  ambiente. Romper el material, con mortero/sonicador y vortex.
5. Añadir 200  $\mu$ l de cloroformo (*404635000, Acros organics*) por cada ml TRIre añadido previamente. Homogeneizar.
6. Incubar 5-10 min a  $T^{\text{a}}$  ambiente.
7. Centrifugar a 12.000 xg, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ .
8. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml.
9. Añadir 500  $\mu$ l de isopropanol (*141090, Panreac*) por 1 ml de TRIre añadido previamente.
10. Incubar 10 min a  $T^{\text{a}}$  ambiente.
11. Centrifugar a 12.000 xg, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ .
12. Eliminar sobrenadante.
13. Resuspender pellet en 1 ml de etanol al 75% (*141086, Panreac*).
14. Agitar en vortex.
15. Centrifugar a 7.500 xg, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ .
16. Eliminar sobrenadante.
17. Dejar secar el pellet hasta verse transparente.
18. Añadir 20-50  $\mu$ l de agua libre de RNAsas cuando el pellet esté transparente (seco).
19. Cuantificar en espectrofotómetro (*NanoDrop 2000, Thermo Scientific*).



#### 5.4. RNEASY MINI KIT

1. Para la extracción de RNA empleamos *RNeasy Mini Kit (74104, Qiagen)* [1, 8, 11, 12].

Si se realiza la extracción a partir de:

- Células: necesitamos una cantidad de 500.000 a  $2-3 \times 10^6$ /condición.
- Tejido: menos de 30 mg.

2. Preparar el tampón de lisis RLT adicionando un 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol 14,3 M. (*M2128, Sigma*).

NOTA: El  $\beta$ -mercaptoetanol inactiva las RNAasas para limitar la degradación del RNA. Las células se lisan con 350  $\mu$ l de tampón RLT al que previamente hemos añadido  $\beta$ -mercaptoetanol. Podemos lisar las células directamente en el pocillo o tripsinizarlas y resuspender el pellet resultante con la mezcla preparada.

3. Añadir al lisado homogeneizado un volumen de etanol al 70% (350  $\mu$ l).

NOTA: El etanol mejora la unión del RNA a la membrana de la columna.

4. Trasladar la mezcla bien homogeneizada a una columna colocada en un tubo colector.
5. Centrifugar la muestra a 8.000 xg, 15 seg.

NOTA: Para evitar toda contaminación, el líquido del tubo colector se descarta y la columna se lava.

6. Añadir 700  $\mu$ l de tampón de lavado RW1 y centrifugar a 8.000 xg, 15 seg. Retiramos el líquido del tubo colector.
7. Añadir 500  $\mu$ l de tampón de lavado RPE y centrifugar a 8.000 xg, 15 seg. Retiramos el líquido del tubo colector.
8. Añadir 500  $\mu$ l de tampón RPE y centrifugar 8.000 xg, 2 min.

NOTA: Los contaminantes se eliminan tras los lavados con los tampones RW1 y RPE respectivamente.

9. Centrifugar en vacío durante a 8.000 xg, 1 min. Para eliminar el etanol.
10. Eluir el RNA unido a la membrana de la columna con 30-50  $\mu$ l de agua libre de RNAsas.
11. Centrifugar a 8.000 xg, 1 min.

## 5.5. RETROTRANSCRIPCIÓN DE RNA A cDNA

### Primer paso: Purificación del RNA con DNaseI

- Añadir por cada  $\mu\text{g}$  de RNA:
  - 1  $\mu\text{l}$  de *DNaseI* (*AMPD1-1KT*, *Sigma*).
  - 1  $\mu\text{l}$  del Buffer.
  - Incubar 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.

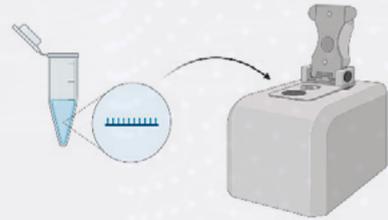
NOTA: La muestra de RNA se diluye en un volumen final de 8  $\mu\text{l}$ .

- Añadir 1  $\mu\text{l}$  solución STOP.
- Introducir en el termociclador.
  - 72 °C 10 min.
  - 4 °C.



### Segundo paso: Síntesis de cDNA

- Antes de proceder a la retrotranscripción, cuantificamos las muestras en espectrofotómetro (*NanoDrop 2000*, *Thermo Scientific*).



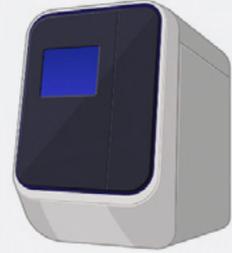
NOTA: De la muestra de RNA podemos añadir hasta 5  $\mu\text{g}$ .

- Mezclar un tubo de PCR:
  - 10  $\mu\text{l}$  de Master Mix.
  - 2  $\mu\text{l}$  de enzima retrotranscriptasa (*First Strand cDNA Synthesis kit*, *NZY*).
  - Hasta 5  $\mu\text{g}$  de RNA.
  - Agua libre de DNasas y RNasas hasta 20  $\mu\text{l}$ .
- Introducir en el termociclador:
  - 25 °C 10 min
  - 50 °C 30 min
  - 85 °C 5 min
  - 4 °C
- Añadir 1  $\mu\text{l}$  RNasa.
- Introducir en el termociclador: 37 °C 20 min.
- Congelar muestras a -20 °C o dejar en frío si van a usarse posteriormente para realizar la qPCR.



## 5.6. PROTOCOLO DE qPCR

1. Cuantificar todas las muestras para que tengan la misma concentración, y diluirlas a 10 ng/μl.
2. Preparamos la mezcla en un volumen final de 10 μl. con *Kappa SYBR Fast Master Mix 2X (B4KK4601)* que llevará las siguientes cantidades por pocillo:
  - 1 μl de muestra de la concentración 10 ng/μl.
  - 0,2 μl ROX low.
  - 0,25 μl de oligonucleótido.
  - 0,25 μl de oligonucleótido antisentido.
  - 5 μl de SYBR Green 2X para una concentración final 1X.
  - 3,3 μl de agua libre de nucleasas.



1. Introducir la placa en la qPCR a tiempo real (7500 de *Applied Biosystems*) para amplificar la región codificante para ambas regiones genómicas.
2. Seguir el siguiente protocolo.

50 °C 2 min

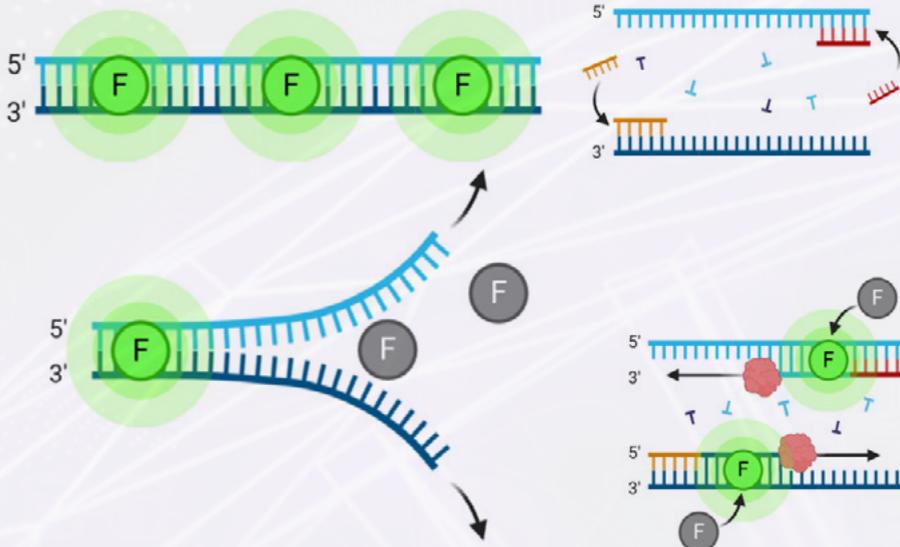
95 °C 10 min

40 ciclos: 95 °C 15 s

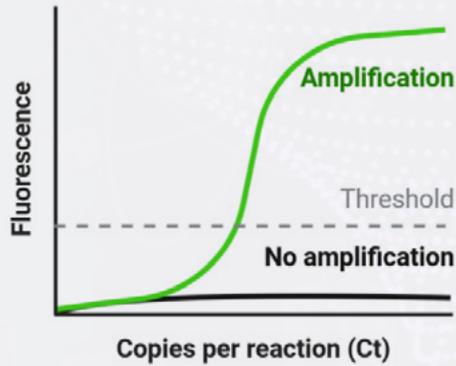
56 °C 1 min

95 °C 15 s

72 °C 15 min



NOTA: Una vez finalizada la reacción, analizamos la expresión génica relativa comparando los valores de amplificación del cDNA de distintos genes junto con los de *GAPDH* (que utilizamos como control de expresión ya que permanece invariante, indistintamente del tratamiento adicionado sobre el cultivo celular) mediante el método de cuantificación de Ct. La fluorescencia es significativa en el momento que supera un valor umbral de Ct. El Ct disminuye cuando el gen en cuestión está muy expresado.





## CAPÍTULO 6

# MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

### PROTOCOLO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE CULTIVOS CELULARES [12, 14]

#### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar una placa de 6 pocillos (*130184, Biolite*) por condición.

#### Día 2. Tratamiento y procesamiento de muestras

2. Realizar el tratamiento a los tiempos y concentraciones correspondientes.
3. Eliminar el medio.
4. Lavar con PBS y retirar.
5. Tripsinizar cada pocillo con 200  $\mu$ l/pocillo.
6. Recoger con un poco de medio las células adheridas a los 6 pocillos (*130184, Biolite*) de cada placa (condición) en tubos de centrifuga de 1,5 ml.
7. Poner las muestras en frío.
8. Centrifugar a 1.200 rpm, 5 min, 4 °C.
9. Retirar todo el sobrenadante.
10. Lavar con PBS el pellet con cuidado que no se despegue.
11. Añadir 300  $\mu$ l de glutaraldehído al 2,5% (*163853, Panreac*) cubriendo bien el pellet.
12. Reposar 2 horas en hielo o en la nevera.
13. Centrifugar 1.200 rpm, 5 min, 4 °C.
14. Retirar el sobrenadante con mucho cuidado.
15. Añadir 250-300  $\mu$ l de cacodilato a pH 7,4 (*Sodium Cacodylate* 0,1 M, *Alfa Aesar*), suavemente por la pared para que el pellet no se mueva y quede cubierto.

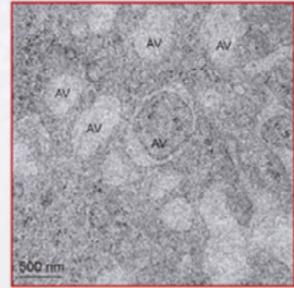


Imagen de MET [12]  
Estructuras autofágicas



16. Dejar reposar 5 min en hielo.
17. Centrifugar a 1.200 rpm, 3-4 min 4 °C.
18. Retirar el sobrenadante (cacodilato).
19. Añadir 250-300  $\mu$ l de cacodilato 0,1 M a pH 7,4, suavemente por la pared para que el pellet no se mueva y quede cubierto.
20. Centrifugar a 1.200 rpm, 3-4 min 4 °C.
21. Quitamos sobrenadante con mucho cuidado.
22. Añadimos cacodilato hasta que se cubra el pellet completamente y metemos las muestras en la nevera hasta que se envíen.



## CAPÍTULO 7

# TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN

### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar 1 placa/condición o 1 flask 75 cm<sup>2</sup>/condición.

### Día 2. Tratamiento y lisado. Seguir protocolo

2. Una vez realizados nuestros tratamientos y recogidas nuestras células siguiendo protocolo de lisado de proteínas.
3. Añadir 100 µl *cell lytic* (C2978, Sigma) + 10% HDACi (*Deacetylation Inhibition Cocktail*, sc-362323) + 1:1.000 ácido anacárdico (10 mM) (A7236, Sigma) para una concentración final 10 µM a cada uno de nuestros pellets recogidos en tubos de 1,5 ml.

NOTA: La adición de HDACi y ácido anacárdico se realiza para el estudio de la acetilación de proteínas.

4. Proceder a la determinación de la concentración proteica mediante el reactivo BCA.
5. Coger 200 µg de concentración de proteína por condición de tratamiento.
6. Añadir 20 µl de *dyabeads proporcionadas en el kit Immunoprecipitation Dyabeads Protein G* (10007D, Invitrogen). Dejar en un volumen final de 250 µl.
7. Agitar 1 hora, 30 min, 4 °C.
8. Colocar los tubos de 1,5 ml en el imán *Dynamag Magnetic Particle Concentrator* (123.20D, Invitrogen).
9. Retirar sobrenadante.
10. Añadir al sobrenadante 600 µl de buffer de lavado proporcionado en el kit y añadir el anticuerpo frente a la proteína que queremos inmunoprecipitar en la proporción 1:200.
11. Agitar 16 horas, 19 rpm, 4 °C.

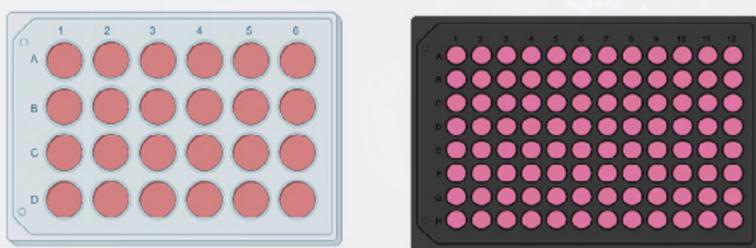
## Día 3

12. Lavar *dynabeads* tres veces con buffer de lavado proporcionado en el kit.
13. Incubar las muestras que han estado en agitación toda la noche con 20  $\mu\text{l}$  de *dynabeads* 1 h 30 min en agitación a 4 °C.
14. Colocar los tubos de nuevo en el imán proporcionados en el kit.
15. Guardamos el sobrenadante.
16. Seguir el protocolo, con el precipitado marrón, donde está el anticuerpo inmunoprecipitado unido a la proteína.
17. Lavar con tampón de lavado una vez.
18. Poner tubos en el imán.
19. Retirar el sobrenadante.
20. Añadir 20  $\mu\text{l}$  al precipitado de la mezcla: *laemmli* 2X (80  $\mu\text{l}$ ) + tampón de carga 5X (20  $\mu\text{l}$ ).
21. Calentar 1 min a 95 °C, poner en el imán las muestras y cargar sobrenadante.
22. Seguir el protocolo normal de *Western blotting*.

## CAPÍTULO 8

# TÉCNICA DE INMUNOFLOURESCENCIA

Para analizar proteínas endógenas mediante microscopía óptica de fluorescencia en células en cultivo [1, 10-12, 14].



### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar células en placa de 96 pocillos (353219, Corning) o en placa de 24 pocillos (3524, Corning). En las placas de 24 pocillos se colocan previamente lamelas *Cover Glass 12 mm (E7179C, Thermoscientific)* [15] y se lavan con PBS 1X. Se siembran 100  $\mu$ l/pocillo en la placa de 96 pocillos y 500  $\mu$ l/pocillo en las placas de 24 pocillos, una densidad celular adecuada dependiendo de la línea celular, para que el día del tratamiento y fijación estén en torno al 85%.

### Día 2. Tratamiento y fijación

2. Tras 24 horas, realizamos el tratamiento correspondiente y las células son procesadas según las condiciones experimentales.
3. Tras el tratamiento correspondiente. Lavar las células tres veces con PBS 1X.
4. Fijar con PFA al 4% (1.3.2, Tabla 10) [1] en PBS 1X, durante 30 min a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Pasado este tiempo, se realizan tres lavados con PBS 1X. Si trabajamos con las células H4 LC3-GFP, ya podemos observar mediante microscopía de fluorescencia, cambios de unos tratamientos a otros, observando LC3 puntiforme en color verde (GFP) o

si utilizamos las células U2OS-FYVE-RFP que expresan la proteína FYVE proteína implicada en la vía de los fosfatidilinositoles en color rojo (RFP) [9]. Podemos seguir con el protocolo o guardar las placas a 4 °C y continuar al día siguiente [9].

### Día 3. Marcaje

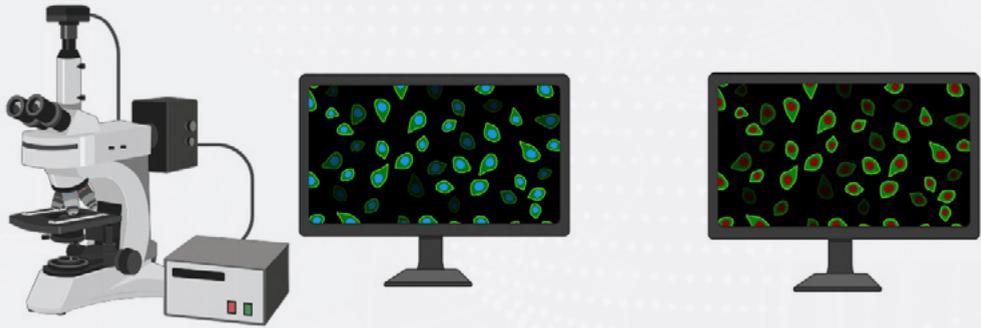
6. Permeabilizar: Añadir 100 µl de tritón (1.3.1) al 0,2% diluido en PBS 1X por pocillo y dejar en agitación suave durante 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
7. Bloquear sitios inespecíficos de unión incubando las células: Añadir 100 µl de BSA al 0,1% (1 mg/ml) (1.3.3, **Tabla 11**). Dejar en agitación suave durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente.
8. Añadir el anticuerpo primario disuelto en BSA al 1% 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente o el tiempo que se indique y en oscuridad. En el caso de las placas de 24 pocillos, en la que las células se han sembrado en lamelas, los cubreobjetos se incuban con los correspondientes anticuerpos primarios diluidos a la concentración adecuada en BSA 1 mg/ml en PBS 1X durante una hora a T<sup>a</sup> ambiente y en oscuridad.

NOTA: La mayoría de los anticuerpos lo usamos a una dilución 1:200. Mirar especificaciones del anticuerpo, dilución y tiempo.

9. Lavar cada pocillo 3 veces con PBS, cada lavado 5 min en agitación suave.
10. Añadir el anticuerpo secundario disuelto en BSA al 1%, y diluido a la mitad que el anticuerpo primario.

NOTA: A la hora de elegir el anticuerpo secundario debemos tener en cuenta, el color con el que queremos visualizar nuestra proteína marcada. Importante saber si nuestras células tienen ya marcaje basal, para marcarlas de otro color. Y por otro lado elegir el anticuerpo adecuado frente a la especie de nuestro anticuerpo primario.

11. Realizar otros tres lavados con PBS 1X y a continuación si queremos se incuben con *Hoescht* 33342 en PBS (1 µg/ml) para visualizar los núcleos celulares.
12. Finalmente se lavan tres veces con PBS 1X. Las placas de 96 pocillos están listas para visualizar al microscopio. En las placas de 24 pocillos, las lamelas se montan en portaobjetos, adhiriéndolas con pegamento *Fluoromont-G* (0100-01, *Shouthern Biotech*), se deja secar y se procesan en el microscopio.



13. Para la valoración de los resultados obtenidos, se cuentan al menos 200 células por cada condición y se utiliza el programa *Ifdotmeter* (software diseñado por nuestro grupo) [15] o utilizando *ImageJ*.

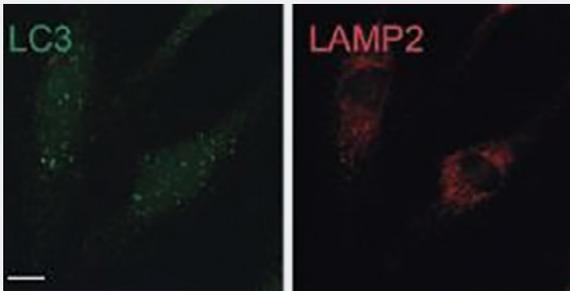


Imagen de microscopía de fluorescencia [12].  
 Para la proteína LC3 y LAMP2 empleando los anticuerpos primarios: (17543, *Sigma*) y (18822, *Santa Cruz*), respectivamente.

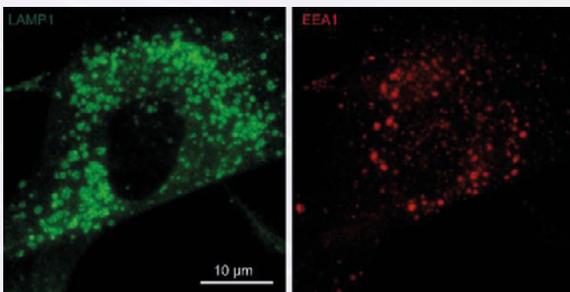


Imagen de microscopía de fluorescencia.  
 Para la proteína LAMP1 y EEA1 empleando los anticuerpos primarios: (24170, *Abcam*) y (2411S, *Cell Signaling*), respectivamente.



## CAPÍTULO 9

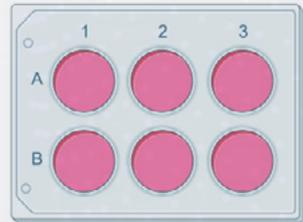
# TÉCNICA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

### 9.1. UTILIZANDO HIPERFECT

#### Día 1. Siembra celular y silenciamiento

Para realizar silenciamiento génico en placas de 6 pocillos (130184, *Biolite*) empleamos el reactivo *HiPerfect Transfection Reagent* (509301704, *Qiagen*) [2, 3, 6, 8, 11, 12].

1. Sembrar 2 pocillos por cada condición de tratamiento.
2. A razón de: 100 de *OPTI-MEM* (51985-026, *Gibco*)  
150.000 células en 2 ml/pocillo,  
siRNA de interés de 9-12 nM  
12  $\mu$ l de *HiPerfect*.



NOTA: Elaborar la misma mezcla con siRNA para el control negativo (*scrambled*) en paralelo.

3. Mezclar *OPTI-MEM* y siRNA.
4. Dejar reposar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Añadir *HiPerfect*. Dejamos reposar 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
6. En este tiempo de espera, tripsinizar las células y prepara el volumen que vamos a necesitar de células a la concentración de 150.000 células por pocillo en un medio sin antibiótico.
7. Una vez tenemos las dos mezclas por separado añadimos a las células, gota a gota la mezcla del complejo (*OPTI-MEM* + *HiPerfect* + siRNA).
8. Repartimos en placa tras homogeneizar suavemente.

### Día 2. Cambiar medio

9. A las 24 horas de incubación se cambia el medio en la placa y se añade medio normal con antibiótico.



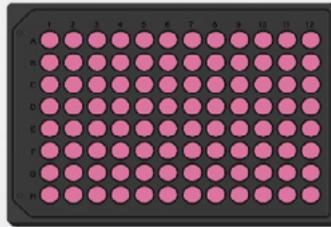
### Día 3. Tratamiento

10. Pasadas otras 24 horas se añade el tratamiento de interés y pasado el tiempo del tratamiento específico procedemos al lisado para realizar la técnica de *Western blotting*.

## 9.2. UTILIZANDO RNAiMAX

### Día 1. Siembra celular y silenciamiento

1. Para realizar silenciamiento génico en placas de 96 pocillos (353219, Corning) utilizamos el reactivo *Lipofectamine RNAiMAX Transfection* (13778150, Invitrogen) [8, 12].



2. Sembramos 5 pocillos por cada condición de tratamiento.  
A razón de: 20  $\mu$ l de *OPTI-MEM* (51985-026, Gibco)  
6.000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l  
0,2  $\mu$ l de RNAimax  
siRNA de interés a 6 nM

NOTA: Elaborar la misma mezcla con siRNA para el control negativo (*scrambled*) en paralelo.

3. Mezclar *OPTI-MEM* y siRNA.
4. Dejar reposar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Añadir RNAimax.
6. Dejamos reposar 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
7. En este tiempo de espera, tripsinizar las células y prepara el volumen que vamos a necesitar de células a la concentración de 6.000 células/pocillo en un medio sin antibiótico.
8. Una vez tenemos las dos mezclas por separado añadimos a las células, gota a gota la mezcla del complejo (*OPTI-MEM* + RNAimax + siRNA).
9. Repartimos en placa tras homogeneizar suavemente.

### Día 2. Cambiar medio

10. A las 24 horas de incubación se cambia el medio en la placa y se añade medio normal con antibiótico.

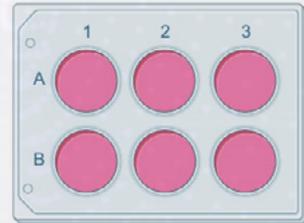
### Día 3. Tratamiento

11. Pasadas otras 24 horas se añade el tratamiento de interés y pasado el tiempo del tratamiento específico procedemos a fijar la placa con PFA como se detalla en el apartado de microscopía.

## 9.3. UTILIZANDO LIPOFECTAMINE 2000

### Día 1. Siembra celular

1. Para realizar silenciamiento génico en placas de 6 pocillos (130184, Biolite) utilizamos el reactivo *Lipofectamine 2000 Reagent* (11668-019, Invitrogen).
2. Sembramos 3 pocillos por cada condición de tratamiento y 1 pocillo de control positivo *KIFF11 (Eg5)* (AM4639, Ambion) a 30-50% de confluencia. Utilizamos medio sin antibiótico.



### Día 2. Silenciamiento

A razón de: 4  $\mu$ l de *Lipofectamine 2000* + 200  $\mu$ l de *OPTI-MEN* (51985-026, Gibco)  
siRNA de interés a 33 nM + 200  $\mu$ l de *OPTI-MEN* (51985-026, Gibco)

NOTA: Elaborar la misma mezcla con siRNA para el control positivo (KIFF11) en paralelo.

3. Mezclar *OPTI-MEN* y siRNA.
4. Mezclar *OPTI-MEN* y *Lipofectamine 2000*.
5. Dejar reposar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
6. Mezclar *OPTI-MEN* y siRNA + *OPTI-MEN* y *Lipofectamine 2000*.
7. Dejar reposar 20 min a T<sup>a</sup> ambiente.
8. Eliminar de cada pocillo el volumen de medio que vamos a añadir de la mezcla del complejo (*OPTI-MEN* + *Lipofectamine 2000* + siRNA).
9. Añadir a cada pocillo el volumen de la mezcla del complejo (*OPTI-MEN* + *Lipofectamine 2000* + siRNA).
10. Homogeneizar suavemente.

### Día 3. Cambiar medio

11. A las 24 horas de incubación cambiar el medio a la placa y añadir medio normal con antibiótico.

### Día 4. Tratamiento

12. Pasadas otras 24 horas se añade el tratamiento de interés y pasado el tiempo del tratamiento específico procedemos a la recogida de células y posterior lisado.

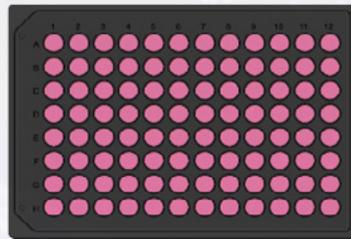
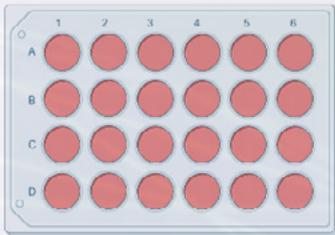
## CAPÍTULO 10

# TÉCNICA DE SOBREEXPRESIÓN GÉNICA

Para la introducción de proteínas exógenas marcadas (plásmidos bacterianos en ocasiones marcados) se realiza una transfección, que consiste en la introducción de ADN o ARN de un virus o bacteriófago procarionta en el interior celular. En este caso realizamos una transfección química.

### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar células en placa de 96 pocillos (353219, Corning) y de 24 pocillos (3524, Corning) en medio completo sin antibiótico, con el fin de alcanzar una confluencia del 90%.



### Día 2. Transfección

2. Realizar la transfección química empleando el reactivo *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* (11668027, Invitrogen) [1, 2, 9, 12, 14].
3. Preparamos dos mezclas:

Mezcla A: *Lipofectamine 2000*<sup>®</sup> (X  $\mu$ l de *lipofectamine*, depende del plásmido y del modelo celular) + 100  $\mu$ l de medio *OPTIMEM*. Esperar 15 min.

Mezcla B: Plásmido (X  $\mu$ l de plásmido, depende del plásmido y modelo celular) + 100  $\mu$ l de medio *OPTIMEM*. Mezclar A + B. Esperar 15 min.

4. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla a cada pocillo (realizar cálculos de forma previa) que ha de ser previamente lavado con PBS 1X y sustituir el medio por 800  $\mu\text{l}$  de medio *OPTIMEM*. La transfección se realiza en 1 ml de volumen total. Esperar 5 h de transfección y se añade 1 ml de medio completo con el doble de suero.

### Día 3. Análisis

Observar las células al microscopio de fluorescencia y si la transfección presenta una buena eficiencia. Al día siguiente se realiza el tratamiento en medio completo, se fijan (placa de 24 o 96 pocillos) y se montan las lamelas (placa 24 pocillos) para su observación si se va a realizar la técnica de inmunofluorescencia o se lisan (placa 6 pocillos) si se va a realizar análisis de la sobreexpresión por *Western blotting*.



## CAPÍTULO 11

# ANÁLISIS PULSE-CHASE

### Día. Siembra celular

1. Sembrar células en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*) a la densidad adecuada. Dejar un pocillo más de control.

### Día 2. Marcaje con L-[<sup>14</sup>C]-Valina

2. Calcular el número de ml necesarios para el experimento. Usaremos 2  $\mu$ l de L-[<sup>14</sup>C]-Valina (*NEC291EU050UC, PerkinElmer*) por ml de medio + 0,5 ml de error de pipeteo [14].
3. Aspirar el medio de cada pocillo de la placa de 6, sembrada previamente el día 1.
4. Añadir 1 ml de la mezcla de medio + L-[<sup>14</sup>C]-Valina por pocillo. El/los pocillos control, sin L-[<sup>14</sup>C]-Valina, cambiarles el medio por 1 ml de medio fresco.
5. Dejar el cultivo en el incubador entre 18 y 24 horas con la L-[<sup>14</sup>C]-Valina.
6. Guardar la bandeja donde hemos trabajado en el lugar acondicionado para ello. Las puntas de pipeta utilizadas durante el experimento son introducidas en un vaso, se lavan bien bajo el grifo dejando correr el agua. Las puntas y el papel de filtro sobre el que hemos trabajado se tiran al cubo de residuos tóxicos.
7. Limpiar la campana y pasar un trozo de papel de filtro empapado con agua destilada por toda la superficie de la campana utilizada y lo guardamos en un vial de centelleo rotulado como "Frotis 1<sup>er</sup> día" y lo metemos en la caja. Tiramos los guantes en el cubo de residuos.
8. Anotar la cantidad de L-[<sup>14</sup>C]-Valina utilizada.

### Día 3. Pre-chase

9. Eliminar el medio con el isótopo radiactivo que no hayan incorporado las células. El medio con L-[<sup>14</sup>C]-Valina se recoge en el bote de residuos con P1000.
10. Añadimos entre 500  $\mu$ l y 1 ml de PBS/pocillo. Repetir hasta tres veces. El PBS recogido lo vamos tirando en el bote de residuos y las puntas utilizadas en el vaso.

11. Añadir 1 ml de medio fresco que contiene L-Valina (*V0513, Sigma*) (10 mM y peso molecular 1.171,5 g/mol).
12. Incubar placas de cultivo 1 hora.

### Chase

13. Durante la hora del *pre-chase*, preparar los distintos tratamientos que vayamos a realizar en nuestro experimento, utilizando el medio con L-Valina.
14. Recoger el *pre-chase* en el bote de residuos.
15. Lavar 2 veces con PBS, recogéndolo en el bote de residuos también.
16. Añadir los tratamientos y llevamos la bandeja con las placas a incubar a 37 °C durante el tiempo que dure nuestro experimento. En el caso del tratamiento con EBSS hay que añadir BSA al 0,1%.
17. Tirar los tubos de los tratamientos y del medio con L-Valina y sacamos el vaso con las puntas y el bote de residuos. Procedemos como el primer día, abrimos el grifo, dejamos que corra bien de agua y eliminamos el contenido del bote. Lo lavamos bien con mucha agua, así como las puntas y el vaso. Tirar las puntas al cubo de residuos y secamos el vaso y el bote y los guardamos en su sitio. Vamos a dejar el papel de filtro hasta que acabemos el experimento.
18. Rotular 3 juegos de eppendorfs por cada condición, tendremos tres fracciones: la fracción celular (Rc) adherida a la placa, la fracción suspendida (Rs) en el medio y la fracción precipitada (Rp) obtenida a partir de la fracción suspendida. Cada fracción será de un color, y con números, cada pocillo será un número.
19. Tras finalizar nuestro tratamiento recoger el contenido de cada pocillo en un eppendorf rotulado como Rp.
20. Añadiremos 100 µl/eppendorf de ácido tricloroacético (TCA) al 100%. Poner los eppendorfs en un rotor, dejamos agitándose durante toda la noche, a 4 °C.
21. Congelar las placas a -80 °C o podemos continuar trabajando con ellas.
22. Guardar toda la tapa con su caja, quitamos el papel de filtro de la campana, limpiamos como normalmente y pasamos por encima un trozo de papel de filtro empapado con agua destilada y lo guardamos en un vial de centelleo rotulado como "Frotis 2º día" y lo metemos en la caja con el otro.

### Día 4. Final Chase

23. Coger las placas del congelador a -80 °C y las ponemos en una caja con hielo para mantener la temperatura.
24. Añadir 1 ml/pocillo de TCA 10% frío, y dejamos las placas a 4 °C, 15 y 30 min.
25. Retirar el TCA al 10% y lo reemplazamos por 500 µl/pocillo de NaOH 0,2 M, e incubar en la estufa, a 37 °C, durante 1 hora.
26. Recoger los eppendorfs Rp, y los centrifugamos a 4.000 xg, 20 min, 4 °C.

27. Recoger el sobrenadante en los eppendorfs rotulados como Rs.
28. El pellet que queda en los eppendorfs Rp, lo resuspendemos con 500  $\mu$ l/eppendorf de NaOH 0,2 M. Vorteamos hasta que todo esté bien disuelto.
29. Cuando haya pasado la hora, cogemos las placas, resuspendemos muy bien el contenido de los pocillos y recogemos todo el volumen que haya en los eppendorfs rotulados como Rc.

NOTA: Las muestras en los eppendorfs pueden quedarse a T<sup>a</sup> ambiente hasta su análisis. Podemos dejar rotulados los tubos de centelleo de la misma manera que los eppendorfs.

#### Último día. Medida (Ponerse en contacto con el servicio de Badajoz)

NOTA: Este día se llevarán las muestras en los eppendorfs, en unas gradillas con tapas, para evitar escapes de las muestras. También se llevarán los tubos de centelleo rotulados, así como los dos tubos con los frotis. Además, habrá que llevar todo lo necesario para la manipulación de estas, P200, puntas amarillas, dispensadores automáticos y varias jeringuillas, guantes...

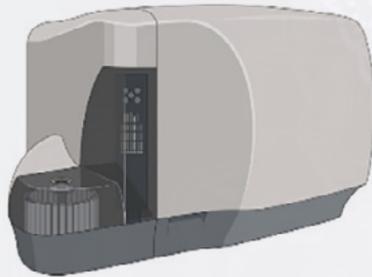
30. Añadir entre 50 y 100  $\mu$ l de cada muestra a su correspondiente tubo de centelleo y 1 ml de líquido de centelleo (*Optihise hisafe 1200.437 RRS 314*). Se mezcla y se espera 2 horas antes de medir la degradación en un contador  $\beta$  de centelleo.

$$\% \text{ Degradación } h^{-1} = \frac{R_s}{R_s + R_c + R_p}$$



## CAPÍTULO 12

# CITOMETRÍA DE FLUJO



### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar las células en placas de 6 pocillos (*130184, Biolite*) o de 24 pocillos (*3524, Corning*).

### Día 2. Tratamientos

2. Tratar las células según corresponda en tiempo y concentración.

### Día de marcaje y análisis

3. Recuperar las células con tripsina y se añaden junto a las que se encuentran en suspensión a tubos de citometría (1 por pocillo), posteriormente se centrifugan a 1.230 xg durante 5 min y se elimina el sobrenadante.
4. Según el análisis que queremos realizar, resuspender el pellet en diferentes tampones [3, 14].

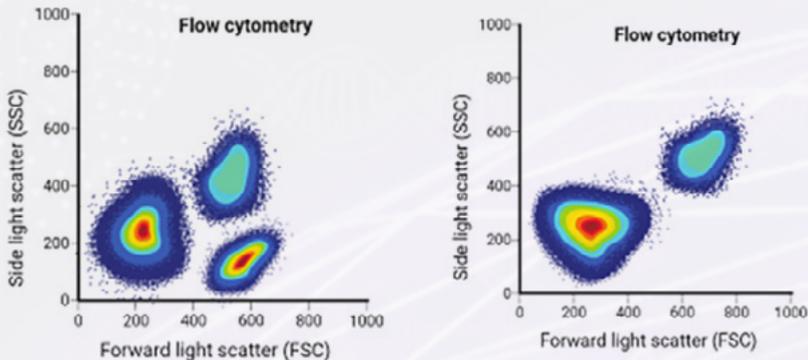
**Anexina V-FITC** (*ANXVF-200T, Immunostep*) para detectar la fosfatidilserina de la membrana interna celular, que queda expuesto en la cara externa en etapas tempranas del proceso apoptótico: Añadir 200  $\mu\text{L}$ /pocillo diluida en una solución de tampón anexina V en PBS 1X. Incubar 15 minutos a 37 °C o 30 min a T<sup>a</sup> ambiente. La fluorescencia verde emitida se capta en el canal FL1.

**Yoduro de propidio (IP)** (*P4170, Sigma*), para determinar el porcentaje de muerte celular: Añadir a cada uno de los tubos 10  $\mu\text{L}$  de IP 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (previamente incubados con anexina V-FITC). La fluorescencia emitida se determinó analizando la población celular en el canal FL3.

**DIOC<sub>6</sub>(3) (3,3-dihexiloxacarbocianina yodado)** (*D273, Invitrogen*) es un fluorocromo lipofílico catiónico que se retiene en la parte cargada negativamente de la membrana de las mitocondrias con un potencial de membrana normal. Incubar las células durante 15 min a 37 °C con DIOC<sub>6</sub>(3) diluido en medio celular a una concentración final de 40 nM.

**Hidroetidio (He)** (*D399, Invitrogen*) para detectar la generación de radical superóxido producido por la NADPH oxidasa ligada a la membrana de la mitocondria. Incubar las células durante 15 min a 37 °C con He diluido en PBS 1X a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ . El He citosólico muestra fluorescencia azul, pero cuando es oxidado a etidio emite fluorescencia roja. La fluorescencia emitida se analizó en el canal FL3.

**Diacetato de 6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoreceína (H<sub>2</sub>DCFDA)** (*10533084, Invitrogen*) para determinar la generación de ROS. Incubar las células durante 15 min a 37 °C diluido en PBS 1X a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$ . La membrana plasmática es permeable a este fluorocromo, que en el interior de la célula es convertido a diclorodihidrofluoreceína (H<sub>2</sub>DCF) por las esterasas intracelulares. Cuando se pone en contacto con ROS, emite fluorescencia verde que será detectada en el canal FL1.



## CAPÍTULO 13

# ANÁLISIS SEAHORSE

### Día 1

#### Placa de células

1. Añadir en la placa de 96 pocillos (*Agilent Seahorse XF96*), 80  $\mu\text{l}$  de medio sin células en las 4 esquinas (serán nuestros blancos).
2. Sembrar 80  $\mu\text{l}$ /pocillo de células con su medio.



NOTA: Resuspender muy bien las células antes de contarlas y sembrarlas, Determinar la concentración ideal de siembra (en un rango de  $10^5$  células). Si nuestras células no son adherentes, podemos pre-tratar la placa con polilisina o colágeno. Preparar más volumen de medio + células para poder utilizar la pipeta multicanal y no utilizar volúmenes demasiado pequeños y así, evitar errores.

3. Incubar la placa sembrada 1 hora a  $T^a$  ambiente, luego introducir la placa en el incubador a  $37^\circ\text{C}$ , con  $\text{CO}_2$ .
4. Tras 3-4 horas, añadir 100  $\mu\text{l}$ /pocillo más de medio (volumen final 180  $\mu\text{l}$ ).

NOTA: si ha pasado menos tiempo, dejar con los 80  $\mu\text{l}$  de medio para evitar mover las células, ya que no estarán pegadas y se pueden ir a los bordes.

#### Cartucho

5. Hidratar el cartucho. Añadir 200  $\mu\text{l}$ /pocillo de  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ o de tampón de calibración.

NOTA: Si se hidrata con  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ tenemos que cambiarlo, al menos una hora antes de realizar el experimento, por el mismo volumen de tampón de calibración. Si se hidrata directamente con el tampón de calibrado, no debe estar más de 24 horas.

6. Mantener a  $37^\circ\text{C}$  en la estufa (sin  $\text{CO}_2$ ).

NOTA: Si las células no estuvieran el día 2, podemos cambiar el agua o el tampón de calibrado por agua y volveríamos a hidratar con el tampón 1 hora antes del experimento. Los cambios de agua se pueden hacer volcando directamente la placa.

## Día 2

### Placa de células

7. Calentar tanto el medio normal de las células como el medio *Seahorse* (XF DMEM, 103575-100, Agilent).
8. Preparar los tratamientos que queramos realizar en la placa.
9. Retirar el medio de la placa (80 o 180  $\mu\text{L}$ /pocillo).

NOTA: Poner un volumen mayor en la pipeta multicanal para coger todo el volumen, contra la pared inferior, inclinando la placa en vertical y con mucho cuidado de no tocar el fondo. Los cambios de medio en la placa con células no hacerlos nunca ni con la bomba de vacío ni volcando la placa.

10. Retirar el medio de 3-4 filas a la vez para evitar que se queden sin medio mucho tiempo las células e ir añadiendo los tratamientos preparados previamente, con la placa en plano, también por la pared y con mucho cuidado.

NOTA: Importante añadir primero medio sin tratamiento en las 4 esquinas.

11. Dejar incubando las horas de tratamiento en el incubador, a 37 °C y con CO<sub>2</sub>.

NOTA: El volumen del tratamiento es de 100  $\mu\text{l}$ /pocillo. Preparar el medio *Seahorse* (sin rojo fenol y bicarbonato) adicionando glutamina 1X, glucosa 10 mM y sodio piruvato 1X.

12. Cuando a nuestro experimento le quede 1 hora para finalizar, cambiamos el tratamiento con medio normal que tiene la placa por el mismo tratamiento pero en medio *Seahorse*.

NOTA: Preparar los distintos tratamientos con el medio *Seahorse* (180  $\mu\text{l}$ /pocillo).

13. Retirar los tratamientos de la placa, con un volumen mayor (120  $\mu\text{l}$ ) en la pipeta multicanal, inclinando la placa en vertical y por la pared. Lavar los pocillos.
14. Conforme retiramos el medio normal vamos añadiendo unos 120  $\mu\text{l}$ /pocillo del medio *Seahorse* (sin tratamiento).
15. Cuando toda la placa tenga medio *Seahorse* (120  $\mu\text{l}$ ), comenzamos a retirarlo, ahora sí, retirando todo el medio para que no queden restos del medio normal, con rojo fenol (180  $\mu\text{l}$ ).
16. Según retiramos el medio *Seahorse*, vamos añadiendo el medio *Seahorse* con los tratamientos (180  $\mu\text{l}$ /pocillo).
17. Incubar la placa 45 min-1 hora a 37 °C, en la estufa.

### Cartucho

18. Sustituir el agua miliQ del cartucho de calibración por el tampón de calibrado (200  $\mu\text{l}$ ) y volver a incubar a 37° en la estufa.

NOTA: Si el cartucho estaba hidratándose directamente con tampón de calibrado, no haremos nada con el hasta que carguemos los inhibidores. El cambio de agua por calibrador se puede hacer volcando la placa.

19. Proceder a cargar las sondas de los inhibidores en el cartucho. Los inhibidores se van a diluir en menos de 1 ml de medio *Seahorse*.

(Cartucho): **NOTA:** buscar la información correspondiente al kit que se vaya a usar con el QR que viene en la propia caja del kit.

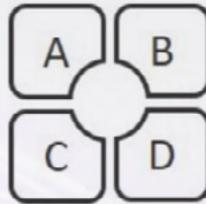
20. Añadir el volumen de medio *Seahorse* que se indique y resuspender bien en el vortex, ya que los compuestos vienen liofilizados.
21. Añadir el volumen que corresponda de cada compuesto y de medio *Seahorse* en la placa reservorio para tener la concentración final que necesitamos.

NOTA: Antes de añadir ningún inhibidor, meter y sacar varias veces el cartucho del líquido de calibrado para eliminar cualquier burbuja que se haya podido generar. El volumen final para cargar de cada compuesto se puede modificar según nuestras necesidades.

22. Añadir los inhibidores al puerto que le corresponda, A, B, C o D, (con o sin la planchilla que incorpora el propio cartucho).

NOTA: Añadir de izquierda a derecha, con la pipeta multicanal, apoyando la punta en la pared y de forma muy lenta para que resbale poco a poco y no generar ninguna burbuja. No tocar el fondo. No dar golpes para intentar bajar el volumen o quitar burbujas, si las hubiera. Mucho cuidado de que no caiga nada en el puerto central. En caso de que ocurra, no seguir utilizando ese cartucho.

23. En el puerto A añadiremos 20  $\mu$ l/pocillo, en el puerto B, 22  $\mu$ l/pocillo, en el C, 25  $\mu$ l/pocillo y en el D, 27  $\mu$ l/pocillo.



24. Introducir el cartucho completo en el aparato y comenzará una etapa de calibrado.

NOTA: Meter las placas en el aparato SIN las tapas. En cuanto termine el calibrado, el aparato nos va a pedir la placa de las células y nos devolverá la placa con el líquido de calibrado. Si han pasado al menos 45 min desde que la pusimos en la estufa podemos ponerla en el aparato. Comenzará con una etapa de equilibrado (esta etapa dura unos 13 min). En cuanto termine comenzará con las medidas basales y las inyecciones. Al terminar todo el proceso, cuya duración dependerá del kit utilizado y de las modificaciones que nosotros realicemos, nos pedirá que finalicemos el programa y la máquina nos devolverá tanto el cartucho como la placa de las células.

25. Fijar la placa de células.
26. Eliminar 80  $\mu$ l/pocillo de medio, de manera que nos queden 100  $\mu$ l/pocillo.
27. Añadir 100  $\mu$ l/pocillo de PFA (con o sin Hoechst).
28. Incubar durante 10-15 minutos.

29. Eliminar todo el volumen de los pocillos.
30. Añadir 200  $\mu$ l/pocillo de PBS. Cerrar bien con parafilm y papel de aluminio y guardar refrigerado.

#### Aparato

31. Encender el ordenador, abrir el programa y configurar el archivo del experimento/kit que vamos a realizar.
32. Elegir el protocolo que se corresponda con el kit que vayamos a utilizar o diseñamos uno nosotros.
33. *Groups definitions*: Elegimos las “injection strategies”, en caso de que sean diferentes a las predeterminadas por el kit. Añadimos los “(pre)treatments” que tenemos. Podemos seleccionar el “cell type” y el “assay media”, en caso de ser diferente al medio *Seahorse* comercial.

NOTA: Añadir tantos “treatments” como condiciones tengamos en nuestra placa (tratamientos, densidades celulares y/o tiempos de incubación diferentes).

34. *Plate maps*: Definir la distribución de los “treatments” que hayamos añadido. Las 4 esquinas marcadas en negro, son los blancos. Seleccionar las condiciones y marcar por colores, arrastrando encima de la placa, las filas de pocillos que ocupen cada uno de ellos. En las “injection strategies” se puede indicar/modificar la concentración a la que vamos a usar los diferentes compuestos que estamos cargando en cada uno de los puertos del cartucho.
35. *Protocol*: Aparecerán los distintos pasos que va a seguir el experimento, el calibrado y el equilibrado, la medida basal y las diferentes inyecciones que va a realizar, con sus tiempos y ciclos de mezclas, esperas y medidas.

NOTA: Estos ciclos pueden customizarse según necesidad.

36. *Run assay*: Añadir un nombre para nuestro experimento y para el archivo que va a generar al finalizar el mismo, y definimos donde guardaremos dicho documento.

NOTA: No iniciar hasta que no tengamos listo el cartucho con las sondas cargadas.

#### Día 3. Análisis de resultados

37. Primero *add* y luego *overview*.
38. Quitar *background* (entre -5 y +5 y nunca pasar de  $\pm 20$ ).
39. Niveles de oxígeno (*well*) (*level*)  $\rightarrow$  entre 140 y 160 mm Hg.
40. Tasa de consumo de oxígeno (OCR) lo óptimo es que esté a 100 picomoles/min.
41. *Modify*  $\rightarrow$  *plate map*  $\rightarrow$  seleccionar los pocillos que sean y le damos a aplicar (los pocillos pasan a ser grises pero es normal, los valores están ahí).

42. Niveles de pH → 7,4 o 7,3 (a veces 7,5).
43. ECAR (*extracellular acidification rate*) → niveles entre 5 y 10 (mpH/min).
44. Poner *background correction*.
45. Quitar datos erróneos.
46. Cambiar *level* por *rate*.
47. Al acabar exportar y trabajar con excell.



## CAPÍTULO 14

### ANÁLISIS: *FILTER TRAP*

Realizar el lisado celular o de tejido siguiendo protocolo (1.4.7 y 1.4.8) para dos fracciones [7]:

– Fracción SOLUBLE:

1. Lisar las muestras con el volumen que corresponda de NP40 0,5 x.
2. Incubar 10-15 minutos en hielo.
3. Centrifugar a 13.000 rpm entre 15-60 minutos.
4. Recoger el sobrenadante en eppendorfs rotulados como normalmente, añadiendo “Soluble”.

– Fracción INSOLUBLE:

1. Resuspender el pellet, que normalmente se desecharía, con un volumen adecuado de SB1x.
2. Sonicar.
3. Calentar 10 minutos en el termobloque y dar un spin. Mantener en el mismo eppendorf previamente rotulado añadiendo “Insoluble” a la información del mismo.

Para realizar el *Filter Tap* necesitamos [16]:

– Aparato



– Membranas de nitrocelulosa de 12 × 9 cm

- TBS
 

{	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tris 4,84 g</li> <li>- NaCl 58,48 g</li> <li>- ddH<sub>2</sub>O 2 L</li> </ul>	}	Frío. Ajustar pH a 7,5 con HCl
---	---	---	--------------------------------

  - TBS + SDS 2%
  - TBS + SDS 0,1%
- TTBS
 

{	<ul style="list-style-type: none"> <li>- TBS 1 L</li> <li>- Tween 20 0,5 mL</li> </ul>	}
---	--	---

- 3 papeles de filtro propios del aparato
- Reservorios de multicanal
- Pipeta multicanal
- Puntas
- Bomba de vacío
- Muestras

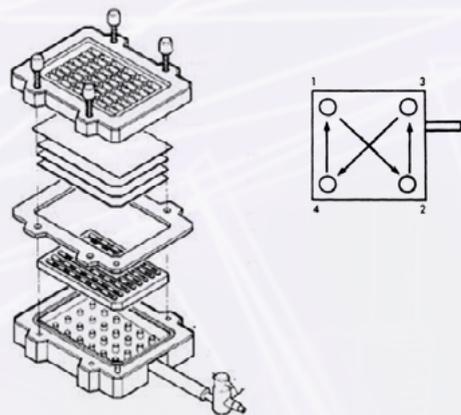
5. Preparar las muestras con TBS + SDS 2%, a distintas concentraciones, una en la misma concentración a la que vamos a realizar la técnica de *Western blotting* de la parte soluble (por ejemplo 20 µg de proteína), una en una concentración intermedia (12 µg de proteína) y otra a una concentración inferior (4 µg de proteína).

NOTA: El volumen final de cada muestra es 200 µL.

Para comenzar:

6. Embeber los 3 papeles de filtro y la membrana, previamente rotulada, en TBS + SDS 2%.
7. Conectamos el aparato con la bomba de vacío y abrimos el mismo para luego montarlo de la siguiente manera:

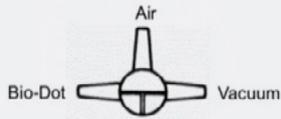
- Base del aparato
- Placa de soporte
- Borde sellador de plástico
- 3 papeles de filtro
- Membrana
- Tapa del aparato



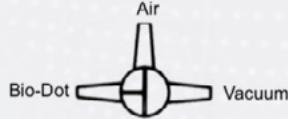
NOTA: Debemos asegurarnos que no haya burbujas en los papeles de filtro ni en la membrana. Cuando todo está colocado todo se cierra la tapa así, para asegurarnos de que se aplica la misma cantidad de presión a toda la superficie:

8. Encender la bomba de vacío y aplicamos vacío (posición 1).

POSICIONES DE LA VÁLVULA DE LA BOMBA DE VACÍO



Posición 1



Posición 2



Posición 3

NOTA: Nos aseguramos de que está bien cerrado, volviendo a apretar los tornillos como antes.

9. Ponemos la bomba en “aire” (posición 2) y añadir 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de TBS + SDS 2% para rehidratar la membrana después de aplicar el vacío. Así evitamos problemas posteriores.
10. Cuando todos los pocillos tengan 100  $\mu\text{L}$ , ponemos la bomba en vacío suave (posición 3) y esperamos a que todo el volumen desaparezca, atravesase la membrana.
11. Volver a la posición 2 y apagar la bomba.

NOTA: En esta posición somos nosotros quienes regulamos el vacío poniendo un dedo sobre el puerto de la válvula que está expuesto al aire.

12. Añadir entre 50 y 500  $\mu\text{L}$  de muestra, lo óptimo es añadir un volumen 200  $\mu\text{L}$ , por pocillo. Si tenemos pocillos sin muestra, debemos añadirles 200  $\mu\text{L}$  de TBS + SDS 2% para asegurarnos de que se aplica un correcto vacío en todos los pocillos.
13. Encender la bomba de vacío y aplicamos la posición 3 hasta la desaparición de todo el volumen de todos los pocillos.
14. Poner posición 2, añadir 200  $\mu\text{L}$ /pocillo de TBS + SDS 0,1% para lavar los pocillos y volvemos a la posición 3.
15. Al finalizar, mantener la bomba encendida y proceder a aflojar los tornillos de las 4 esquinas para quitar la tapa.
16. Apagamos la bomba y sacar la membrana.
17. Bloquear la membrana con leche al 10% preparada en TBS, durante 30 min.-1 hora.
18. Seguir protocolo de *Western blotting*.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gómez-Sánchez R, Pizarro-Estrella E, Yakhine-Diop SMS, et al. (2015). Routine Western blot to check autophagic flux: Cautions and recommendations. *Anal Biochem* 477:13-20. <<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.020>>.
- [2] Gómez-Sánchez R, Yakhine-Diop SMS, Bravo-San Pedro JM, et al. (2016). PINK1 deficiency enhances autophagy and mitophagy induction. *Mol Cell Oncol* 3. <<https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1046579>>.
- [3] Yakhine-Diop SMS, Niso-Santano M, Rodríguez-Arribas M, et al. (2019). Impaired Mitophagy and Protein Acetylation Levels in Fibroblasts from Parkinson's Disease Patients. *Mol Neurobiol* 56:2466-2481. <<https://doi.org/10.1007/s12035-018-1206-6>>.
- [4] López-Otín C, Mariño G (2017). Tagged ATG8-Coding Constructs for the In Vitro and In Vivo Assessment of ATG4 Activity. *Methods Enzymol* 587:189-205. <<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.11.001>>.
- [5] Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, et al. (2014). Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Mol Cell* 53:710-725. <<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.016>>.
- [6] Niso-Santano M, Malik SA, Pietrocola F, et al. (2015). Unsaturated fatty acids induce non-canonical autophagy. *EMBO J* 34:1025-1041. <<https://doi.org/10.15252/embj.201489363>>.
- [7] A.H. Lystad AS (2015). Assays to monitor aggrephagy. *Methods* 112-119.
- [8] Martínez Chacón G (2017). Propiedades neuroprotectoras de componentes de la jalea real en la enfermedad de Parkinson: Papel de la autofagia.
- [9] Yakhine-Diop SMS, Martínez-Chacón G, González-Polo RA, et al. (2017). Fluorescent FYVE Chimeras to Quantify PtdIns3P Synthesis During Autophagy. *Methods Enzymol* 587:257-269. <<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.060>>.
- [10] Gómez-Sánchez R, Yakhine-Diop SMS, Rodríguez-Arribas M, et al. (2016). mRNA and protein dataset of autophagy markers (LC3 and p62) in several cell lines. *Data Br* 7:641-647. <<https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.02.085>>.
- [11] Yakhine Diop S.M.S (2016). Acetilación, autofagia y enfermedad de parkinson.
- [12] Rodríguez Arribas M (2018). Importancia de los sistemas de reciclaje celular en células procedentes de enfermos de Parkinson. 175.

- [13] Gómez R (2013). Papel de la proteína PINK1 en la enfermedad de Parkinson: su implicación en el daño mitocondrial y autofagia.
- [14] Estrella EP (2014). El factor de transcripción Nrf2 como nueva diana terapéutica para la Enfermedad de Parkinson.
- [15] Rodríguez-Arribas M, Pizarro-Estrella E, Gómez-Sánchez R, et al. (2016). IFDOTMETER: A New Software Application for Automated Immunofluorescence Analysis. *J Lab Autom* 21:246-259. <<https://doi.org/10.1177/2211068215600650>>.
- [16] (2000). *Microfiltration Apparatus Instruction Manual*. 57:809-814.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Tampón fosfato salino .....	16
Tabla 2.	Solución de congelación celular .....	16
Tabla 3.	Tampón de carga 5X (10 ml) .....	17
Tabla 4.	CAPS 10X (100 mM) (1 L) y CAPS 1X (10 mM) (1 L) .....	19
Tabla 5.	Tris Glicina Metanol .....	19
Tabla 6.	Tampón TTBS 10X y Tampón TTBS 1X .....	20
Tabla 7.	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> .....	21
Tabla 8.	Rojo <i>Ponceau</i> .....	22
Tabla 9.	Tritón X-100 .....	23
Tabla 10.	PFA 4% .....	23
Tabla 11.	BSA 1 mg/ml .....	23
Tabla 12.	Composición del tampón de lisis NP40 al 0,5% .....	24
Tabla 13.	Composición del tampón de lisis SB 1X .....	25
Tabla 14.	Composición del tampón de lisis RIPA para células y cerebro .....	26
Tabla 15.	Composición del tampón de lisis Tritón X-100 para hígado y corazón ..	26
Tabla 16.	Composición del tampón de lisis Tritón X-100. Fracción soluble .....	27
Tabla 17.	Composición del tampón de lisis SDS 2%. Fracción insoluble .....	27
Tabla 18.	Composición del tampón de lisis: Nuclear .....	28
Tabla 19.	Composición del tampón de lisis: citosólico .....	28



## ÍNDICE DE AUTORES

### **Guadalupe Martínez Chacón**

Investigador Postdoctoral. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)  
Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)  
Correo electrónico: [guadalupecmc@unex.es](mailto:guadalupecmc@unex.es) / [gmartinezchacon@gmail.com](mailto:gmartinezchacon@gmail.com) / [gmartinezchacon@hotmail.com](mailto:gmartinezchacon@hotmail.com)  
ORCID: 0000-0002-6301-8828

### **José Manuel Fuentes Rodríguez**

Catedrático de Universidad. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)  
Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)  
Correo electrónico: [jfuentes@unex.es](mailto:jfuentes@unex.es)  
ORCID: 0000-0001-6910-2089

### **Sokhna Maryama Seydina, Yakhine Diop**

Investigadora postdoctoral. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)  
Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)  
Correo electrónico: [smsyakhinediop@unex.es](mailto:smsyakhinediop@unex.es) / [bintou.umran@gmail.com](mailto:bintou.umran@gmail.com)  
ORCID: 0000-0002-4868-3352

### **Mario Rodríguez Arribas**

Profesor de Enseñanza Secundaria (I.E.S. Javier García Téllez)  
Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)  
Correo electrónico: [matoria@unex.es](mailto:matoria@unex.es)  
ORCID: 0000-0002-9727-0490

**Marta Paredes Barquero**

Predoctoral. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [martapb@unex.es](mailto:martapb@unex.es)

ORCID: 0000-0002-5698-8180

**Eva Alegre Cortés**

Personal Científico Investigador. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [evalegrec@unex.es](mailto:evalegrec@unex.es)

ORCID: 0000-0002-0733-229X

**Saray Canales Cortés**

Predoctoral (FPU). Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [saraycanales1991@gmail.com](mailto:saraycanales1991@gmail.com) / [sacanalesc@unex.es](mailto:sacanalesc@unex.es)

ORCID: 000-0002-5468-3308

**Gema Duque González**

Técnico de apoyo. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [geduqueg@unex.es](mailto:geduqueg@unex.es) / [gemaduque16@gmail.com](mailto:gemaduque16@gmail.com)

ORCID: 0000-0002-3016-0094

**Alberto Giménez Bejarano**

Predoctoral. Personal científico investigador. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [agimenezb@unex.es](mailto:agimenezb@unex.es)

ORCID: 0000-0003-2426-0918

**Maria Pura Delgado Luceño**

Técnico de apoyo. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [pdluce@unex.es](mailto:pdluce@unex.es)

**Elisabet Uribe Carretero**

Predoctoral (FPU). Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biomédica de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [euribec@unex.es](mailto:euribec@unex.es)

ORCID: 0000-0001-6477-5268

**Mireia Niso Santano**

Personal Investigador Ramón y Cajal. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética.

Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biosanitaria de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [mnisosan@unex.es](mailto:mnisosan@unex.es)

ORCID: 0000-0002-6506-422X

**Rosa Ana González Polo**

Profesor Contratado Doctor. Departamento Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Facultad de Enfermería y Terapia Ocupacional. Universidad de Extremadura

Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

Instituto Universitario de Investigación Biosanitaria de Extremadura (INUBE)

Correo electrónico: [rosapolo@unex.es](mailto:rosapolo@unex.es)

ORCID: 0000-0002-0163-2953

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

