



TESIS DOCTORAL

"Estudio del uso de metabolitos derivados de la microbiota intestinal (y sus precursores) como estrategia terapéutica en modelos de enfermedad de Parkinson"

Saray Canales Cortés

Doctorado en Salud Pública y Animal

Con la conformidad de los directores:

Dr. José Manuel Fuentes Rodríguez

Dra. Rosa Ana González Polo

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

2023

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

1. Proyecto **PID2021-122576OB-I00** financiado por MCIN/ AEI /10.13039/501100011033



2. Proyecto **IB20031** financiado por la Consejería de Economía e Infraestructuras- Comunidad Autónoma de Extremadura.



3. Programa para el Fomento de la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del VI Plan Regional de I+D+i (2018-2021). Expediente: GR18063



4. Programa para el Fomento de la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del VI Plan Regional de I+D+i (2021-2022). Expediente: GR21063



Saray Canales Cortés ha sido beneficiaria de la Ayuda **FPU19/04435** financiada por MCIN/AEI /10.13039/501100011033 y por FSE invierte en tu futuro.



Resumen

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa de mayor prevalencia a nivel mundial. En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el uso de diferentes compuestos de origen natural con capacidad antiinflamatoria y antioxidante y que son capaces de restablecer estos procesos degradativos que están alterados, pudiendo ejercer un papel importante en el tratamiento de este tipo de patologías. En base a esto nos planteamos analizar el posible efecto protector que pueden tener diferentes compuestos bioactivos procedentes del cascabullo (un subproducto) de la bellota en modelos de la enfermedad de Parkinson, debido a las propiedades beneficiosas descritas para este fruto, por su elevado contenido en polifenoles. En este trabajo se ha comprobado la efectividad de estos extractos de inducir autofagia y mitofagia, así como aumentar la calidad mitocondrial, protegiendo frente al estrés de este organelo asociado a la exposición de pesticidas. Además se ha comprobado su eficacia frente a la protección de la muerte celular en presencia de mutaciones asociadas a la enfermedad de Parkinson así como a un aumento de la vida media y la mejora de la actividad locomotora en un modelo de *Drosophila melanogaster* portador de estas mutaciones. Por tanto, aunque son necesarios estudios más exhaustivos para esclarecer los mecanismos a través de los cuales los extractos de este subproducto de la bellota ejerce su acción, podemos pensar en la posibilidad de su uso como diana terapéutica de este tipo de desórdenes.

Palabras clave: autofagia, enfermedades neurodegenerativas, productos naturales.

Abstract

Parkinson's disease is the second most prevalent neurodegenerative disease worldwide. In recent years, there has been a growing interest in the use of different compounds of natural origin with anti-inflammatory and antioxidant capacity that are capable of restoring these degradation processes that are altered, which could play an important role in the treatment of this type of pathology. Based on this, we proposed to analyze the possible protective effect that different bioactive compounds from the acorn (a by-product) of the acorn may have in models of Parkinson's disease, due to the beneficial properties described for this fruit, due to its high polyphenol content. In this work, the effectiveness of these extracts to induce autophagy and mitophagy, as well as to increase the mitochondrial quality, protecting against the stress of this organelle associated to pesticide exposure, has been proved. In addition, its efficacy in protecting against cell death in the presence of mutations associated with Parkinson's disease as well as increasing half-life and improving locomotor activity in a *Drosophila melanogaster* model carrying these mutations has also been demonstrated. Therefore, although more exhaustive studies are needed to clarify the mechanisms through which the extracts of this acorn by-product exert their action, we can think of the possibility of its use as a therapeutic target for this type of disorders.

Keywords: autophagy, neurodegenerative diseases, natural products.

Lista de Abreviaturas

3-MA	
del inglés <i>3-methyl adenine</i>	42, 51, 52
ADN	
Ácido desoxiribonucleico	72
ARN	
Ácido ribonucleico	39, 40, 93, 94
Baf. A1	
Bafilomicina A1	51, 52
BCA	
del inglés <i>biconchonic acid</i>	42
BSA	
del inglés <i>bovine serum albumin</i>	42, 66
CAPS	
del inglés <i>N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid</i>	42
CCCP	
del inglés <i>carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone</i>	42, 51
Ct	
del inglés <i>threshold cycle</i>	72
DMEM	
del inglés <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	39, 47, 51
DMSO	
Dimetilsulfóxido	42, 51
EBSS	
del inglés <i>Earle's balanced salt solution</i>	51
ECL	
del inglés <i>enhanced luminiscent by luminol</i>	41, 67
EDTA	
del inglés <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	37, 41
FBS	
del inglés <i>fetal bovine serum</i>	42, 47
FH	
<i>Fibroblastos humanos</i>	93, 136
GAPDH	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	39, 66, 75
HEPES	
del inglés <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid</i>	43
HRP	
del inglés <i>horseradish peroxidase</i>	36, 67
IP	
Ioduro de propidio	38, 43
LAMP1	
del inglés <i>lysosomal associated membrane protein 1</i>	40, 75
LAMP2	
del inglés <i>Lysosomal associated membrane protein 2</i>	40, 75
LC3	
del inglés <i>microtubule associated protein LC3</i>	39, 66, 136
LONP-1	
del inglés <i>lon peptidase-1</i>	41, 66, 75

LTR	
del inglés <i>Lysotracker red</i>	77, 81
MFN1	
Mitofusina 1	40, 75
MFN2	
Mitofusina 2	40, 75
mTOR	
del inglés <i>mammalian target of rapamycin</i>	38, 51, 66
p62	
del inglés <i>sequestosome-1</i>	36, 66
PBS	
del inglés <i>phosphate saline buffer</i>	61, 77
PCR	
del inglés <i>polymerase chain reaction</i>	94
PI3KC1	
PI3K de clase 1	51
PI3KC3	
PI3K de clase 3	51
PVDF	
del inglés <i>polyvilydene difluoride</i>	37
SDS	
del inglés <i>sodium dodecyl sulphate</i>	37, 62
SDS-PAGE	
del inglés <i>SDS-polyacrilamide gel electrophoresis</i>	62
TFEB	
factor de transcripción EB.....	39, 41, 75
TOM	
del inglés <i>translocase of outer mitochondrial membrane</i>	78
TTBS	
del inglés <i>Tween-tris buffer saline</i>	65, 66, 67

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1. Tipos de autofagia.....	24
Ilustración 2. Etapas de la macroautofagia.....	25
Ilustración 3. Estructura mitocondrial.....	29
Ilustración 4. Sistema de la bomba ATPasa.....	31
Ilustración 5. Dinámica mitocondrial.....	34
Ilustración 6. Protocolo para la cuantificación de proteínas mediante BCA. ...	76
Ilustración 7. Esquema de transferencia de proteínas en húmedo.	79
Ilustración 8. Incubación de anticuerpos y visualización de proteínas	82
Ilustración 9. Esquema del silenciamiento génico	84
Ilustración 10. Reporter MitoTimer.....	85
Ilustración 11. Condiciones del termociclador.....	89
Ilustración 12. Condiciones qPCR a tiempo real en 7500.....	91
Ilustración 13. Protocolo de siembra celular para análisis metabólico mediante seahorse.....	98
Ilustración 14. Procedimiento para el análisis metabólico mediante seahorse	100
Ilustración 15. Cadena de transporte mitocondrial.....	101

Índice de Tablas

Tabla 1. Tipos de células utilizadas.....	60
Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para cada línea celular.	61
Tabla 3. Componentes del tampón fosfato salino.....	62
Tabla 4. Número de células necesarias para su uso óptimo, según la placa de uso.	64
Tabla 5. Fármacos más utilizados durante la tesis.....	65
Tabla 6. Extractos de cascabello en diferentes solventes.....	66
Tabla 7. Compuestos usados para la formación del NP40 0,5%.	71
Tabla 8. Compuestos usados para la formación del tampón SB1X.....	72
Tabla 9. Tabla resumen con todos los componentes del tampón RIPA.....	75
Tabla 10. Componentes del tampón de carga 5X.....	77
Tabla 11. Componentes de los tampones utilizados para la electroforesis y la transferencia de proteínas respectivamente.	78
Tabla 12. Compuestos utilizados en la preparación de TTBS 10X y TTBS 1X.....	80
Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en el Western blotting.....	81
Tabla 14. Kit de retrotranscripción	88
Tabla 15. Compuestos para la preparación de las muestras de qPCR	89
Tabla 16. Primers sentido y antisentido utilizados.....	90
Tabla 17. Tipos de marcajes in vivo.....	92
Tabla 18. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Inmunofluorescencia	93
Tabla 19. Marcajes in vivo utilizados en Citometría de flujo	96
Tabla 20. Componentes del medio seahorse.....	99
Tabla 21. <i>Compuestos Kit Mitro Stress</i>	101
Tabla 22. <i>Caracterización de los extractos de cascabello de bellota verde y maduro</i>	106

Índice de Figuras

Figura 1. Normalización de los extractos de cascabello de bellota maduro (CMA) y verde (CVA).....	106
Figura 2. Determinación de viabilidad celular mediante ensayo por MTT.	107
Figura 3. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la etapa de nucleación y elongación.....	108
Figura 4. Expresión de los genes implicados en la etapa de fusión.	109
Figura 5. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la etapa degradativa de la autofagia.	110
Figura 6. Flujo autofágico inducido por extractos de cascabello de bellota maduro.....	111
Figura 7. Flujo autofágico inducido por extractos de cascabello de bellota verde.	112
Figura 8. Flujo autofágico inducido por extractos de cascabello de bellota maduro.....	113
Figura 9. Flujo autofágico tiempo-dependiente inducido por extractos de cascabello de bellota verde.....	114
Figura 10 . Flujo autofágico inducido por cascabello maduro (CMA) en ratones ICR.	115
Figura 11. Flujo autofágico inducido por cascabello verde (CVA) en ratones ICR.	116
Figura 12. Colocalización entre la proteína p62 y LC3 en H4-GFP-LC3.....	117
Figura 13. Estudio ultraestructural de orgánulos involucradas en el proceso de autofagia, y estudio de la degradación de proteínas de vida media larga...	118
Figura 14. Marcaje con LysoTracker Red (LTR) de células de neuroglioma humano (H4 GFP-LC3) tratadas con extractos de cúpula de bellota y EBSS...	119
Figura 15. Determinación del papel de la proteína Atg5 en la autofagia inducida por extractos de cascabello maduro (CMA)..	120
Figura 16. Determinación del papel de la proteína Atg5 en la autofagia inducida por extractos de cascabello verde (CVA).	121
Figura 17. Efecto del silenciamiento de TSC2 sobre los niveles de LC3 tras el tratamiento con cascabello maduro (CMA).	122
Figura 18. Efecto del silenciamiento de TSC2 sobre los niveles de LC3 tras el tratamiento con cascabello verde (CVA)..	123

Figura 19. Efecto del silenciamiento de AMPk sobre los niveles LC3 en células tratadas con los extractos de cascabello maduro (CMA) y verde (CVA).	124
Figura 20. Efecto de los extractos de cúpula de bellota en la colocalización de las proteínas TOMM20 y LAMP1 en fibroblastos controles y procedentes de enfermos de Parkinson.....	126
Figura 21. Imágenes ultraestructurales de mitofagosomas.....	127
Figura 22. Efecto de los extractos de cúpula de bellota en la mitofagia.....	127
Figura 23. Determinación de los niveles de proteínas mitocondriales (TOMM20 y TIMM23) con CMA.	128
Figura 24. Determinación de los niveles de proteínas mitocondriales (TOMM20 y TIMM23) con CVA.	129
Figura 25. Determinación de los niveles de la proteína PINK1 tras un aislamiento mitocondrial.....	130
Figura 26 Determinación de los niveles de la proteína p-UbSer65 tras un aislamiento de la fracción mitocondrial.	131
Figura 27. Determinación de los niveles de la proteína LONP1.	132
Figura 28. Determinación de los niveles de la proteína LONP1..	132
Figura 29. Determinación de los niveles de la proteína LONP1, tras aislamiento de la fracción mitocondrial.....	133
Figura 30. Determinación de los niveles de la proteína LONP1.	134
Figura 31. Determinación de los niveles de la proteína LONP1.	135
Figura 32. Determinación de los niveles de la p62 y NIX, tras un aislamiento mitocondrial.....	136
Figura 33. Protección de los extractos de cascabellos de bellota frente al estrés mitocondrial inducido por rotenona en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.	138
Figura 34. Determinación de la ramificación mitocondrial, mediante el análisis de TOMM20 en fibroblastos WT.	139
Figura 35. Estudio de la calidad mitocondrial en SH-SY5Y, mediante la expresión del reporter MitoTimer.....	140
Figura 36. Imágenes ultraestructurales de mitocondrias en células SH-SY5Y tratadas con CMA 0.25%.....	141
Figura 37. Determinación del metabolismo mitocondrial mediante Seahorse.	142

Figura 38. <i>Determinación de del factor de transcripción A (TFAM) en fibroblastos controles y procedentes de enfermos de Parkinson.</i>	144
Figura 39. <i>Determinación de ADNmt en fibroblastos controles y procedentes de enfermos de Parkinson.</i>	145
Figura 40. <i>Determinación de los niveles de las proteínas (PGC1a, Tomm20 y P-TFEB) en células de osteosarcoma (U2OS).</i>	146
Figura 41. <i>Protección de la muerte celular por extractos de cúpula de bellota en fibroblastos humanos.</i>	147
Figura 42. <i>Determinación de la actividad locomotora en modelos de Parkinson.</i>	148
Figura 43. <i>Determinación de la vida media en un modelo de Parkinson.)</i>	149
Figura 44. <i>Determinación de la vida media en un modelo de Parkinson.</i>	150

Introducción

1.1 Enfermedades neurodegenerativas

Se conoce como enfermedades neurodegenerativas, a aquellos trastornos crónicos donde existe una degeneración y pérdida progresiva de las células del sistema nervioso, especialmente ubicadas en cerebro y médula espinal. (J. Li et al., 2013)

En condiciones normales, las neuronas se encargan de transmitir impulsos eléctricos y químicos que permiten la comunicación entre las diferentes partes del cuerpo y del sistema nervioso (SN). Sin embargo, en las enfermedades neurodegenerativa, estas células comienzan a deteriorarse y a perder su funcionalidad.

Actualmente se sabe que el proceso de degeneración neuronal puede deberse a diferentes mecanismos subyacentes, como la acumulación en el cerebro de proteínas anormales, la formación de agregados tóxicos, la inflamación crónica o la disfunción de los sistemas de limpieza y reparación celular. Estos mecanismos pueden variar según la enfermedad.(J. Li et al., 2013)

Entre algunas de las enfermedades neurodegenerativas más comunes están la Enfermedad de Alzheimer (EA), forma más común de demencia caracterizada por la acumulación de placas de proteína beta-amiloide y ovillos de proteína tau en el cerebro, la Enfermedad de Parkinson (EP) segunda enfermedad neurodegenerativa más común, que se caracteriza por la degeneración de las células dopaminérgicas. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad que afecta a las células nerviosas responsables del control de los músculos voluntarios, y la Enfermedad de Huntington, entre otras. (Vaquer-Alicea & Diamond, 2019)

1.1.1 Enfermedad de Parkinson

1.1.1.1 Concepto y definición

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa crónica y progresiva que afecta el sistema nervioso, especialmente a las regiones del cerebro que controlan el movimiento. Recibe su nombre en honor al médico británico James Parkinson, quien describió por primera vez los síntomas de la enfermedad en 1817.(Tysnes & Storstein, 2017)

Esta enfermedad, se caracteriza principalmente por la degeneración y muerte de las células nerviosas productoras de dopamina, presentes en una parte del cerebro denominada sustancia negra. La dopamina es un neurotransmisor clave que desempeña un papel fundamental en la coordinación y el control del movimiento.

La pérdida de células productoras de dopamina conduce a una disminución en los niveles de dopamina en el cerebro, lo que interfiere con la capacidad del cerebro para regular el movimiento de manera adecuada. A medida que la enfermedad progresa, aparecen síntomas característicos de la EP, temblor, rigidez y bradicinesia.(Tysnes & Storstein, 2017)

1.1.1.2 Etiología

La etiología de la EP es multifactorial, en ésta interactúan tanto factores genéticos como factores ambientales, además de la edad, factor predisponente importante.

1.1.1.2.1 Factores genéticos

Actualmente es bien conocido que la mayoría de los casos de Parkinson no son hereditarios, sin embargo, se ha demostrado que determinados genes están asociados con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Algunos genes específicos que se han identificado como contribuyentes genéticos incluyen:

- Gen PARK1: Mutaciones en el gen PARK1 o SNCA (gen que codifica para la proteína alfa-sinucleína) se han asociado con formas familiares de Parkinson(Polymeropoulos et al., 1997). Estas provocan una acumulación anormal de la proteína alfa-sinucleína. La alfa-sinucleína es una proteína abundante en el cerebro que está implicada en la regulación de la liberación de neurotransmisores y en la formación de vesículas sinápticas. Sin embargo, cuando esta proteína sufre mutaciones, puede acumularse en forma de agregados proteicos llamados cuerpos de Lewy, que se encuentran en áreas específicas del cerebro, como la sustancia negra, donde a su vez provocan un daño neuronal y la degeneración progresiva de las células nerviosas.(Pai, 2023)

- Gen PARK8: Las mutaciones en el gen PARK8, que codifica para la proteína LRRK2 (del inglés, *Leucine-Rich Repeat Kinase 2*) se han relacionado con una forma autosómica dominante de EP. Estos casos representan aproximadamente un 10% de los casos de EP de origen genético (Usmani et al., 2021a)

Otros genes asociados con mutaciones relacionadas con formas raras de EP son el gen PARK2, PINK1, DJ-1 y PARK7.(Kluss et al., 2019; Usmani et al., 2021b)

1.1.1.2.2 Factores ambientales

Actualmente se conoce la existencia de varios factores ambientales muy relacionados con el desarrollo de la EP.

Dentro de los factores ambientales, más conocidos, relacionados con un mayor riesgo de desarrollar EP se encuentran, la exposición de manera prolongada a pesticidas y herbicidas como el paraquat, herbicida que actúa como un generador de radicales libres, provocando un aumento del estrés oxidativo, muy relacionado con el daño y la muerte celular, o la rotenona, inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, consecuencia de una disminución de la producción de ATP y un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del estrés oxidativo(Lin et al., 2014). Además, la exposición a sustancias químicas como el manganeso y el monóxido de carbono, o la exposición a metales pesados como el mercurio, el plomo y el cobre pueden aumentar el riesgo de padecer la enfermedad(Y. Huang et al., 2022).

Por otra parte, existen algunos factores del estilo de vida, que se han asociado también con un mayor riesgo, como la falta de actividad física, una mala calidad del sueño y/o una dieta poco saludable, sin embargo, existen otros factores ambientales que tienen un efecto protector como es el caso del consumo de tabaco (nicotina) y de la cafeína(Kolahdouzan & Hamadeh, 2017; Schepici et al., 2020).

1.1.1.3 Alteración de los sistemas degradativos en la Enfermedad de Parkinson

La EP como hemos comentado es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración progresiva de las células nerviosas en el cerebro. Se ha observado que una de las características distintivas de esta enfermedad

es la alteración de los sistemas degradativos celulares, como el sistema ubiquitina-proteasoma y el sistema autofagia-lisosomal. Estos sistemas juegan un papel crucial en la eliminación de proteínas u orgánulos dañados. (Lizama & Chu, 2021; Lu et al., 2020).

En condiciones normales el sistema ubiquitina-proteasoma marca con ubiquitina las proteínas anormales y las dirige al sistema ubiquitina-proteasoma para su posterior degradación y eliminación.

Por otra parte el sistema autofagia-lisosomal, se encarga de la eliminación de proteínas anómalas, gracias a la función de los lisosomas, que en condiciones normales se unen a unas estructuras denominadas vacuolas de autofagia, que engloban contenido citoplasmático, para la posterior degradación del contenido intravacuolar, mediante enzimas lisosomales. (Lizama & Chu, 2021; Lu et al., 2020).

En la EP, la disfunción de estos sistemas conduce a la acumulación de alfa-sinucleína y a la formación de cuerpos de Lewy, contribuyendo así al daño neuronal y a la progresión de la enfermedad. (Schaser et al., 2019)

1.2 Autofagia

1.2.1 Concepto y definición

La autofagia es un proceso de degradación celular muy bien conservado que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular.

Hoy en día se conoce la existencia de tres tipos de autofagia; la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas y la macroautofagia. La **microautofagia** consiste en la formación de invaginaciones por parte del lisosoma, donde engulle material citosólico para su posterior degradación, la **autofagia mediada por chaperonas** por su parte utiliza la chaperona HSC70, que reconoce proteínas mal plegadas, seguidamente se une a otras cochaperonas con las que trabaja para desplegar estas proteínas, posteriormente, se unen a la proteína lisosomal LAMP2A, que transloca las proteínas desplegadas al interior del lisosoma para su posterior degradación. Por último existe un tercer tipo, la **macroautofagia** o lo que la mayoría denomina "autofagia", ésta implica la formación en el citoplasma de una vesícula de doble membrana denominado fagóforo, que

engulle proteínas mal plegadas, materiales lipídicos u orgánulos dañados. La doble membrana va alargándose hasta formarse por completo y cerrarse, es entonces cuando el fagóforo pasa a denominándose autofagosoma. El autofagosoma ha de fusionarse con el lisosoma, para formar el autofagolisosoma o autolisosoma. El lisosoma es un orgánulo ácido que tras la unión con el autofagosoma, vierte su contenido ácido y degrada el material contenido. (Kulkarni et al., 2018; Nikolettou et al., 2015)

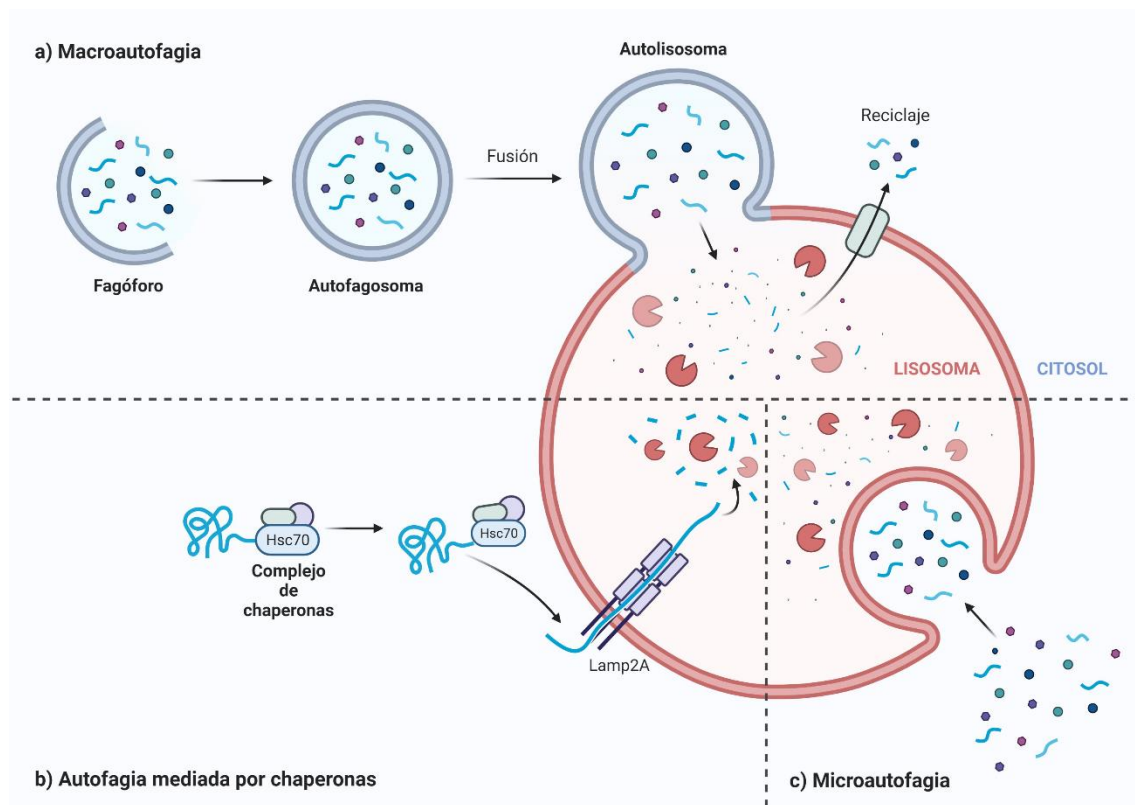


Ilustración 1. Tipos de autofagia

Actualmente se sabe de la existencia de una serie de proteínas, a las cual denominamos ATGs, (del inglés, "Autophagy-related proteins"), que forman parte de la maquinaria que regula este proceso. Estas proteínas se identificaron por primera vez en estudios con levaduras, posteriormente se descubrió que muchos de los genes relacionados con la autofagia en levaduras también se conservan en organismos superiores, incluyendo plantas y mamíferos, lo que sugiere una conservación evolutiva de este proceso. (Jiang & Mizushima, 2015)

Existen más de 30 proteínas ATGs conocidas, y cada una de ellas desempeña un papel específico en diferentes etapas de la autofagia. Algunas proteínas ATGs están involucradas en la formación inicial del autofagosoma, otras en la

elongación y cierre del autofagosoma y por último las implicadas en la fusión del autofagosoma con el lisosoma (Jiang & Mizushima, 2015; Seglen et al., 2015).

1.1.2.2 Etapas de la autofagia. Mecanismos vía MTOR

La autofagia es un proceso complejo que consta de varias etapas clave. A continuación, se describen las principales etapas de la autofagia



Ilustración 2. Etapas de la macroautofagia.

1.1.2.2.1 Fase de iniciación de la autofagia o nucleación.

El inicio de la autofagia está altamente regulado. Para iniciar este mecanismo es necesaria la participación de determinadas proteínas de la familia ATGs, además de la regulación de diferentes vías proteicas.

La vía proteica de mayor importancia es la vía de la diana de rapamicina en mamíferos (del inglés, mammalian Target of Rapamycin (mTOR)). (Liu & Sabatini, 2020)

La proteína mTOR es una serina/treonina quinasa de 289 Kd que actúa como regulador central de la autofagia mediante dos complejos: mTORC1 y mTORC2. (Feng et al., 2022) mTORC1 es el complejo principal que regula el crecimiento y el metabolismo celular mediante la síntesis de proteínas y lípidos. Se activa en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y se inhibe en condiciones de escasez. Cuando se activa inhibe la autofagia, es por ello que está íntimamente ligado al control del envejecimiento y la longevidad (Liu & Sabatini, 2020) Por otra parte mTORC2 está involucrado en la regulación del citoesqueleto, el metabolismo de la glucosa y la supervivencia celular, además mTORC2 también participa en la fosforilación de AKT (proteína quinasa B), regulador clave de la supervivencia celular y el crecimiento tumoral. (Ebner et al., 2017; Liu & Sabatini, 2020)

Un complejo íntimamente relacionado con la regulación de mTORC1 es el complejo tuberoso TSC (del inglés, "*tuberous sclerosis complex*") este complejo proteico consta de dos subunidades principales: TSC1 (del inglés, "*tuberous sclerosis complex 1*"), y TSC2 (del inglés, "*tuberous sclerosis complex 2*"), también conocido como tuberina.

El complejo tuberoso TSC actúa como un supresor de mTORC1, por tanto cuando este complejo está activo, inhibe la función de mTORC1, mientras que la inactivación del complejo TSC por cualquiera de sus dos subunidades, conduce a la hiperactivación de mTORC1 y la estimulación descontrolada del crecimiento celular.

TSC1 y TSC2 forman una interacción estable en el complejo TSC, a través de la cual, actúan como un GAP (del inglés, "*GTPase activating protein*") para la proteína Rheb (del inglés, "*Ras homolog enriched in brain*"), que conlleva la inactivación de esta proteína y la supresión subsiguiente de mTORC1. (Ebner et al., 2017)

Otra vía clave en la primera fase de la autofagia, es el complejo formado por la serina/treonina proteína quinasa 1 (del inglés *Unc-51-like kinase1 (ULK1)*), **ATG13**, proteína que se fosforila y se activa en respuesta a la disminución de mTOR y la familia de quinasas de adhesión focal de 200 kd (**FIP200**), que al igual que ATG13 se unen a ULK1 para activarla. Además este complejo unido al complejo de clase III de fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI3K-III**), forman un complejo clave en la formación del fagóforo, además este compuesto está formado por varios componentes, como la proteína Beclin-1 (ATG6) y la quinasa VPS34 (del inglés, *vacuolar protein sorting 34*). Beclina-1 (BCN), juega un papel clave en la formación del fagóforo, ya que interactúa con VPS34 para generar fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) en la membrana de origen. No obstante, la generación de PI3P es esencial para reclutar otras proteínas ATGs, entre las que se encuentra la proteína ATG14L, que se asocia con el complejo PI3K-III y facilita la actividad de la quinasa VPS34. (Hurley & Young, 2017)

En definitiva, el complejo formado por ULK1, ATG13, FIP200 y PI3K, junto con el complejo TSC y mTOR, forman una red de regulación compleja que controla la activación de la autofagia en respuesta a las señales celulares y los estados nutricionales. (Ebner et al., 2017; Hurley & Young, 2017)

1.1.2.2 Fase de formación y elongación del fagóforo

La fase de elongación del fagóforo es una etapa crucial para la formación del autofagosoma, estructura de doble membrana que se encarga de la degradación y reciclaje de los componentes celulares seleccionados para su eliminación.

Durante la fase de elongación la proteína ATG8, también denominada como LC3 (del inglés, *microtubule-associated protein 1 light chain 3*), es esencial, para la formación del fagóforo. Esta proteína, está formada por dos isoformas, LC3-I forma soluble y presente en el citoplasma, y LC3-II forma insoluble, presente en la membrana del fagóforo, ésta además es necesaria para el crecimiento y la expansión de la estructura. No obstante, LC3-II se forma a partir del procesamiento y la conjugación de LC3-I.

Además de las proteínas ATG8, otras proteínas ATGs, como ATG5, ATG12 y ATG16L1, forman un complejo conjugado que también se asocia con la membrana del fagóforo durante la elongación. Este complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 se recluta a las membranas del fagóforo y desempeña un papel importante en la expansión y el cierre del fagóforo. (Martens & Fracchiolla, 2020)

Por otra parte el reclutamiento de lípidos como la fosfatidiletanolamina (PE), también es esencial para la elongación del fagóforo. La conjugación de LC3-II con PE esta mediada por ATG7, que activa a LC3 y facilita su unión a PE en la membrana del fagóforo en crecimiento. Esta conjugación de LC3-II con PE contribuye al remodelado de la membrana y a la expansión del fagóforo (W. Li & Zhang, 2019).

1.1.2.3 Fase de fusión del autofagosoma y el lisosoma

La fusión del autofagosoma con el lisosoma, con la consecuente formación del autolisosoma, es un evento altamente regulado que requiere la participación de diversos factores y proteínas.

Entre algunas de las proteínas que están íntimamente relacionadas con esta etapa, se encuentran las proteínas de la familia Rab, más en concreto Rab7 y Rab24, éstas son pequeñas proteínas GTPasas que regulan el tráfico vesicular y

la fusión de membranas. Por otra parte tenemos las proteínas SNARE (del inglés, "*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor*"), entre las que se encuentran VAMP8 y SNAP29, estas proteínas facilitan la interacción y fusión de las membranas del autofagosoma y los lisosomas. Por último, se encuentran las proteínas asociadas a la membrana lisosomal (LAMP1 y LAMP2, del inglés "*lysosomal membrane protein*"), estas proteínas como indica su nombre se encuentran en la membrana de los lisosomas y su acción es fundamental para la fusión. Tanto LAMP1 como LAMP2 están implicadas en la formación y la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, lo que es esencial para la degradación y el reciclaje celular adecuado. (Chaudhry et al., 2022)

1.1.2.2.4 Fase de degradación

Una vez que el autofagosoma y el lisosoma se fusionan, las enzimas lisosómicas, incluyendo proteasas, nucleasas y lipasas, son liberadas dentro del autolisosoma. Estas enzimas actúan sobre los componentes celulares señalizados y reclutados en el interior de la vacuola, como proteínas mal plegadas, agregados tóxicos, orgánulos dañados o exceso de componentes celulares, descomponiéndolos en moléculas más pequeñas.

La degradación autofágica es un proceso selectivo, lo que significa que ciertos componentes celulares son marcados específicamente para la degradación. La selección de los componentes a degradar puede estar mediada por diferentes mecanismos, como la ubiquitinación de proteínas dañadas o la interacción con proteínas de reconocimiento específico.

Una vez que los componentes celulares son degradados en el autolisosoma, los productos resultantes, como aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos, pueden ser liberados y reciclados para su reutilización en la célula. Este reciclaje de componentes celulares a través de la degradación autofágica es esencial para mantener la homeostasis celular, eliminar componentes dañados y para la disponibilidad de nutrientes en condiciones de estrés.

La disfunción en la etapa de degradación autofágica se ha relacionado con una variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades metabólicas, el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, en concreto la EP. (Pai, 2023; Palikaras et al., 2018)

1.3 Mitocondria

La mitocondria es un organelo citoplasmático de gran importancia en la vida celular. Presenta una pequeña molécula de ADN circular denominado ADN mitocondrial (ADNmt), que codifica un número reducido de proteínas mitocondriales. Su estructura, está compuesta por dos compartimentos distintos, la matriz y el espacio intermembrana (IMS), los cuales están delimitados por dos membranas, la interna (MMI) y la externa (MME). Estas membranas poseen características morfológicas, funcionales y de permeabilidad muy diferentes. (Keogh & Chinnery, 2015)

La MMI posee como característica principal la presencia de invaginaciones llamadas crestas, en ellas, coexisten diversos complejos enzimáticos y proteínas reguladoras del transporte de metabolitos, además de un alto contenido en cardiolipina, un fosfolípido que junto a los demás hacen de ésta, una membrana altamente impermeable a cualquier molécula de carácter polar.

La MME por su parte, posee una permeabilidad menos selectiva debido a la presencia de ciertas proteínas como VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que permite el paso de iones y metabolitos de bajo peso molecular (inferior a 6.000 Da).

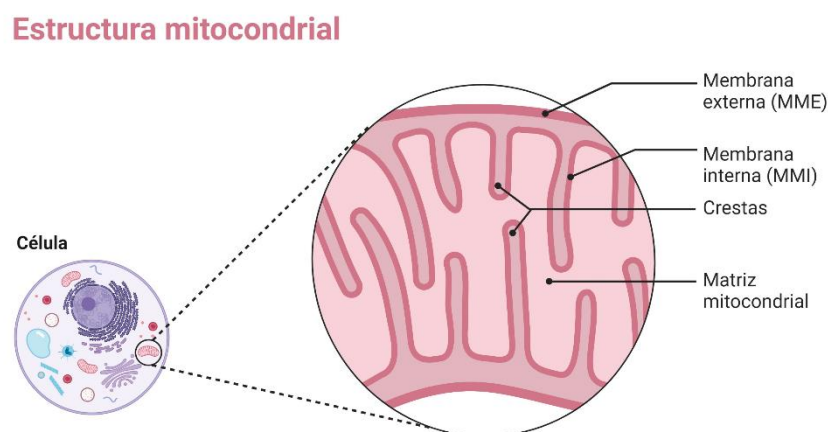


Ilustración 3. Estructura mitocondrial

Estas características estructurales y funcionales de la mitocondria son fundamentales para su papel en la regulación de diversas funciones celulares, incluyendo la producción de energía y la regulación del metabolismo, la

señalización celular y la apoptosis, y los procesos de división y diferenciación celular.(Torneró et al., 2002; Zhang et al., 2022)

1.3.1 Función

1.3.1.1 Producción de energía (ATP)

La principal función de la mitocondria es la generación de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP).(Nunnari & Suomalainen, 2012) El ATP es generado mediante la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, siendo estas, por tanto, esenciales para el funcionamiento adecuado de los tejidos.

La fosforilación oxidativa es el proceso metabólico por el cual se obtiene energía en forma de ATP tras la oxidación de nutrientes, el transporte de electrones en la MMI y la acción de la ATP sintasa. La cadena respiratoria, está formada por una serie de complejos proteicos ubicados en la MMI, conocidos como complejos I, II, III y IV. Estos complejos participan en el transporte de electrones junto a la coenzima Q, que transloca electrones del complejo I, II y III, y al citocromo c o el citocromo c oxidasa (COX), que translocan electrones del complejo III al complejo IV. Los cuatro complejos promueven una serie de reacciones redox que provocan el bombeo de protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (IMS), a medida que se produce la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y la dihidroflavín adenina dinucleótido reducido (FADH₂), coenzimas provenientes de la oxidación de sustratos en la glucólisis, la β -oxidación y otros procesos metabólicos. Por otra parte la ATP sintasa es la enzima encargada de generar ATP, a partir de una molécula de ADP y un grupo fosfato (Pi), acoplándolo al reingreso a la matriz mitocondrial de los protones (H⁺), que previamente se han bombeado al IMS en la cadena respiratoria. Los protones al ser transportados producen el movimiento giratorio de la ATP sintasa con la formación del ATP en la matriz mitocondrial.(Zhao et al., 2019)

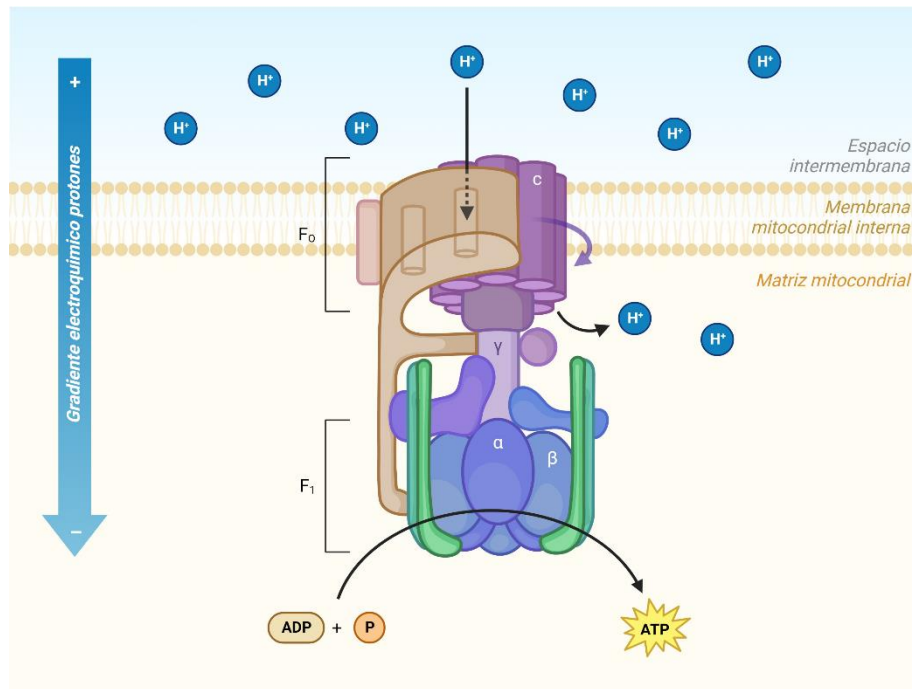


Ilustración 4. Sistema de la bomba ATPasa.

1.3.1.2 Regulación del metabolismo

La mitocondria también desempeña un papel crucial en la regulación del metabolismo celular, pues además de producir la fosforilación oxidativa como hemos comentado, regula el metabolismo de los ácidos grasos, glucosa, aminoácidos y cuerpos cetónicos, al contar con vías importantes como la catalizada por el complejo piruvato deshidrogenasa, que convierte el piruvato en acetil-CoA, y la beta-oxidación de ácidos grasos, que alimentan el ciclo de Krebs del ácido tricarboxílico (TCA). La disponibilidad de estos sustratos y su transporte a través de las membranas mitocondriales están regulados por transportadores específicos y factores hormonales, como las concentraciones de insulina y glucosa en el medio extracelular. Esta regulación permite que las mitocondrias adapten su metabolismo según las necesidades energéticas y los sustratos disponibles.

Por otra parte, las mitocondrias participan en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) y la homeostasis del estrés oxidativo. (Abdel-Rahman et al., 2021)

Mediante la captación de Ca^{2+} , la mitocondria regula la formación de ATP necesario para la contracción y, por tanto, desempeña un papel importante en la acción de excitación-contracción cardíaca, dando forma a la distribución espaciotemporal de este. En cuanto al estrés oxidativo, se sabe que la mitocondria

es la principal generadora de ROS, donde la fosforilación oxidativa genera el 90% de las mismas. Hoy en día sabemos que las ROS aceleran el proceso de envejecimiento tras ocasionar cambios o mutaciones en el ADNmt que a su vez puede provocar un deterioro en la función mitocondrial y en último lugar provocar la muerte celular. Para mantener la homeostasis celular, las ROS generadas deben ser eliminadas, para ello, la propia mitocondria utiliza enzimas antioxidantes, como el superóxido dismutasa (SOD), y la catalasa, responsables, respectivamente de la eliminación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno. Todos ellos permiten mantener un equilibrio redox adecuado en la mitocondria, necesario para evitar el daño oxidativo y para poder mantener un suministro adecuado de energía en la célula. (Giorgi et al., 2018)

1.3.1.3 Apoptosis:

La apoptosis, es un tipo de muerte en el la que la mitocondria juega un papel importante. Este es un proceso natural que ocurre en los organismos multicelulares, y que permite regular las poblaciones celulares y eliminar células dañadas.

La apoptosis se puede dar por dos vías, la vía extrínseca, donde los receptores de muerte activan la caspasa 8, que a su vez activa a la caspasa ejecutora quien provoca una muerte celular proteolítica, y la vía intrínseca, iniciada por un desequilibrio entre las proteínas proapoptóticas (BAX y BAK) y antiapoptóticas (Bcl-2 y Bcl-XL) de la familia Bcl-2, con un aumento de las primeras, donde BAK y BAX promueven la permeabilización de la MME y generan una serie de poros que permiten la salida al citosol de otras proteínas proapoptóticas como el citocromo c. Por su parte el *citocromo c* genera una nueva señal de activación de la apoptosis activando las caspasas ejecutoras. (T. Sen Wang et al., 2020)

A nivel mitocondrial la apoptosis está regulada por una variedad de factores, como la fisión y fusión mitocondrial. Ahora bien cuando estos mecanismos fallan, las mitocondrias no funcionales son seleccionadas para degradarse. Es en este punto donde disminuye la translocación desde la MME hacia la MMI de la proteína PINK1 (del inglés, "*PTEN-duced kinase 1*"), este hecho, provoca la activación de una serie de reacciones que conducen a la disminución de la motilidad mitocondrial y por ende su captura por parte de los fagóforos (mitofagia) (X. Wang et al., 2011).

Ahora bien cabe destacar que para que se produzcan las señales apoptóticas son necesarios una serie de estímulos internos como el daño del ADNmt, el estrés celular, o aumento excesivo de ROS en el interior de la célula.

1.3.2 Dinámica mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo dinámico, es decir, tiene la capacidad de moverse por el interior de la célula y poder así satisfacer las demandas energéticas o regular la señalización del calcio.

La expresión de dinámica mitocondrial hace referencia a los cambios en la forma, tamaño o distribución de las mitocondrias, dentro de las células. No obstante la dinámica mitocondrial engloba los procesos de fusión y fisión mitocondrial, éstos, son procesos dinámicos que regulan la forma y la función de las mitocondrias. Estos procesos están interconectados y trabajan en conjunto para mantener un equilibrio y una homeostasis adecuados en el sistema mitocondrial.

A continuación, explicaré cada proceso y cómo afectan a las mitocondrias.

1.3.2.1 Fusión mitocondrial

La fusión mitocondrial es un proceso por el cual dos mitocondrias se unen para formar una única mitocondria. Este proceso es fundamental para mantener la integridad y la función adecuada de las mitocondrias dentro de una célula.(Green et al., 2022)

La fusión mitocondrial implica la unión de las membranas mitocondriales externas e internas de dos mitocondrias distintas. Este proceso es mediado por una serie de proteínas tipo guanosina trifosfatasa (GTPasas) que incluyen: mitofusinas (MFN1 Y MFN2), estas proteínas se encuentran en la MME, y son esenciales para la fusión mitocondrial, además se encuentran en ambos compartimentos mitocondriales lo que permite formar puentes con las mitocondrias vecinas. Por otra parte se encuentra la proteína atrofia óptica tipo 1 (OPA1), ésta, es una proteína de la MMI que está implicada en la regulación de la escisión y fusión de las crestas mitocondriales.(Ali & McStay, 2018; Ban et al., 2018)

La fusión mitocondrial, como vemos, se asocia con una mejora de la función mitocondrial, pues se utiliza como mecanismo de supervivencia, ya que permite que varias mitocondrias se unan entre sí para formar una nueva mitocondria funcional.(Anand et al., 2012)

1.3.2.2 Fisión mitocondrial

La fisión mitocondrial por su parte es un proceso mediante el cual una mitocondria se fragmenta. Este proceso es esencial para la regulación de la apoptosis, además es importante para regular la forma y la distribución de las mitocondrias dentro de una célula. Generalmente, este proceso se da en respuesta a diversas señales, como el estrés celular o la necesidad de eliminar mitocondrias dañadas. La fisión mitocondrial contribuye a la segregación de componentes disfuncionales y/o a la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas a través de la mitofagia. (Ali & McStay, 2018)

En cuanto a las principales proteínas implicadas en la fisión mitocondrial nos encontramos a DRP1, proteína ligada a la dinamina mitocondrial 1 y FIS1 o proteína de fisión mitocondrial. (Green et al., 2022).

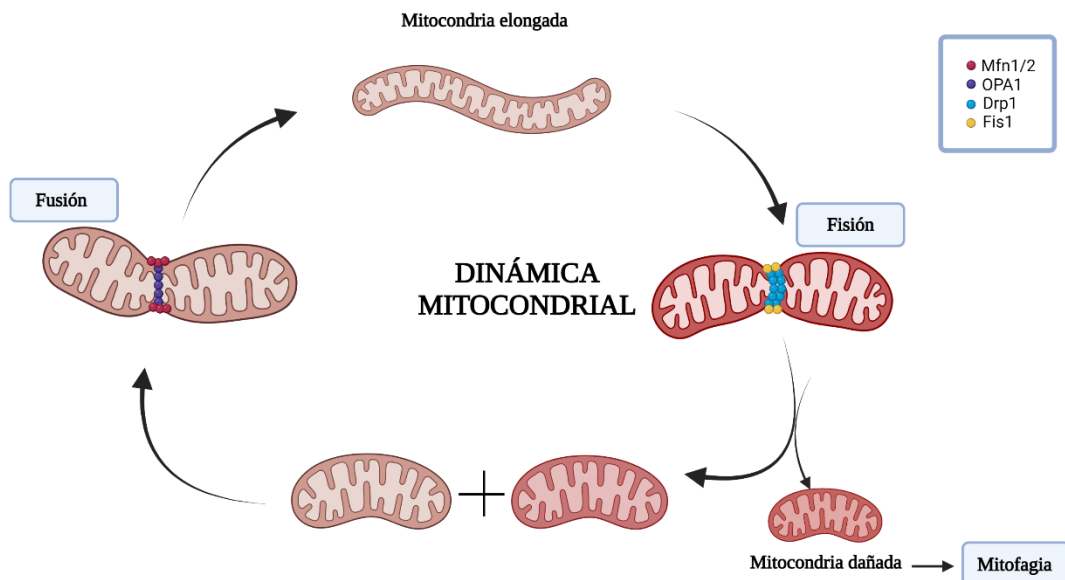


Ilustración 5. Dinámica mitocondrial

Otra proteína relevante a este nivel es la proteína LONP1 (del inglés Lon Peptidase 1). Lonp1 es una serina peptidasa altamente conservada que contiene un dominio AAA+, y que funciona como proteasa, y por tanto es responsable de la degradación de proteínas mal plegadas o dañadas y del ensamblaje de complejos de la cadena respiratoria. (Key et al., 2019)

1.3.2.3 Biogénesis mitocondrial

La homeostasis celular y mitocondrial dependen en gran medida de la cantidad de masa mitocondrial y de su capacidad funcional, por ello es necesario un

equilibrio entre la eliminación de mitocondrias dañadas y la formación de mitocondrias nuevas, también llamada biogénesis mitocondrial. Este equilibrio está regulado por la mitofagia y por los procesos de fisión y fusión mitocondrial. (Chodari et al., 2021)

La biogénesis mitocondrial implica la replicación del ADNmt, la síntesis de proteínas mitocondriales, y la importación de proteínas mitocondriales, pero de codificación nuclear, al interior de las mitocondrias. Existen una serie de factores tanto de origen nuclear como mitocondrial, entre los que están el receptor proliferador de peroxisomas gamma activado (PPARGC1A), el coactivador 1a (PGC-1a), el factor o los factores respiratorios nucleares (NRF1 y/o NRF2) y el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) (Zhu et al., 2013), que activan este proceso. Ahora bien, para una correcta homeostasis es necesaria una correcta regulación de la activación de estos factores mediante la proteína quinasa activada de AMP (AMPK), la vía mTOR o las vías de señalización del calcio, entre otras. (Zong et al., 2002)

En resumen, se sabe que la biogénesis mitocondrial es un proceso esencial para la función celular y la supervivencia. Comprender el mecanismo de formación y multiplicación de las mitocondrias es fundamental para entender que las disfunciones mitocondriales, pueden estar estrechamente relacionadas con trastornos metabólicos o enfermedades neurodegenerativas y del envejecimiento.

1.3.3 Disfunción mitocondrial en enfermedades neurodegenerativas

La disfunción mitocondrial se ha relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas crónicas como la EA o EP. Aunque las causas exactas de estas enfermedades aún se desconocen, se ha observado que la disfunción mitocondrial desempeña un papel importante en su desarrollo y progresión (Martín-Jiménez et al., 2020).

Se ha encontrado que las mitocondrias disfuncionales en las células del cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas presentan una disminución en la producción de ATP, como sabemos, principal fuente de energía para las células. Esta deficiencia energética conlleva una disminución de la función neuronal y un aumento de estrés oxidativo (Kung et al., 2021a; J. Li et al., 2013).

1.2.3.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un aspecto crucial en la disfunción mitocondrial. Como ya sabemos en condiciones fisiológicas la mitocondria es generadora de especies reactivas de nitrógeno, además de ser una fuente importante de ROS. Por otra parte cuando las mitocondrias están dañadas, aumentan la producción de estrés oxidativo, con la consecuente alteración metabólica que cursa con una producción de energía y redox deficiente. El aumento de estrés oxidativo además, puede provocar la oxidación y modificación de proteínas, dando lugar a la acumulación de proteínas anormales o a la formación de proteínas mal plegadas que dan lugar a agregados tóxicos y que contribuyen a la neurodegeneración, como el caso de la β -amiloide, presente en la EA, la alfa-sinucleína en la EP. Para evitar un ciclo perjudicial de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial se necesita un equilibrio entre la producción de estrés oxidativo y la producción de proteínas antioxidantes, evitando de esta forma, que se comprometa la capacidad de la célula para generar energía de manera eficiente. Además se necesita un correcto funcionamiento de la dinámica mitocondrial que como sabemos engloba a la mitofagia, y a los procesos de biogénesis mitocondrial (fisión y fusión), pues se ha comprobado que una alteración en estos procesos podría implicar la muerte neuronal y consecuentemente el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa. (Kung et al., 2021b; Millichap et al., 2021)

1.2.4 Mitofagia

Con el objetivo de preservar una población de mitocondrias saludables y prevenir el daño celular, se han desarrollado diversos mecanismos de control de calidad. Actualmente se sabe que las mitocondrias cuentan con un sistema proteolítico propio, compuesto por dos complejos de proteasa AAA+ en su membrana interna, estos complejos degradan las proteínas de membrana desplegadas. Por otra parte, los proteosomas citosólicos intervienen en la degradación de proteínas en las MMI y MME. Además, se ha evidenciado la existencia de una vía lisosomal en la cual las vesículas emergen de los túbulos mitocondriales, capturando cargas mitocondriales específicas y transportándolas al lisosoma para su degradación. Como se ha mencionado anteriormente se ha descrito una autofagia selectiva, es decir un tipo específico de autofagia que se dirige a las mitocondrias dañadas para marcarlas y eliminarlas, denominada mitofagia.

La eliminación de las mitocondrias dañadas está mediada por diferentes vías. A continuación, hacemos una breve descripción de estas.

1.2.4.1 Vía PINK1/PARKIN

La mitofagia es un proceso altamente regulado y selectivo, donde las proteínas PINK1 y PARKINA realizan su función mediante una serie de etapas.

1. **Reconocimiento y selección de mitocondrias dañadas:** El proceso de mitofagia comienza con el reconocimiento y la selección de las mitocondrias dañadas. La proteína PINK1 se acumula en la membrana mitocondrial externa de las mitocondrias dañadas y actúa como un sensor de daño mitocondrial reclutando a la proteína E3 ubiquitina ligasa (PARKINA), hacia las mitocondrias dañadas.
2. **Marcado de mitocondrias dañadas:** Una vez reclutado por PINK1, PARKIN, ésta marca las proteínas de la membrana mitocondrial externa con cadenas de ubiquitina. Esta ubiquitinación de las proteínas mitocondriales dañadas sirve como una señal para el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la posterior captura de las mitocondrias dañadas.
3. **Reclutamiento de mitocondrias dañadas por autofagosomas:** Las proteínas adaptadoras, como p62/SQSTM1, NBR1 y NDP52, se unen a las mitocondrias marcadas con ubiquitina y, a su vez, se unen a las proteínas de la membrana del autofagosoma, como las proteínas LC3. Esta interacción facilita el reclutamiento y la captura de las mitocondrias dañadas por los autofagosomas.
4. **Formación del autofagosoma y fusión con lisosomas:** Una vez que se forma el autofagosoma, este se fusiona con los lisosomas, hasta la degradación del contenido intravacuolar por las acciones de las proteasas lisosomales, como ya se ha descrito con anterioridad.

Por tanto la mitofagia es un proceso altamente regulado y selectivo donde generalmente las proteínas PINK1 y PARKIN son fundamentales (Doblado et al., 2021; Pickles et al., 2018). Sin embargo existe una vía independiente esta vía. (McWilliams et al., 2018)

1.2.4.2 Mitofagia independiente de la vía PINK1/PARKIN

La mitofagia independiente de PINK1, conocida como mitofagia no canónica, es un mecanismo alternativo de eliminación de mitocondrias dañadas.

Se han propuesto diferentes vías y proteínas, que pueden ser desencadenadas por diferentes señales y mecanismos.

En primer lugar, se ha demostrado como la activación de AMPK y la fosforilación a través de ésta, de proteínas mitocondriales, promueve la captura y degradación de las mitocondrias dañadas, independiente de PINK1-PARKIN. Otra vía de señalización independiente de PINK1/PARKIN es la vía mediada por la proteína Bnip3/Bnip3L (NIX), que puede ser activada en respuesta al daño mitocondrial y reclutar directamente a las mitocondrias dañadas hacia los autofagosomas. Además también se ha descrito que la proteína FUNDC1, localizada en la MME, interacciona con LC3 y desempeña un papel fundamental en la mitofagia independiente de PINK1-PARKIN (McWilliams et al., 2018; Springer et al., 2021a)

Por último, existen otros receptores y adaptadores además de p62/SQSTM1, que pueden participar en la mitofagia independiente de PINK1, como son, NBR1, proteína adaptadora que se une a las proteínas ubiquitinadas de la membrana mitocondrial y las dirige hacia los autofagosomas para su degradación, DP52 y OPTN. (Springer et al., 2021b)

1.4 Productos naturales moduladores de autofagia/mitofagia.

Actualmente se sabe que algunos compuestos naturales pueden modular tanto la autofagia como la mitofagia, este hecho, puede tener implicaciones terapéuticas en diferentes enfermedades neurodegenerativas, pues sabemos que en estas enfermedades es común la aparición de proteínas mal plegadas o mitocondrias disfuncionales.

En los últimos años, los productos naturales (compuestos derivados de fuentes naturales, como plantas, hongos y microorganismos) han sido objeto de investigación por sus potenciales propiedades terapéuticas. En este contexto, varios estudios han investigado las propiedades bioactivas y el efecto de productos naturales en la modulación de la autofagia y su impacto en enfermedades neurodegenerativas, como la EA y la EP. (Di Meo et al., 2020)

Los taninos hidrolizables son los compuestos fenólicos más complejos e incluyen galotaninos y elagitaninos (ET). Actualmente sabemos que los elagitaninos, son un grupo de polifenoles naturales que se encuentran en diversas plantas, como las nueces, las bayas (como las frambuesas y las fresas) o las granadas.(Clifford & Scalbert, n.d.) No obstante se ha descubierto que estos polifenoles están presentes además en el cascabello o cúpula de bellota(Cantos et al., 2003). El cascabello de bellota es un subproducto de la industria alimentaria que hasta ahora siempre se ha desechado, es por ello por lo que nos propusimos el estudio de sus propiedades bioactivas, además de conocer el alcance sobre los posibles beneficios para la salud. (Garcia-Muñoz & Vaillant, 2014)

En relación con las enfermedades neurodegenerativas, los elagitaninos han mostrado potencial para proteger contra el deterioro cognitivo y el envejecimiento cerebral, pues se ha observado que estos compuestos pueden tener efectos antioxidantes y antiinflamatorios en el cerebro, ayudando a reducir el estrés oxidativo y la inflamación, implicados en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la AE y la EP. (Kharat et al., 2020)

A medida que los elagitaninos se metabolizan mediante la acción de bacterias intestinales en el tracto gastrointestinal, se forman diversos subproductos, durante la primera metabolización de los elagitaninos se deriva ácido elágico

que a su vez se transforma en diferentes tipos de urolitinas (Cortés-Martín et al., 2020; García-Villalba et al., 2023). Ahora bien aquella urolitina que ha demostrado ser capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, y por ende ser inductora de mitofagia, además de presentar otras funciones que dan lugar a la mejora de la calidad de las mitocondrias en procesos neurodegenerativos, como el aumentando la vida media, es la urolitina A. (García-Villalba et al., 2023)

Se ha observado que la urolitina A activa mTOR, como sabemos proteína que está involucrada en la regulación de la autofagia. Además, se ha sugerido que la urolitina A puede tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que podría ayudar a reducir el estrés oxidativo y la inflamación asociados con enfermedades neurodegenerativas. Estos efectos pueden contribuir a la protección de las células nerviosas y ayudar a prevenir o retrasar la progresión de estas enfermedades (García-Villalba et al., 2023; Ryu et al., 2016).

Hipótesis del trabajo

Actualmente sabemos que el envejecimiento, es una de las principales causas relacionada con la aparición de enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo se plantea que los factores genéticos (predisposición genética), unido a factores externos (exposición a determinados tóxicos) desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la EP, por ello, creemos urgente la necesidad de impulsar la investigación en toxicología y poner en marcha iniciativas, para mitigar el riesgo de desarrollar esta enfermedad en un futuro próximo y frenar su progreso. El espectro fisiopatológico de esta enfermedad incluye una convergencia de disfunción mitocondrial, aumento del estrés oxidativo, inflamación y desregulación de la autofagia en las neuronas. Aumentar nuestra comprensión de los mecanismos será fundamental para el desarrollo de nuevas terapias. Por otra parte en la búsqueda de nuevos agentes que puedan paliar y/o reducir los procesos de estas enfermedades incapacitantes, los productos naturales han llamado cada vez más la atención debido a sus múltiples propiedades biológicas y farmacológicas. Es por ello que en este trabajo nos planteamos el estudio sobre los posibles efectos protectores de los extractos de cúpula de bellota en diferentes etapas de maduración en modelos genéticos y ambientales de la EP. En este sentido, analizaremos estos compuestos bioactivos, no sólo como una posible fuente externa de elagitaninos, sino también por la posibilidad de encontrar otras propiedades beneficiosas, hasta el día de hoy desconocidas.

Objetivos

De acuerdo con la hipótesis planteada anteriormente se plantean los siguientes objetivos:

1. -Analizar la composición de los diferentes extractos de cúpula de bellota en diferentes periodos de maduración. Evaluación de propiedades antioxidantes y determinación de compuestos bioactivos.

2. -Analizar las rutas moleculares implicadas en los compuestos bioactivos de la autofagia/mitofagia inducida por cúpula de bellota. Analizaremos el papel de la autofagia, general y/o selectiva (mitofagia) y las vías de señalización implicadas en varios modelos de enfermedad:

2.1. Modelos in vitro:

2.1.1. Fibroblastos humanos portadores o no de mutaciones patógenas de la enfermedad de Parkinson tratados o no con toxina.

2.1.2. Modelos neuronales (SH-SY5Y) tratados o no con rotenona o CCCP.

2.2. Modelos in vivo:

2.2.1. Modelos murinos: ratones ICR.

3. -Analizar los mecanismos citoprotectores regulados por la autofagia/mitofagia inducida por extracto de cúpula de bellota en los modelos de enfermedad de Parkinson descritos anteriormente expuestos a los diferentes agentes tóxicos.

3.1 Impacto de los compuestos bioactivos de la cúpula de bellota en la salud mitocondrial y la viabilidad celular.

3.2 Evaluación de parámetros protectores (disminución de la inducción de oxidantes)

3.3 Impacto de los compuestos bioactivos de la cúpula de bellota en el perfil metabólico.

4. -Analizar el impacto de la administración a largo plazo de extracto de cúpula de bellota en la longevidad y la capacidad locomotora en el modelo de *Drosophila* portador de las infecciones patogénicas de LRRK2.

Materiales y métodos

En la primera parte de este apartado se nombran todos los materiales, instrumentos y aparatos utilizados durante la realización de esta tesis doctoral.

En la segunda parte se han redactado todas las técnicas y protocolos utilizados

4.1 Materiales

4.1.1 Aparatos de laboratorio

A

Agitador de balanceo Labnet "Minimix Enduro"

Agitador de balanceo Labnet "Rocker 25"

Agitador magnético Bunsen serie MC-8

Agitador magnético calefactado Raypa "AG2"

Agitadores magnéticos Selecta "Agimatic-S" y "Agimatic-P"

Agitador orbital e incubador de sobremesa Biogen "Ecotron"

Agitador S-4 Elmi EL-DRS-12

Mini-agitador Biosan "PSU-2T" REPASAR LOS NUEVOS Y QUITAR LOS VIEJOS

Amersham Imager 600

Autoclave de esterilización a vapor Raypa AES-75

B

Balanza analítica Fisherbrand "15395103"

Balanza de laboratorio Adam Equipment "PW-124"

Balanzas de precisión A&D Weighing "EK-200i" y "GF 300"

Baño ELMI Sky Line

Baño termostático Bunsen "BA-1604"

Baño termostático analógico Raypa "BAE-6"

Bidestilador MILLIPORE modelo Direct Q 5 Ultrapure Water Systems

C

Cámara fotográfica Olympus "DP70" (para realizar fotografías en el microscopio invertido Olympus IX-51)

Campanas de flujo laminar Biosan "DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR"

Campanas de flujo laminar Nüve LN-090

Campanas de flujo laminar Telstar "AV-100"

Campana de gases Flores Valles

Centrífuga de sobremesa PSELECTA CENTROXIS7001086

Centrífuga refrigerada de mesa Heraeus modelo Megafuge 1.0R

Centrífuga refrigerada de mesa Hermle modelo Z 36 HK

Centrífuga refrigerada ST-8R Sorvall ThermoScientific

Microcentrífuga Mikro 2 Hettich

Microcentrífuga Qualitron modelo DW 41

Minicentrífuga Labnet Mini Centrifuge C-1200

Minicentrífuga sigma 220 v

Minicentrífuga Strip-Fuge, AC input 230 V

Citómetro de flujo CitoFLEX Beckman Coulter Live Science

Contador celular automático Bio-Rad "TC10"

Contador celular automático Olympus "Model R1"

Congelador a -20 °C BlueSky

Congelador a -20 °C Edesa

Congelador a -80 °C Heraeus modelo HERA freeze

Congelador a -80 °C Thermo Scientific modelo Forma 994

E

Equipo de electroforesis Bio-Rad Criterion Cell

Equipo de electroforesis Bio-Rad modelo Mini-Protean Tetra System

Equipo de electroforesis iMupid Mini Agarose Gel Electrophoresis System

Equipo de electroforesis Z-Mupid-One electrophoresis system

Equipo de transferencia Criterion Blotter

Equipo de transferencia Mini Trans Blot electrophoretic Transfer cell

Espectrofotómetro UV/visible Biochrom WPA Biowave

Estufa bacteriológica y de cultivos. Raypa. INCUTERM.

F

Frigorífico a 4° Beko

Frigorífico a 4 °C y -20 °C Daewoo

Frigorífico a 4 °C y -20 °C Ecron

Frigorífico a 4 °C y -20 °C Edesa modelo Style

Frigorífico a 4 °C y -20 °C Savoid

Fuentes de alimentación Bio-Rad modelos: POWER PAC 200/POWER PAC 300, POWER Pac Basic, POWER Pac HC

I

Incubador con agitación. Aertrom. CH-4103. Bottmingen

Incubador con agitación. Ecotrom. Infors HT

Incubador de CO2 con control de temperatura ThermoScientific modelo HEPA Class 100 Modelo incubador 371

Incubador de CO2 Hera cell

Incubador CO2 con controlador de la temperatura Thermo Scientific Class100

L

Lector de placas ELISA TECAN modelo Sunrise

M

Máquina de hielo triturado Scotsman "AF80"

Microscopio electrónico de transmisión Hitachi S-3600-N

Microscopio Etaluma. Lumascope 620 S.058715

Microscopio EVOS FL.NO OBJ71

Microscopio óptico Carl Zeiss. Axiovert 25C

Microscopio óptico Olympus modelo CK

Microscopios ópticos invertidos de fluorescencia Olympus modelo IX51 e IX83

Microstirrer magnetic stirrer

Mini plate spinner. Labnet MPS 1000

Mini shaker PSU-2T

N

Nanodrop 2000 Spectrophotometer

P

pH-metro SENSION+ modelo LPV2014.98.002

pH-metro Fisherbrand Accumet modelo AB150

R

Rotamix RM-1

S

Sistema de lisis y homogenización. Precellys 24. Bertin Technologies

Sistema de PCR a tiempo real 7500 de Applied Biosystems

Sistema de purificación de agua. Merck-Millipore. Modelo Direct Q.3UV
Ultrapure Water System

Sistema de purificación de agua Merck-Millipore. Modelo Direct Q.5 Ultra-
pure Water Systems

Suministro de recipiente criogénico de transporte de 25 L (Crio Difussion,
L2025)

Suministro pastillero de nieve carbónica para botella CO2 B50 con sifón

T

Termobloque metálico AccuBlock Digital Dry Baths

Termociclador T100 Thermal Cycler Biorad

Termostato de bloque metálico heating blocks PSELECTA I

Termostato de bloque metálico TMR (Bunsen)

Thermostat TW-2.03

Transiluminador Biorad UV 2000

U

ULTRASONIC Processor Handheld or Stand Operated. UP 100H

V

Vortex Bunsen

4.1.2 Reactivos

A continuación, se enumeran los reactivos utilizados en función de la casa comercial donde se adquieren.

Abcam

Anticuerpo anti-Actina.....	ab49900
Anticuerpo anti-Catepsina B	ab58802
Anticuerpo anti-COXIV	ab14744
Anticuerpo anti-GAPDH	ab9385
Anticuerpo anti-LAMP 1	ab24170
Anticuerpo anti-MIRO 1	ab188029
Anticuerpo anti-MITOFUSINA 1	ab104274
Anticuerpo anti-OPA 1	ab119685
Cytopainter	ab139485

Abnova

Anticuerpo anti-p62.....	H00008878
--------------------------	-----------

Ambion

Control negativo para SiRNA.....	AM4611
SiRNA SIRT1	AM16708

BD Biosciences

Anticuerpo anti-CITOCROMO C.....	BD56432
Anticuerpo anti-TIMM 23	BD611222

Bio-Rad

Anticuerpo Anti-mouse IgG conjugado con HRP	170-6515
---------------------------------------------------	----------

Anticuerpo Anti-rabbit IgG conjugado con HRP	170-5047
CoomassieR Brilliant Blue R-250	161-0436
Dodecil sulfato sódico (SDS)	161-0301
Extra thick blot paper Tamaño 2-11	161-0301
Geles Mini Protean TGX 4-20 % 10 well	456-1093
Geles Mini Protean TGX 12 % 10 well	456-1043
Geles Mini Protean TGX 4-20 % 12 well.....	456-1095
Geles Mini Protean TGX 12 % 12 well	456-1045
Geles Mini Protean TGX 4-20 % 15 well.....	456-1096
Geles Mini Protean TGX 12 % 15 well	456-1046
Geles 12 % Criterion TGX 18 well.....	567-1044
Geles 12 % Criterion TGX 26 well.....	567-1045
Immun-Blot PVDF Membrane	162-0177
Precision Plus Protein Dual Color Standards	161-0374
TG 10X Tris Glycine Buffer.....	161-0771
TGS 10X Tris Glycine SDS Buffer (Laemmli)	161-0772
Tris/Boric acid/EDTA 10X (TBE)	161-0741
Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	161-0798
Tris-HCl pH 6,8 0,5 M	161-0799

Cell Signaling

Anticuerpo anti-AKT	9272
Anticuerpo anti-AMPK	5831
Anticuerpo anti-ATG5.....	2630
Anticuerpo anti-ATG13.....	13273
Anticuerpo anti-ATG101	13492
Anticuerpo anti-BAX	2772
Anticuerpo anti-BNIP3L/NIX.....	12396S

Anticuerpo anti-DRP1	8570
Anticuerpo anti-FIP 200.....	12436
Anticuerpo anti-mTOR	2972
Anticuerpo anti-OPTINEURIN	58981
Anticuerpo anti-PARKIN.....	2132
Anticuerpo anti-PHB1 (PROHIBITIN)	2426S
Anticuerpo anti-PI3Kinasa Clase III	3811S
Anticuerpo anti-p-AKT	9271
Anticuerpo anti-p-AMPK.....	2535
Anticuerpo anti-p-DRP1	3455
Anticuerpo anti-p-mTOR.....	2971
Anticuerpo anti-p-P70S6K.....	9234
Anticuerpo anti-p-S6K.....	4858S
Anticuerpo anti-p-UBIQUITIN(Ser65)	37642
Anticuerpo anti-p-ULK 1.....	14202
Anticuerpo anti-P70S6K	9202S
Anticuerpo anti-RUBICON	8465
Anticuerpo anti-S6K	2317S
Anticuerpo anti-SIRT1	9475
Anticuerpo anti-SIRT3.....	5490S
Anticuerpo anti-SOD1	37385
Anticuerpo anti-ULK 1	8054
Anticuerpo anti-Tuberin/TSC2	3612

CORNING

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 10-013-CV

ENZO

Cyto-ID..... 51031

LEUPEPTINA	ALX260009MC25
GIBCO	
Medio de cultivo <i>DMEM</i>	21969-035
Medio de cultivo <i>DMEM/F-12</i>	21331-020
Medio cultivo <i>OPTI-MEM</i>	51985-026
Medio cultivo <i>MEM NEAA 100X</i>	11140-035
TRYPsin-EDTA 0.25%.....	25200-056
GeneTex	
Anticuerpo anti-FIS 1	GTX111010
HyClone	
Estreptomicina/penicilina.....	456-1046
IDT	
Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para catepsina D.	
Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para GAPDH.	
Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para LC3.	
Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para TFEB.	
Invitrogen	
Anticuerpo Alexa Fluor® 488 anti-mouse IgG	A-32723
Anticuerpo Alexa Fluor® 488 anti-rabbit IgG.....	A-11034
Anticuerpo Alexa Fluor® 568 anti-mouse IgG	A-1104
Anticuerpo Alexa Fluor® 568 anti-rabbit IgG.....	A-11036
Anticuerpo anti-TFAM	PA529571
Anticuerpo anti-TRX (Thioredoxin 1 polyclonal).....	PA83868
<i>Cell ROX</i>	C10444
<i>DH5a Competent Cells</i>	18265-017
<i>Lipofectamine 2000 Transfection Reagent</i>	11668027
Lysotracker Red.....	L7528

Mitotracker Green.....	M7514
MitoSOX	M36008
SiRNA TSC2	5269468
TMRM (Tetrametil rodamina)	T668

KAPPA BIOSYSTEMS

<i>Kappa SYBR Fast Master Mix</i>	KK4601
-----------------------------------------	--------

Lclabs

Bafilomicina A1	B-1080
Rapamicina	R-5000

Metabion

- Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para catepsina B.
- Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para catepsina C.
- Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para LAMP1.
- Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para LAMP2.
- Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para MFN1.
- Oligonucleótidos sintéticos de ARN complementario para MFN2.

Millipore

Anticuerpo anti-GADPH	MAB374
Anticuerpo anti-p-TFEB	ABE1971
Anticuerpo anti-VINCULIN	V9131
Colágeno	08-115

Novus biological

Anticuerpo anti-PINK1	BC100-494
-----------------------------	-----------

Nucliber/InvivoGen

Plasmocin.....	ant-mpp
Plasmocure	ant-mpt

NZYTech

NZY *First strand cDNA synthesis*.....MB12501

Panreac

2-propanol 141090

Ácido clorhídrico (HCl) 141020

Ácido Etilendiamino tetracético (EDTA) 131026

Cloruro potásico (KCl) 13149

Cloruro sódico (NaCl) 141659

Etanol absoluto 141086

Fosfato disódico (Na₂HPO₄) 141679

Fosfato potásico (KH₂PO₄) 141509

Metanol..... 141091

Pierce

ECL Plus Western blotting Substrate 32106

Proteintech

Anticuerpo anti-LONP 1 15440-1-AP

Anticuerpo anti-TFEB 13372-1-AP

Roche

NP40 (NP40) 11754599001

PhosSTOP phosphatase inhibitor 04906837001

cOmplete mini EDTA free 11836170001

Santa Cruz Biotechnology

Anticuerpo anti-BCN 1 SC-11427

Anticuerpo anti-catepsina D SC-6486

Anticuerpo anti-PGC1α..... SC-518025

Anticuerpo anti-PINK 1 SC-517353

Anticuerpo anti-SOD2..... SC-133134

Anticuerpo anti-TOMM 20 SC-17764

Sigma-Aldrich

β-mercaptoetanol (β-ME)	M7522
3-Metiladenina (3-MA).....	M9281
Ácido bicinchonínico (BCA)	B9643
Ácido Tricloracético (TCA)	T9159
Albumina sérica bovina (BSA)	A7906
Anticuerpo anti-LC3B.....	L7543
Anticuerpo anti-TOMM 20	WH0009804M1
Bromophenol blue solution.....	318744
CAPS.....	C2632
Cristal Violeta.....	C3886
CCCP	C2759
Dietil pirocarbonato (DEPC).....	D5758
Digitonina.....	D141
Dimetilsulfóxido (DMSO)	D8779
<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> (DMEM)	D6546
<i>Earle's balanced salt solution</i> (EBSS)	E2888
E64D	E8640
Glicerol.....	211339
Glutamina.....	G7513
Hoechst 33342	14533
Pepstatina A	P5318
RNasa ZAP C2284.....	R2020
Rojos ponceau	P7170
Rotenona	R8875
Suero fetal bovino (FBS)	F7524
Sulfato de cobre (II)	C2284

SiRNA AMPK α	HA02727114
SiRNA BECN1	4083457-F/1083458-F
Sodio piruvato	S8636
Tris-HCl	T6066
Triton X-100.....	T9284
Trypan blue solution (0,4 %)	T8154
Tween 20.....	P1379
Valina L	V0153
<i>Ioduro de propidio</i> (IP)	P4170

Southern Biotech

Pegamento fluoromount G.....	G418
------------------------------	------

ThermoFisher

Geneticina.....	BP676-5
<i>Restore plus western blot stripping buffer</i>	46430
<i>Supersignal west femto maximum sensivity substrate</i>	34095
<i>HEPES buffer</i>	BP299

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivos celulares

4.2.1.1 Condiciones de esterilidad

Conocemos como esterilización al proceso en el que, además de eliminar la suciedad, también se produce la eliminación de todas las formas de vida microbiana como virus, bacterias, hongos y protozoos. Para poder trabajar con distintas líneas celulares es imprescindible que todo nuestro material esté esterilizado, además el ambiente de trabajo debe ser completamente aséptico. Antes de comenzar a trabajar en la campana de flujo laminar, ésta se irradia con rayos UV (un mínimo de 15 minutos) y se desinfecta con etanol al 70% (diluido en agua). Además, si vamos a trabajar simultáneamente con distintas líneas celulares, debemos limpiar y esterilizar la campana entre el uso de las distintas líneas celulares. Del mismo modo, para mantener un ambiente aséptico, se emplean

guantes de nitrilo y/o látex, bata, y/o equipos de protección individual, como gafas protectoras o mascarillas FFP3, si fuera necesario.

4.2.1.2 Líneas celulares

Todas las líneas utilizadas durante la tesis doctoral crecían en monocapa. Los envases que se utilizaban para el mantenimiento y la siembra estaban pretratados con un soporte sólido que permitía su adherencia.

Líneas utilizadas:

► Células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), compradas al servicio de ATCC.

► Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y Mito QC, estas expresan de manera estable el reporter mCherry-GFP-FIS1₁₀₁₋₁₅₂. Estas células poseen indicadores mitocondriales fluorescentes sensibles al pH denominados mCherry-GFP-FIS1, que permiten hacer un seguimiento de la mitofagia al distinguir las mitocondrias citosólicas de las mitocondrias entregadas a los lisosomas ácidos. Este reportero consiste en una etiqueta mCherry-GFP en tándem localizada en la membrana externa mitocondrial, de tal manera que cuando las mitocondrias se dirigen a los lisosomas (mitofagia), pierden la señal GFP, y aumenta la señal mCherry, solo en rojo. En definitiva un aumento de mCherry (rojo), implica un aumento de mitofagia. Estas células fueron cedidas generosamente por la Dr Patricia Boya. Universidad de Friburgo, Suiza.

► Células de osteosarcoma humano U2OS-iMLS (\pm Parkin). Estas células poseen una expresión inducible estable de la señal de localización mitocondrial interna (iMLS) dirigida a la proteína mitocondrial NIPSNAP1₁₋₅₃, que se encuentra unida al reporter EGFP-mCherry y a esta se encuentra unida la proteína PARKIN la cual, era inducible a una concentración de 500nM de Doxyciclina durante las últimas 24h. Estas células fueron cedidas generosamente por la Dr Patricia Boya. Universidad de Friburgo, Suiza.

► Células de osteosarcoma humano que expresan TFEB-GFP-RFP, (TFEB, del inglés *Transcription factor EB*), (GFP, del inglés *Green fluorescent protein*) y (RFP, del inglés *Red fluorescent protein*) (U2OS-TFEB-GFP-RFP). Cedidas por la Dra. Junying Yuan, Escuela Médica de Harvard.

- ▶ Células de neuroglioma humano (H4) que expresan LC3-GFP, (H4-LC3-GFP).
- ▶ Células de neuroglioma humano deficientes en ATG5 que expresan LC3-GFP (H4 LC3-GFP ATG5 KO).

Tanto la línea celular H4 LC3-GFP como las H4 LC3-GFP ATG5 KO fueron cedidas por el Dr. Guido Kroemer, Université Paris Descartes (INSERM).

- ▶ Cultivos primarios de Fibroblastos humanos (FH). Se establecen tres grupos, atendiendo a su procedencia:

- ◆◆▶ Grupo control (**Co**): Células procedentes de individuos clínicamente sanos (no presentan mutaciones de la proteína LRRK2).

- ◆◆▶ Grupo de individuos enfermos portadores de mutación (**G20**). En este caso, las células de este grupo se han obtenido de pacientes diagnosticados con EP y además presentan en heterocigosis la mutación G2019S de la proteína LRRK2.

- ◆◆▶ Grupo de individuos enfermos portadores de mutación (**RG**): Las células de este grupo se han obtenido de pacientes diagnosticados con EP y además presentan en heterocigosis la mutación R1441G de la proteína LRRK2.

Todas estas líneas celulares han sido cedidas generosamente por el grupo del Dr. D. Adolfo López de Munaín, del Hospital Donostia en San Sebastián, donde todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito, además todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Área Sanitaria de Gipuzkoa.

- ▶ Fibroblastos embrionarios de ratón (**MEF**). Las células MEF fueron cedidas por el Dr. Noboru Mizushima, University of Tokio, Japan.

En esta tabla se muestran todas las líneas celulares utilizadas:

LÍNEA CELULAR	DENOMINACIÓN	GENOTIPO	ESPECIE
NEUROBLASTOMA	SH-SY5Y	WT	HUMANO
		MITO QC	
NEUROGLIOMA	H4-LC3-GFP	WT	HUMANO
		ATG5 KO	HUMANO
OSTEOSARCOMA	U2OS	LC3-GFP-RFP	HUMANO

		TFEB-GFP-RFP	
		IMLS-EGFP-MCHERRY-PARKIN	
FIBROBLASTOS	FH	CONTROL	HUMANO
		G2019S	
		R1441G	
	MEF-LC3-GFP	WT	RATÓN

Tabla 1. Tipos de células utilizadas.

4.2.1.3 Mantenimiento de líneas celulares.

El mantenimiento celular es semejante para todas las líneas celulares. Todas las líneas se incuban a 37° C, en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Además, todas se siembran y se mantienen en un medio de cultivo DMEM (del inglés “*Dulbecco’s modified eagle médium*”) que se suplementa con distintos componentes según el tipo celular (**Tabla 2**).

Las células **SH-SY5Y** se incuban y se siembran en medio DMEM/F12, (GIBCO 21331-020) suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés “fetal bovine serum”) (Sigma F7524) al 10-15%, glutamina (Sigma G7513) 2mM, penicilina (40 U/ml) y estreptomycin (40 µg/ml) (HyClone 456-1046), además se añaden 5ml de aminoácidos no esenciales (MEM NEAA 100X) (GIBCO 11140-035) y 5ml de piruvato sódico (Sigma S8636).

Las células **H4 y U2OS**, se siembran e incuban en medio DMEM con alto contenido en glucosa y piruvato (GIBCO 21969-035), suplementado con FBS 10%, penicilina/estreptomycin 40 U/ml y 40 µg/ml, glutamina 2mM además de HEPES (Thermofisher BP299) 0.01M y geneticina (Thermofisher G418) 0.5mg/ml.

Las células primarias de **FH** y los **MEF LC3-GFP**, se siembran y se incuban en medio DMEM, (CORNING 10-013-CV) suplementado con FBS, glutamina y penicilina/estreptomycin en idénticas concentraciones que el medio anterior. En el caso de los **MEF LC3-GFP**, el medio irá suplementado además con geneticina 0.5mg/ml con la intención de mantener el transfecto LC3-GFP.

A todos los medios de cultivo se les añade plasmocure a una concentración de (250 µL/500ml de medio) durante la primera semana y plasmocin a una concentración de (100 µL/500ml de medio) para las semanas consecutivas para garantizar que los cultivos quedan libres de bacterias del género *Mycoplasma*.

MEDIOS DE CULTIVO					
Tipo celular	SH-SY5Y	FH	H4	U2OS	MEF
Volumen					
500 mL	DMEM/F12 (GIBCO)	DMEM (CORNING)	DMEM (GIBCO)	DMEM (GIBCO)	DMEM (GIBCO)
50 mL*	FBS	FBS	FBS	FBS	FBS
2 mL	Penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL	Penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL	Penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL	Penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL	Penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL
5 mL	L-Glutamina 200 mM	L-Glutamina 200 mM	L-Glutamina 200 mM	L-Glutamina 200 mM	L-Glutamina 200 mM
	Sodio Piruvato*		Geneticina 50 mg/mL	Geneticina 50 mg/mL	Geneticina 50 mg/mL
	MEM NEAA		HEPES 1M	HEPES 1M	
100 µL	Plasmocin 25 mg/mL	Plasmocin 25 mg/mL	Plasmocin 25 mg/mL	Plasmocin 25 mg/mL	Plasmocin 25 mg/mL
250 µL	Plasmocure 100mg/ml	Plasmocure 100mg/ml	Plasmocure 100mg/ml	Plasmocure 100mg/ml	Plasmocure 100mg/ml

Tabla 2. Medios de cultivo utilizados para cada línea celular. *Excepto en SH-SY5Y MitoQc, a las que se añaden 75ml de FBS y no se les añade piruvato sódico.

4.2.1.4 Manipulación celular

Todas las células, independientemente del tipo al que pertenezcan, se cultivan en envases que permiten la adherencia celular y la replicación de estas. Las células se mantienen en el mismo envase hasta que alcanzan el 80% de confluencia, lo cual, es visible bien al microscopio, o bien, observando el viraje de color rojo a amarillo del medio, que indicaría el agotamiento de nutrientes de éste.

En ocasiones existe un agotamiento de nutrientes sin llegar a una confluencia óptima, en estos casos, se mantienen en los mismos envases y se renueva el medio.

Para transvase de las células, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Se recoge en un falcón de 50ml el medio en el que se encuentran las células, o bien se desecha y se utilizan 5- o 10ml de medio fresco.
2. Se realizan uno o dos lavados con el tampón salino (PBS, del inglés *phosphate saline buffer*) 1X (Tabla 3) que se descarta en un vaso de precipitados, asegurando que no existen restos de medio.

3. Se añade tripsina-EDTA 1X a 37° C (del inglés "ethylenediaminetetraacetic acid") (Sigma T4049) en volúmenes comprendidos entre 2 y 5 mL, en función del tamaño del envase, 75m² o 175m², respectivamente. La función de la tripsina es romper los enlaces peptídicos formados, mientras que la del EDTA es secuestrar el Ca²⁺ impidiendo las posibles uniones a la superficie del envase. Es imprescindible que esta solución se añada posteriormente al lavado con PBS 1X ya que el medio de cultivo imposibilita la acción de la tripsina sobre las células. El tiempo que tarda la tripsina en actuar oscila entre 1 y 5 minutos, varía según la naturaleza de las líneas celulares, la temperatura y la concentración de la tripsina utilizada y la calidad del lavado efectuado.
4. Se observan en el microscopio las células en suspensión, para cerciorarnos de que las células se han despegado del fondo.
5. Se recogen con una pipeta graduada y se depositan en el tubo Falcon. Posteriormente, las células son centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min en células H4, MEF y U2OS, 10 min en SH-SY5Y y 12 min en el caso de FH.
6. Tras la centrifugación se retira el sobrenadante. El pellet celular es utilizado para siembra y/o congelación o bien para seguir amplificando el número celular.

Tampón fosfato salino			
Compuestos	Concentración (mM)	Concentración(g/L) PBS 10X	Concentración (g/L) PBS 1X
NaCl	137	80	8
KCl	2.7	2	0.2
NaHPO ₄	9.6	11.5	1.15
KH ₂ PO ₄	1	2	0.2
H ₂ O destilada	Enrasar hasta 1L		

Tabla 3. Componentes del tampón fosfato salino. Prepararemos el PBS 1X (uso común), del stock de PBS 10X.

4.2.1.5 Congelación y descongelación de cultivos celulares

Congelación y descongelación celular, son procedimientos realizados en un periodo corto de tiempo, pues las células se congelan en FBS diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Este compuesto es tóxico a temperatura ambiente, sin embargo, su función es deshidratar las células durante la criogenización, previniendo la formación de cristales de hielo en el espacio intracelular, impidiendo así la muerte celular a bajas temperaturas.

Para realizar correctamente la congelación, se resuspende el pellet celular con 1ml de FBS/DMSO al 10% y se trasvasa rápidamente al tubo de criogenización (rotulado previamente con la fecha, el tipo y el pase celular que vamos a congelar) (Fisherbrand 11321675), y este a su vez a un recipiente de congelación para que esta se haga a ritmos lentos $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Todas las células se mantendrán congeladas en tanques de nitrógeno líquido y/o en congeladores de -80°C .

Por otra parte, cuando queremos descongelar una línea celular, introducimos el medio de cultivo en el baño termostático a 37°C , hasta que esté atemperado, a continuación sacamos el vial de criogenización, le añadimos 1ml de medio hasta la suspensión completa de las células, posteriormente, pasamos esta suspensión a un falcón de 15ml junto con otros 4-5 ml de medio atemperado y centrifugamos (en idénticas condiciones que en el apartado anterior) para eliminar los restos de DMSO.

Por último, el pellet celular obtenido será resuspendido con 5ml de medio fresco y se trasvasará a un envase de 25m^2 que se introduce en el incubador para favorecer el crecimiento.

4.2.1.6 Contaje y siembra celular

El contaje de células es imprescindible para que la confluencia celular de nuestra siembra sea la óptima.

Para comenzar es necesario despegar y centrifugar nuestras células hasta obtener el precipitado, posteriormente resuspendemos éste en un volumen de 1 a 5ml de medio fresco (en función del tamaño del pellet). Para realizar el contaje se combinan $10\ \mu\text{L}$ de esta suspensión con $10\ \mu\text{L}$ de trypan blue 10X. De estos 20

µL de mezcla, se añaden 10 µL a las cámaras de contaje (Biorad 145-011) para ser introducidas en los contadores automáticos de BioRad o de Olympus.

Una vez obtenida la concentración celular, atendiendo al tipo celular (**Tabla 4**) y a la placa donde se va a realizar la siembra, (placa de 6, 24 o 96 pocillos), se utiliza un volumen de suspensión celular diferente (2, 0.5 y 0.1 ml/pocillos respectivamente). En la siguiente tabla adjunto las concentraciones a las que se siembra cada tipo celular, según la placa usada.

Siembra por tipo celular				
	Placa 6 Pocillos	Placa 24 pocillos	Placa 96 pocillos	Placa 96 pocillos (Seahorse)
H4 GFP-LC3	75.000cels/ml	75.000cels/ml	80.000cels/ml	8.000cels/pocillo
U2OS	80.000cels/ml	80.000cels/ml	85.000cels/ml	-
FH WT	35.000cels/ml	35.000cels/ml	35.000cels/ml	20.000cels/pocillo
FH G2019S	40.000cels/ml	40.000cels/ml	40.000cels/ml	
SH-SY5Y	110.000cels/ml	110.000cels/ml	120.000cels/ml	15.000cels/pocillo
MEF	70.000cels/ml	70.000cels/ml	72.000cels/ml	

Tabla 4. Número de células necesarias para su uso óptimo, según la placa de uso.

4.2.2 Tratamientos

4.2.2.1 Tratamientos "in vitro"

Una vez sembradas las células y habiendo éstas alcanzado una confluencia óptima, serán sometidas a diferentes estímulos, con varios moduladores y en distintos periodos de tiempo. Atendiendo a la naturaleza de los fármacos o sustancias a administrar, estas podrían ser diluidas, bien en medio de cultivo, o bien en otros diluyentes como etanol o DMSO, que permitan una mayor solubilidad. Se prepararán soluciones madre de las que haya que coger un volumen no superior al 1 % del volumen final del pocillo, evitando así la posible toxicidad asociada al vehículo.

A continuación, se adjunta una tabla resumen con todos los fármacos o sustancias que fueron utilizadas. (Tabla 5)

Tratamiento	[] Final	Vehículo	Mecanismo de acción	Casa comercial (referencia)
3-MA	10 mM	DMEM	Inhibidor de la PI3KC3 y PI3KC1	Sigma(M9281)
Baf. A1	100 nM	DMSO	Inhibe la bomba ATPasa vacuolar, impidiendo la acidificación del lisosoma y por tanto su fusión con el autofagosoma	LC (B-1080)
Baf. A1 + EBSS	100 nM	EBSS		
CCCP	10 μ M	DMSO	Es un inhibidor de la fosforilación oxidativa mitocondrial e inductor de mitofagia	Sigma (C2759)
Rotenona	100 μ M	Agua	Se trata de un insecticida de origen natural que inhibe el complejo mitocondrial I	Sigma (R8875)
EBSS	-	-	Provoca la inducción de autofagia a través de la inhibición de la vía mTOR.	Sigma(E2888)
Rapamicina	1 μ M	Agua	Inhibición del complejo mTORC1	LCLabs(R5000)

Tabla 5. Fármacos más utilizados durante la tesis.

4.2.2.1.1 Tratamientos con cascabello maduro y verde

El cascabello o cúpula de la bellota es un subproducto de la industria agroalimentaria. Utilizamos cascabello recogido del género *Quercus*, concretamente de las especies *Q. ilex* y *Q. suber*.

ID	Descripción de la muestra
ETOH VERDE	Extracto 100% EtOH cascabello verde
ETOH 70% VERDE	Extracto 70% EtOH: 30% H ₂ O cascabello verde
ETOH 50% VERDE	Extracto 50% EtOH: 50% H ₂ O cascabello verde
H₂O VERDE (CVA)	Extracto 100% H ₂ O cascabello verde

ID	Descripción de la muestra
ETOH MADURO	Extracto 100% EtOH cascabello maduro
ETOH 70% MADURO	Extracto 70% EtOH: 30% H2O cascabello maduro
ETOH 50% MADURO	Extracto 50% EtOH: 50% H2O cascabello maduro
H2O MADURO (CMA)	Extracto 100% H2O cascabello maduro

Las muestras de cascabello secas, recogidas en diferentes estados de maduración (maduro o verde), son introducidos en un molino mecánico de polvo fino y se extraen con diferentes solventes (agua, acetona, etanol y la combinación de agua y etanol), en agitación (180 min, 25°C). Los extractos se filtran y se evaporan al vacío hasta secarse para dar extractos liofilizados que una vez diluidos en agua protegeremos de la luz en diferentes proporciones (**Tabla 6**).

Tabla 6. Extractos de cascabello en diferentes solventes.

Estos compuestos de cascabello fueron aportados por el Dr. Cava (Catedrático de Tecnología de Alimentos Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos Facultad de Veterinaria Grupo de Investigación TRADINNOVAL INBio G+C de la Universidad de Extremadura).

A partir de ahora cuando nos refiramos a CMA o CVA nos estaremos refiriendo a los extractos de cascabello obtenidos a partir de la fracción acuosa, pues fue la fracción seleccionada para el desarrollo de la tesis.

4.2.2.1.2 Tratamientos con inductores de autofagia

•**Privación de nutrientes:** Se ha demostrado que la ausencia de nutrientes activa el mecanismo de autofagia a través de diferentes mecanismos de señalización celular, siendo la inhibición de la vía mTOR la más importante (Rodríguez-Arribas et al., 2017). Para conseguir una privación de nutrientes se utiliza el medio de cultivo EBSS, del inglés "*Earle's Balanced Salt Solution*", este medio no dispone de fuentes de nitrógeno o carbono que puedan ser utilizadas por las células.

•**Rapamicina:** Se trata de un fármaco inmunosupresor y antiproliferativo que actúa como inhibidor específico del complejo mTORC1. Esta se une formando un complejo con la proteína de unión a FK506 (FKBP12), de tal forma que es este

complejo quien actúa como un inhibidor alostérico del complejo mTORC1 (Li et al., 2014).

Resveratrol (Tokris 1418): Se trata de un polifenol natural, que activa de forma alostérica a SIRT1, favoreciendo su translocación nucleocitoplásmica, y por tanto activando la autofagia, también induce la autofagia mediante la activación de la AMPK ((Kou & Chen, 2017a))

4.2.2.1.3 Tratamientos con inhibidores del mecanismo de autofagia

•**3-Metiladenina (3-MA)**: La 3-MA es un inhibidor selectivo de autofagia pues actúa directamente sobre PI3K Clase III. La inhibición de este modulador da lugar a la regulación negativa de la autofagia en estados iniciales de la misma. (Heckmann et al., 2013)

•**Bafilomicina A1** (Baf. A1): Baf. A1 es un antibiótico que inhibe la bomba ATPasa vacuolar. La inhibición de esta bomba en la membrana del lisosoma se traduce en la incapacidad de éste de acidificar su medio interno, impidiendo de este modo, la fusión de este organelo con el autofagosoma. (Klionsky et al., 2021)

•**Baf. A1 + EBSS**: El efecto privativo del EBSS en combinación con el bloqueo de la autofagia a través de la basificación del interior de los lisosomas, dará lugar a un aumento de estructuras involucradas en el proceso fundamentalmente lisosomas, endosomas tardías y autofagosomas (Rodríguez-Arribas et al., 2017).

4.2.2.1.4 Tratamientos que alteran la función mitocondrial

•**Rotenona(R)**: Se trata de un insecticida de origen natural que inhibe el complejo mitocondrial I, muy relacionado con el desarrollo de la EP.(Radad et al., 2019; Tanner et al., 2011)

•**Cccp** (del inglés Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone); Se trata de un inhibidor químico de la fosforilación oxidativa, que actúa mediante la despolarización de la membrana plasmática y reduce la producción de ATP. Además al actuar como un protonóforo da lugar a la alteración de las bombas de

protones y el metabolismo celular que causará la muerte celular.(Sekyere & Amoako, 2017)

4.2.2.2 Tratamientos de modelos “in vivo”

4.2.2.2.1 Procedimiento del modelo *Drosophila melanogaster* (Dm)

El procedimiento en modelos *drosophila*, fue realizado en el país vasco con un modelo que expresa la mutación G2019S y otro modelo que expresa la mutación R1441G.

4.2.2.2.2 Procedimiento del modelo murino ICR

Este procedimiento fue nombrado como “Evaluación de los efectos del cascabello y/o urolitina a corto-medio plazo en ratones ICR “, aprobado por la Comisión de Ética y Bioseguridad de la Universidad de Extremadura a fecha de 15 de Julio de 2020. Este procedimiento se encuentra encuadrado en el proyecto con referencia IB20031, financiado por la Junta de Extremadura, que lleva como título “Identificación de dianas terapéuticas de compuestos bioactivos procedentes de cascabello de bellota en modelos de neurodegeneración”. El procedimiento está clasificado con grado de *severidad moderada*, además respeta los requisitos de reemplazo, refinamiento y reducción, teniendo en cuenta las normativas vigentes a efecto.

En el experimento se incluyeron 60 ratones de la cepa ICR, de 4 semanas de edad, de los cuales 30 eran machos y 30 hembras. Los animales fueron mantenidos y sacrificados en el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura en Cáceres en condiciones óptimas de aislamiento y libres de patógenos, pues se aplicaron las medidas necesarias para garantizar las condiciones sanitarias idóneas.

Se utilizó la inyección intraperitoneal para la administración de los diferentes tratamientos en cavidad abdominal. Para llevar a cabo esta técnica, se prepararon las jeringas de 1 ml con 100 µl de cada tratamiento por una persona experta en la materia (cada ratón previo a la inyección se inmoviliza y se coloca ligeramente cabeza abajo). Es importante que inicialmente se seleccionen y separen los grupos de ratones por orden de inyección.

En los grupos que se administra leupeptina y cascabello, se inyecta la leupeptina dos horas antes a la inyección con los cascabullos.

Las fracciones en diferentes estados de maduración de los cascabullos se diluyen en NaCl 0.9%, a una concentración del 0.5% (0.5g/100ml), normalizados a una concentración conocida de compuestos fenólicos.

Por último, pasadas 4h desde la inyección de los cascabullos se procede al sacrificio por dislocación cervical. Previamente, los ratones son anestesiados con isoflurano al 0.5%. siguiendo las indicaciones del comité de bioética ya descrito con anterioridad.

A continuación se enumeran los grupos utilizados en el estudio:

1) Grupo control: Este grupo fue utilizado como control negativo, a los ratones incluidos en este grupo se les inyectó 100 µl de NaCl 0,9% filtrado y esterilizado, vehículo en el que iban disueltas las sustancias de estudio.

2) Grupo CMA: Los ratones fueron tratados con cascabello maduro al 0,5%, diluido con NaCl 0.9%. El extracto fue normalizado a una concentración de 2.95 mg de compuestos fenólicos totales (TFC)/ml.

3) Grupo CVA: Los ratones fueron tratados con cascabello verde al 0,5%, diluido con NaCl 0.9%. El extracto fue normalizado a una concentración de 2.86 mg TFC/ml.

4) Grupo ayuno: Este grupo se utilizó como control positivo de autofagia. Los ratones de este grupo permanecieron sin comida durante 24 horas antes del sacrificio, tras estas fueron inyectados con 100 µl de NaCl 0,9% filtrado y esterilizado.

5) Grupo ayuno + CMA: Los ratones fueron tratados con cascabello maduro al 0,5%, diluido con NaCl 0.9%. El extracto fue normalizado a una concentración de 2.95 mg de compuestos fenólicos totales (TFC)/ml en un grupo que permaneció sin comida, durante 24 horas antes del sacrificio.

6) Grupo leupeptina: La leupeptina se preparó justo antes de la inyección, esta se utilizó con la finalidad de inhibir la autofagia. Se preparó a una concentración de 15mg/kg, con 100 µl con NaCl 0,9% filtrado y esterilizado.

7) Grupo leupeptina + CMA: La leupeptina a una concentración de 15mg/kg diluida en NaCl 0,9%, fue inyectada dos horas antes del tratamiento con CMA 0.5%.

8) Grupo leupeptina + CVA: La leupeptina a una concentración de 15mg/kg diluida en NaCl 0,9%, fue inyectada dos horas antes del tratamiento con CVA 0.5%.

9) Grupo leupeptina + ayuno: Este grupo se inyecta con leupeptina a una concentración de 15mg/kg, tras 24 horas sin comida.

10) Grupo ayuno + leupeptina + CMA: Este grupo se inyectó con leupeptina a una concentración de 15mg/kg, tras 24 horas sin comida. Dos horas después de la inyección con leupeptina, se les inyectó CMA al 0.5%.

Cada grupo experimental estaba constituido por 3 ratones ICR machos y 3 hembras, hecho que no permitirá analizar las posibles diferencias en función del sexo.

4.2.3 Western blotting

4.2.3.1 Obtención de lisados celulares

Para la obtención de lisados, las células se siembran en placas de 6 pocillos, (3 pocillos/condición), y se mantienen en el incubador 24 horas, posteriormente son tratadas a concentración y tiempo indicado.

Tras el tratamiento correspondiente, se trasvasa el medio (con los tratamientos) a un tubo de 15 ml, se lava cada pocillo con 500 µl de PBS 1X, y se recoge de nuevo en el mismo tubo. Se añaden 300 µl de tripsina 1X a cada pocillo para despegar las células y cuando estén en suspensión, se recogen de nuevo al mismo tubo. Por último, se realiza una centrifugación a 2500 rpm, 7 min a 4°C. Para continuar con el proceso, se elimina el sobrenadante, se lava el precipitado con 1 ml de PBS 1X para retirar restos de medio y tripsina, y se transvasa a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml donde se centrifuga de nuevo a 6500 rpm, 4 min a 4°C.

Finalmente, se retira el sobrenadante y el precipitado resultante se congela a -80°C o bien se lisa y se cuantifica a continuación.

4.2.3.1.1 Lisis total (fracción soluble e insoluble)

4.2. 3.1.1.1 Lisis celular con NP-40

Se lleva a cabo con el buffer de lisis NP-40 al 0,5 % (del inglés “nonyl phenoxypol-*yethoxyethano*”), previamente suplementado con inhibidores de fosfatasa y de proteasas (**Tabla 8**). Se resuspenden todas las muestras con 40 o 60 µl de este, en función de la cantidad de pellet existente, a continuación se incuban en hielo 10 min y por último se realiza una última centrifugación a 15000 rpm, 15 min a 4°C. Finalmente se desecha el pellet, pues contiene restos de membrana y debris celular, por ello trasvasamos el sobrenadante a un nuevo tubo rotulado con cada condición, para poder trabajar con él.

Tampón de lisis NP40 0.5%		
Compuestos	Concentración final	Volumen (ml)
NP40	0.5%	0.5
Tris-HCl 0.5M ph 7,4	100mM	20
NaCl 1,5M	300mM	20
Inhibidor de fosfatasa (Roche)	1 pastilla*	-
Inhibidor de proteasas (Roche)	1 pastilla*	-
Agua destilada	Enrasar hasta 100ml	

Tabla 7. Compuestos usados para la formación del NP40 0,5%. *Se añadirá una pastilla de cada inhibidor por cada alícuota de 10 ml de tampón.

Es importante destacar que todos estos pasos se hacen en frío (4°C) para evitar la actividad proteolítica y fosfatídica, lo que daría lugar a resultados erróneos.

4.2.3.1.1.2 Lisis celular con SB 1X

El SB1X del inglés “Sample buffer” 1X (**Tabla 9**), se utiliza para la lisis celular total, es decir, incluye la lisis, tanto de la parte soluble, como de la fracción insoluble. Tras obtener el precipitado resultante de la centrifugación a 6500 rpm 4 min y a 4°C, las muestras se lisan con 80 o 100 µl de tampón para seguidamente sonificarse durante 1 ó 2 s. Por último, las muestras deben ser desnaturalizadas a 95°C durante 10 min, para posteriormente proceder a la cuantificación de proteínas y poder analizar estas mediante una electroforesis.

Tampón de lisis "Sample Buffer"				
	SB 1X		SB 4X	
Compuestos	Concentración final	Volumen o gramos	Concentración final	Volumen o gramos
Tris-HCl 0.5M ph 6,8	50mM	10ml	200mM	20ml
Glicerol	10%	10ml	40%	20ml
SDS	2%	2gr	8%	8gr
Agua destilada	Enrasar hasta 100ml		Enrasar hasta 100ml	

Tabla 8. Compuestos usados para la formación del tampón SB1X.

4.2.3.1.1.3 Lisis citosólica y mitocondrial (aislamiento de fracción citosólica y mitocondrial)

Para la obtención, por separado, de proteínas citosólicas y proteínas mitocondriales, las células se siembran en placas de 6 pocillos, (1 placa/condición), y se mantienen en el incubador 24 horas, Tras 24 horas son tratadas a concentración y tiempo indicados.

Tras el tratamiento correspondiente, se aspira la placa y se lava cada pocillo con 300 µl de PBS 1X. A continuación, tras recoger el PBS 1X añadido, en un tubo de 15 ml, se añaden 1000 µl de tripsina 1X /3 pocillos, y por último se recogen las células en el tubo nombrado, con 5ml de medio nuevo.

A continuación se redactan los pasos seguidos:

1. Centrifugamos los tubos a 2500 rpm 7 min a 4°C
2. Retiramos el sobrenadante, y se añade 1 ml de PBS 1X por tubo, posteriormente se trasvasa a un eppendorf de 1,5ml, previamente rotulado como tubo A (que se corresponderá con el tubo de **fracción mitocondrial**)
3. Centrifugamos los eppendorf a 6500 rpm 4 min a 4°C y retiramos de nuevo el sobrenadante.
4. Añadimos 100 µl de lisis buffer (Tabla x) y resuspendemos en diez ocasiones (este paso no debe demorarse más de 30seg).
5. A continuación centrifugamos los eppendorf a 13000 rpm, 3 min a 4°C y a continuación trasvasamos el sobrenadante resultante a otro eppendorf (rotulado como tubo B (**fracción citosólica**)). Es importante que cuando trasvasemos el sobrenadante, dejemos 10 µl, pues es muy importante que no toquemos el pellet y así evitar contaminación de una fracción con otra.

6. A continuación añadimos 33 μ l de SB 4X (**Tabla 8**), al eppendorf B
7. Por otra parte eliminamos los 10 μ l restantes del eppendorf A y añadimos 150 μ l de SB 1X.
8. Tras la lisis de ambas fracciones, los eppendorf A y B de cada tratamiento son calentados en el termobloque a 95°C durante 5 min.
9. Finalmente se guardan todas las muestras a -20°C para ser cuantificadas al día siguiente.

Tampón lisis Buffer		
Para 50 ml		
Compuestos	Concentración final	Volumen o gramos
Tris pH 8 100 mM	25 mM	12,5ml
Sacarosa	250 mM	4,27 gr
EDTA	1mM	50 μ L
Pastillas		
Agua destilada	Enrasar hasta 50 ml	
Para 10 ml		
Pastilla proteasa	1 pastilla	
Pastilla fosfatasa	1 pastilla	
Alícuotas 1 ml		
Digitonina	0,05%	0,5 mg
DTT 0,1 M	0,1 mM	1 μ L
PMSF 0,1 M	0,1 mM	1 μ L

Tabla 8. Componentes lisis buffer

4.2.3.2 Obtención de lisados de tejidos de ratón

Para la obtención de tejido murino, se deben recoger los distintos órganos del ratón que queremos a analizar, tras la finalización del experimento. Los órganos deben extraerse, a ser posible, siempre de la misma porción.

En primer lugar se extrajeron cerebro y cerebelo, tras esto se procedió a la apertura de la cavidad abdominal de cada ratón para la obtención de los demás órganos, siguiendo siempre el mismo orden; hígado, corazón, intestino y músculo. Los órganos se criocongelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para posteriormente realizar su procesamiento en el laboratorio.

Se adjunta el material necesario para la extracción:

- Alcohol al 70%
- PBS 1X
- Pinzas de disección

- Tijeras de disección
- Vasos de precipitados
- Papel de filtro
- Agujas de 20G para inmovilizar al ratón post-mortem
- Tubos de microcentrífuga de 1.5ml estériles y previamente rotulados con cada una de las condiciones y numeración de ratón y tratamiento.

4.2.3.2.1 Lisado de tejido cerebral

Con pinza y bisturí se obtiene un pequeño fragmento que se introduce en los tubos de centrifugación "*Soft tissue homogenizing CK28-R*" (Prcellys Lysing Kit, KT03961-1-007.2), donde previamente se han añadido 500 µl del tampón de lisis RIPA (**Tabla 9**). Posteriormente introducimos los tubos en el *precellys* y realizamos dos ciclos de 6500 rpm y 23 s, a temperatura ambiente, con un reposo de 20 s entre ambos ciclos. Dejamos reposar las muestras en hielo durante 30-60 min. Posteriormente centrifugamos a 11700 rpm durante 15 min a 4 ° C. A continuación, trasvasamos el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1,5ml, previamente rotulado, donde se encontrarán las proteínas de interés.

Tampón de lisis RIPA		
Compuestos	Concentración final	Volumen o gr
Tritón X-100	1%	1 ml
Tris-HCl	100mM	1.21gr
NaCl	150mM	0.87gr
EDTA 0.1M	10 mM	10ml
SDS 10%	0.1%	1 ml
Inhibidor de fosfatasas (Roche)	1 pastilla*	
Inhibidor de proteasas (Roche)	1 pastilla*	
Agua destilada	Enrasar hasta 100ml y ajustar ph a 7,4	

Tabla 9. Tabla resumen con todos los componentes del tampón RIPA. *Se añadirá una pastilla de cada inhibidor por cada alícuota de 10 ml de tampón.

4.2.3.3 Cuantificación de proteínas

Tras la obtención de los lisados tisulares, se determina la concentración proteica de los mismos. Para ello empleamos el método del ácido bicinchonínico (BCA, del inglés "bicinchoninic acid") (Sigma B9643), este es un método ampliamente utilizado que se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^+ . El Cu^+ reacciona con el BCA y provoca un viraje de color (de verde a violeta), cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de proteínas. (Bainor et al., 2011)

Como referencia se utiliza una recta patrón de concentración de proteína conocida, esta servirá para interpolar el valor de nuestra muestra, pues según la Ley de *Lambert-Beer*, la absorbancia de un compuesto a una determinada λ es directamente proporcional a su concentración.

La recta patrón se prepara con cinco concentraciones crecientes de seroalbúmina bovina (BSA, del inglés "bovine serum albumin") las cuales estarán comprendidas entre 0 y 2 mg/ml. Para comenzar utilizaremos una placa de 96 pocillos transparente (Corning 3788), en la que añadiremos 2 μL de cada una de las muestras patrón (el experimento se realiza siempre por triplicado), y a continuación se añadirán 2 μL de las muestras de interés. Finalmente, se añaden 200 μL por pocillo de una dilución 50:1 de BCA en sulfato de cobre (II) Esta mezcla debe ser incubada a 37 ° C durante 30 minutos (Walker, 1994). Transcurrido este tiempo se realiza la lectura en el espectrofotómetro microplaca (TECAN INFINITE M NANO+ a una absorbancia de 570 nm.

BCA Cuantificación de proteínas

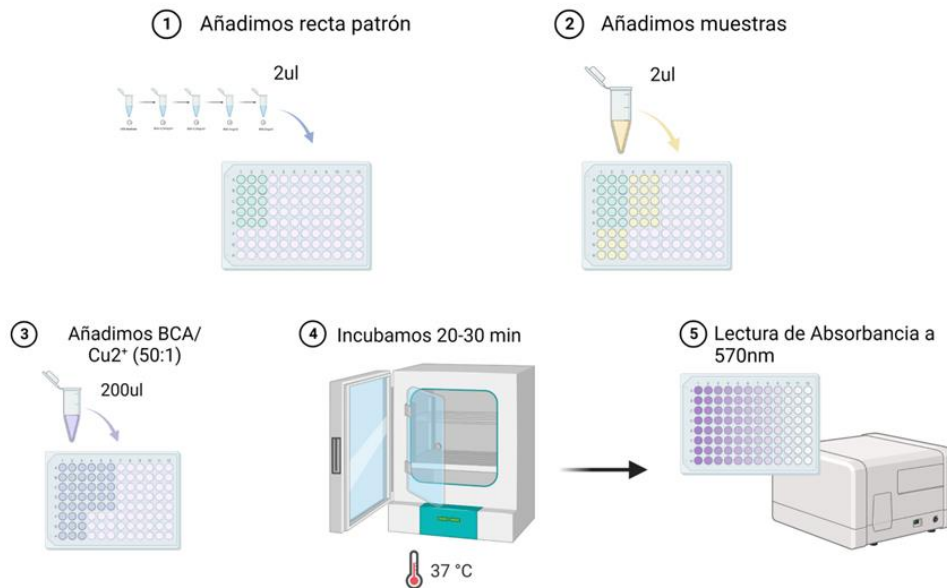


Ilustración 6. Protocolo para la cuantificación de proteínas mediante BCA. *Created with BioRender.com*

4.2.3.4 Electroforesis de proteínas

La electroforesis es una técnica que permite la separación de las proteínas de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica. Para realizar ésta de forma correcta, se han de preparar las muestras a cargar, con la misma concentración de proteínas (entre 10 y 20 µg) y con el mismo volumen (15-30 µl), que se ajustará en último lugar con PBS 1X. Previamente a las muestras se les adiciona tampón de carga 5X (representando este el 20% del volumen final) ver composición en (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). El azul de bromo-fenol contenido en este buffer, permite evidenciar la progresión de las muestras en el gel, el glicerol, aumenta la densidad, haciendo que la muestra sea más fácil de cargar, y por último el dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés "sodium dodecyl sulphate"), y el β-mercaptoetanol se encargan de desnaturalizar las proteínas, consiguiendo en estas un carácter aniónico proporcional a su masa, de tal modo que la migración de las proteínas será uniforme (Matsumoto et al., 2019)

TAMPÓN DE CARGA 5 X		
Compuestos	Concentración final	Volumen o gramos
Azul de bromofenol	0,025 %	250µL
Glicerol	50 %	5 mL
SDS	10 %	1 gr
Tris HCl 1M pH 6,8	250mM	2,5ml
Agua destilada	Enrasar a 10 mL	
B-mercaptoetanol	5 %	25 µL*

Tabla 10. Componentes del tampón de carga 5X. *Se añaden 25 µL de B-mercaptoetanol por cada 500 µL de tampón 5X.

Previamente a ser cargadas y para completar la desnaturalización, las muestras deben ser calentadas en un termobloque a 95° C durante 5 minutos. (C. Wang et al., 2022). Se utiliza un marcador de peso molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*, de Bio-Rad 161-0374), que se suele situar en el primer pocillo del gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE, del inglés SDS-polyacrilamide gel electrophoresis).

Posteriormente las muestras desnaturalizadas son contenidas en los pocillos colindantes para finalmente iniciar *la electroforesis*. Los geles comerciales utilizados presentan un 12 % de acrilamida, o bien un gradiente del 4 al 20%. Su uso se hará en función de la proteína que queramos observar (geles de 12% para proteínas de bajo peso molecular(12-70kd) y geles de gradiente 4-20% para proteínas de alto peso molecular(80-300kd)).

Existen dos sistemas para la realización de este procedimiento. Utilizamos el sistema Bio-Rad *Mini Protean Tetra* (geles Mini-Protean) para geles de 10 a 15 pocillos, mientras que el sistema Bio-Rad *Criterion Cell* (geles Criterion) se emplea para geles de 18 y/o 26 pocillos. En ambos, se emplea el tampón Laemli 1X mientras que el tiempo de separación oscilará entre 45 min y 1h respectivamente. Se mantiene una corriente entre 110-180 voltios (V) para los geles de Bio-Rad *Mini Protean Tetra* y entre 90-100 V para los geles de Bio-Rad *Criterion Cell*.

4.2.3.5 Transferencia de proteínas

Tras la electroforesis, se transfieren las proteínas a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF), mediante el método descrito por (Goldman & Speicher, n.d.).

Para ello, la membrana de PVDF debe activarse durante 1 min con metanol, a continuación ha de lavarse con agua destilada durante 1 min (3 veces) y finalmente sumergirse en el tampón de transferencia (**Tabla 11**) al menos 5 min.

TAMPONES WESTERN BLOTTING					
Electroforesis		Transferencia en Húmedo		Transferencia en Húmedo o Semi-seco	
Laemli 1X		Caps 1X		Tris Glicina Metanol (TGM)	
Compuestos	Volumen	Compuestos	Volumen	Compuestos	Volumen
Tris-Glicina-SDS 10x	100ml	Caps 10x	100ml	TGM 10x	100ml
Agua destilada	900ml	Agua destilada	700ml	Agua destilada	700ml
		Metanol	200ml	Metanol	200ml

Tabla 11. Componentes de los tampones utilizados para la electroforesis y la transferencia de proteínas respectivamente.

4.2.3.5.1 Transferencia en húmedo

El equipo de transferencia utilizado para geles de 10 y 15 pocillos fue el *Mini Trans Blot electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*. Para geles de 18 y 26 pocillos se utiliza el sistema de transferencia en húmedo *Criterion Blotter*.

El material utilizado para la transferencia estaba formado por dos papeles Whatman (*Extra Thick Blot PAPER Bio-Rad*), dos esponjillas, la membrana de PVDF, además de los cassette donde se montaban. Tanto los papeles Whatman como las esponjillas antes de utilizarse deben sumergirse durante al menos 10 min en CAPS 1X, para la transferencia de geles de 10 a 15 pocillos o en Tris Glicina Metanol (TGM) si la transferencia es en geles de 18 a 26 pocillos.

Para que la transferencia sea óptima se introducen los cassettes en sus puestos, un imán, un bloque de hielo y se enrasa la cubeta con el tampón que corresponda, se colocan los electrodos y todo el dispositivo al completo se introduce en el frigorífico para comenzar la transferencia. Se aplica una corriente de 100 V durante 90 min para el sistema *Mini Trans Blot electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad* y 75 V durante 45 min para el sistema *Criterion Blotter*.

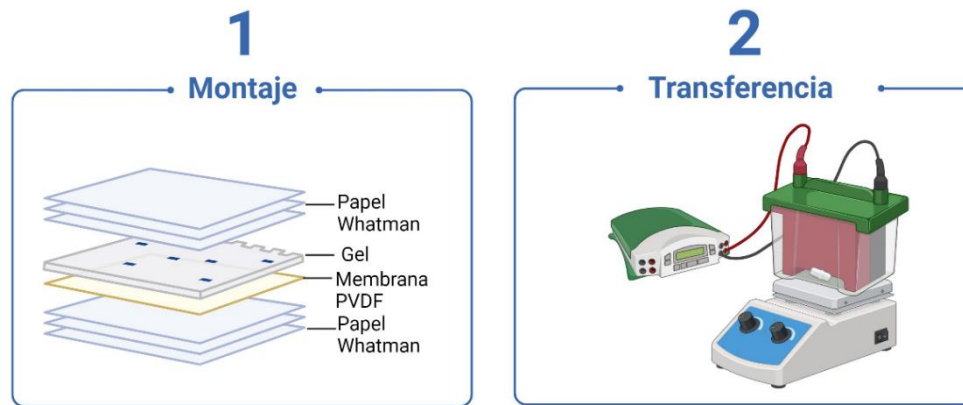


Ilustración 7. Esquema de transferencia de proteínas en húmedo.

Una vez finalizada la transferencia, podemos sumergir 5 min el gel con el colorante azul brillante de Coomassie (Bio-Rad 161-0436) y la membrana con rojo ponceau (Sigma P7170), con la finalidad de verificar la correcta transferencia de las proteínas, además de servir como control interno de carga.

4.2.3.5.2 Transferencia en seco

El equipo de transferencia utilizado en este tipo de transferencia fue el mismo para todos los gels. REF

El material necesario para realizar la transferencia está en este formato se organiza de la siguiente manera; En primer lugar se coloca un papel Whatman de 12x15cm en la parte inferior, a continuación, se coloca la membrana de PVDF y finalmente se añaden tres papeles Whatman de 8x12cm (*Extra Thick Blot PAPER Bio-Rad*). Tanto la membrana de PVDF, como los papeles Whatman deben sumergirse durante al menos 10 min en TGM antes de comenzar la transferencia.

Por último se aplica una corriente de 115 V durante 15 min para el sistema *Mini Trans Blot electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*.

Finalizada la transferencia, sumergimos 5 min el gel con el colorante azul brillante de Coomassie (Bio-Rad 161-0436) y la membrana con rojo ponceau (Sigma P7170), con la finalidad de verificar la correcta transferencia de las proteínas, además de servir como control interno de carga.

4.2.3.6 Detección de las proteínas

Teñida la membrana, se debe eliminar el exceso de rojo ponceau con el tampón salino Tris-Tween 1X (TTBS 1X, del inglés "Tween-tris buffer saline") (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.2).-Posteriormente se sumerge en leche desnatada al 10% en TTBS 1X, durante 1h, a temperatura ambiente y en

agitación, para así bloquear los sitios de unión inespecíficos. Posteriormente, se realizan 3 lavados con TTBS 1X para eliminar los restos de la solución de bloqueo.

TAMPÓN TBS 10X			TAMPÓN TTBS 1X	
Compuestos	Concentración final (mM)	Gramos	Compuestos	Volumen (ml)
NaCl	500	29,25 g	Tampón TBS 10X	100
Tris	100	12,11 g	Tween 20	2 (0,2 %)
Agua destilada	Enrasar 1L, y ajustar pH 7,6		Agua destilada	900

Tabla 12. Compuestos utilizados en la preparación de TTBS 10X y TTBS 1X.

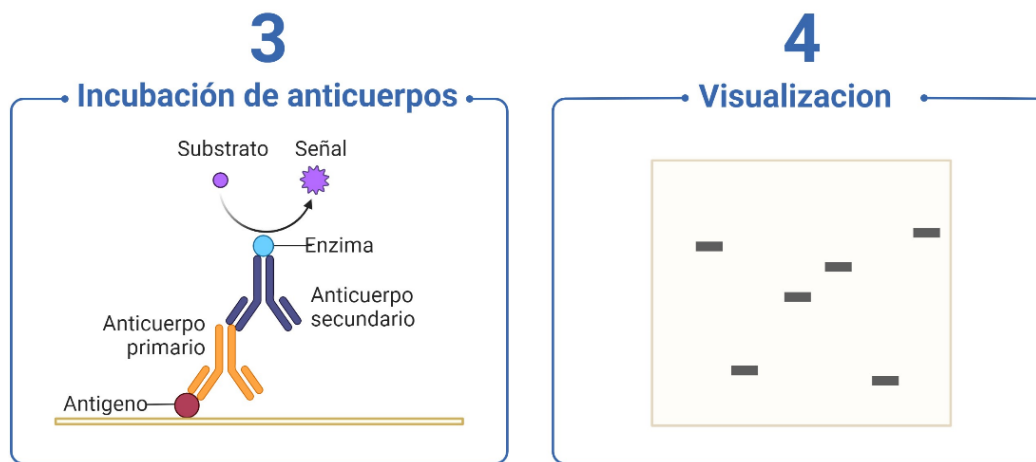
A continuación la membrana ha de sumergirse con el anticuerpo primario específico para la detección de la proteína que interesa analizar. Los anticuerpos se preparan diluidos a una concentración de entre 1:1000 a 1:5000, en leche o en BSA al 5-10% (**Tabla 13**), en función de las recomendaciones de la casa comercial. El tiempo de incubación del anticuerpo primario generalmente es *overnight* a 4°C. La excepción la forman aquellos anticuerpos que están conjugados directamente con HRP, como es el caso de la B- Actina, esta se incuban 1 h y no necesita hibridarse con ningún anticuerpo secundario.

ANTICUERPOS PRIMARIOS					
Anticuerpo	PM (Kd)	Isotipo IgG	Dilución	Diluyente	Casa Comercial
B-ACTINA	42	Monoclonal	1:5000	10% leche en TTBS 1X	Abcam (AB) ab49900)
ALFA-TUBULINA	52	Monoclonal	1:1000	5% BSA en TTBS 1X	CS
AKT	60	Policlonal	1:2000	5% BSA en TTBS 1X	CS (9272)
ATG 5	55	Policlonal	1:1000	5% BSA en TTBS 1X	CS (2630)
BECLINA 1	60	Policlonal	1:1000	10% leche en TTBS 1X	CS (3495)
COX IV	16	Monoclonal	1:1000	5% BSA en TTBS 1X	AB (14744)
DRP1	80	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1 X	CS (8570)
ERK ½ (p44/42 MAPK)	42-44	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1 X	CS (9101)
GAPDH	37	Monoclonal	1:5000	10 % leche en TTBS 1X	MILLIPORE MAB374
FIS 1	15	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1 X	GeneteX (GTX) (111010)
LAMP1	120	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1 X	AB (24170)
LC3	18	Policlonal	1:4000	10 % leche en TTBS 1X	Sigma (L7543)

LONP-1	100	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	Proteintech (15440-1-AP)
MFN-1	84	Policlonal	1:1000	10 % leche en TTBS 1X	AB 104274
OPTINEURINA	75	Policlonal	1:1000	10 % leche en TTBS 1X	CS (58981)
p-mTOR	285	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	Cell Signaling (2971)
p62	62	Monoclonal	1:5000	10 % leche en TTBS 1X	Abnova (ABN) (H00008878)
P-P70S6k	70-85	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS (9202)
PGC1-alfa	75-100	Policlonal	1:1000	10% leche en TTBS 1X	SC (H300)
PARKIN	52	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS (2132)
Prohibitina (PHB1)	32	Policlonal	1:1000	5 % leche en TTBS 1X	CS (2426)
PI3K Clase III	100	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS (3811)
Pink 1	63	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	Novus (BC100-494)
p-Ubiquitin Ser65	-	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS 37642
SIRT-1	120	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS (9475)
SIRT-3	28	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS (5490)
SOD1	18	Policlonal	1:500	5 % BSA en TTBS 1X	PAS-2324S
SOD2	23	Monoclonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	Santa Cruz (SC) 133134
TFEB	65-70	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	Proteintech (13372-1-)
TIMM-23	23	Monoclonal	1:1000	10% leche en TTBS 1X	BD
TOMM20	20	Monoclonal	1:5000	5 % BSA en TTBS 1X	SIGMA WH0009804M
TRX	12	Policlonal	1:200	5 % BSA en TTBS 1X	SC (20146)
Tuberin TSC2	200	Policlonal	1:1000	5 % BSA en TTBS 1X	CS (3612)
VINCULIN	120-160	Monoclonal	1:200	5 % BSA en TTBS 1X	SIGMA V9131

Tabla 13. Anticuerpos primarios utilizados en el Western blotting.

Finalizado el paso anterior, realizamos tres lavados de 5 minutos con TTBS 1X, para seguidamente añadir el anticuerpo secundario pertinente. Éste se escogerá atendiendo a la especie hospedadora del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios se encuentran conjugados con la peroxidasa del rábano picante, o HRP (del inglés "*horseradish peroxidase*"). Estos han de prepararse en leche al 10% a una concentración de 1:5000 o 1:10000 del *stock*, y se incubaba la membrana en esta solución durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, se realizan dos lavados con TTBS 1X, y se procede al revelado de la membrana



. **Ilustración 8.** Incubación de anticuerpos y visualización de proteínas

4.2.3.7 Revelado de membranas

Para revelar la membrana, en primer lugar esta ha de cubrirse con una solución de ECL (del inglés "*Enhanced Chemiluminescent by luminol*") (Pierce, 32106) de 1 a 5 min. Esta solución contiene el sustrato de la HRP, el luminol, que, al ser oxidado, emite luz, y esta es directamente proporcional a la cantidad de proteína que nos interesa cuantificar. EL revelado de las membranas se realiza de manera digital, utilizando el analizador Amersham *Imager 600*.

4.2.3.8 Borrado de membranas

El borrado de proteínas se realiza cuando la membrana está saturada o se han revelado previamente proteínas que coinciden en peso molecular. Para ello, se ha de retirar el exceso de ECL con TTBS 1X, seguidamente se le añade la solución *Stripping Buffer* (Thermo Scientific 46430), durante 10 min a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se realizan dos lavados con TTBS 1X durante 5 min, y se vuelve a bloquear la membrana. Como norma general, se debe realizar la incubación con los anticuerpos fosforilados antes del borrado de la membrana, y dejar la medición de la proteína sin fosforilar después de este.

4.2.3.9 Análisis densitométrico de las membranas

La densitometría de las membranas se llevó a cabo utilizando el software gratuito Image J. Cada proteína se representa como el valor de su densitometría entre el valor de la densitometría de su control de carga. Para poder realizar la comparativa en experimentos diferentes, en algunas ocasiones se ha relativizado la expresión de la cantidad proteica a la condición establecida como

control del experimento. Salvo alguna consideración especial, las proteínas GAPDH, β -actina o tubulina serán las que se utilicen como control de carga de los experimentos realizados.

4.2.4 Silenciamiento génico

El propósito de este procedimiento es conocer la implicación de diversos genes en el desarrollo de una enfermedad y/o su papel en distintas vías de señalización celular.

Para comenzar necesitamos un *small interfering RNA* (siRNA) que impide la síntesis de proteínas específicas, provocando la degradación del mRNA correspondiente. El siRNA se une a una región específica del mRNA complementario para reducir su nivel de expresión. El siRNA es aniónico, por tanto, necesita un transportador para atravesar la membrana plasmática (Vocelle et al., n.d.)

De todas las opciones disponibles para introducir material genético en el interior celular y provocar la inhibición de la expresión genética, se optó por la transfección química mediante Lipofectamina 2000® (Invitrogen 11668027). Se trata de un lípido catiónico que actúa como vehículo, pues gracias a la parte hidrófoba del mismo, forma complejos con los ácidos nucleicos, impidiendo una repulsión electrostática a la hora de ser introducidos,

A continuación se detalla el procedimiento siguiendo las recomendaciones de la casa comercial:

Día 1: Contaje y siembra celular con medio sin antibióticos, para una confluencia celular de 40-50%, a razón de 2ml/ pocillo en placa de 6 pocillos.

Día 2: Se realizan los cálculos necesarios para la preparación de todos los pocillos. Sabiendo que en una placa de 6 pocillos se debe considerar un volumen de 200 μ L/pocillo para realizar la formación de los complejos de ácidos nucleicos y otros 200 μ L/pocillo para introducir el siRNA seleccionado (400 μ L finales/pocillo), nos disponemos a preparar dos tubos, uno rotulado como A y otro como B. En el tubo A se añadirán 4 μ L/pocillo de Lipofectamina 2000 más 200 μ L/pocillo de OPTI-MEM, mientras que en tubo B se introducirá 1 μ g/pocillo de plásmido (siRNA) más 200 μ L/pocillo de OPTI-MEM. Las mezclas de ambos tubos por separado deberán incubarse 5 min a temperatura ambiente, posteriormente ambas mezclas se unirán entre sí en un mismo tubo y se incubarán

durante 20 min, de nuevo a temperatura ambiente. Trascurridos los últimos 20 min se desecharán 400 μ L/pocillo de las placas de 6 pocillos y se irá añadiendo el mismo volumen de la última mezcla ((OPTI-MEM+Lipofectamina 2000) + (OPTI-MEM+ siRNA))

Día 3: Se realiza un cambio de medio, a medio con antibióticos.

24 o 48h post-transfección dependiendo del experimento se realizará el tratamiento oportuno, cuando sea necesario, y tras el mismo se recogerán las células para su posterior lisado, cuantificación y análisis por Western Blotting (WB).

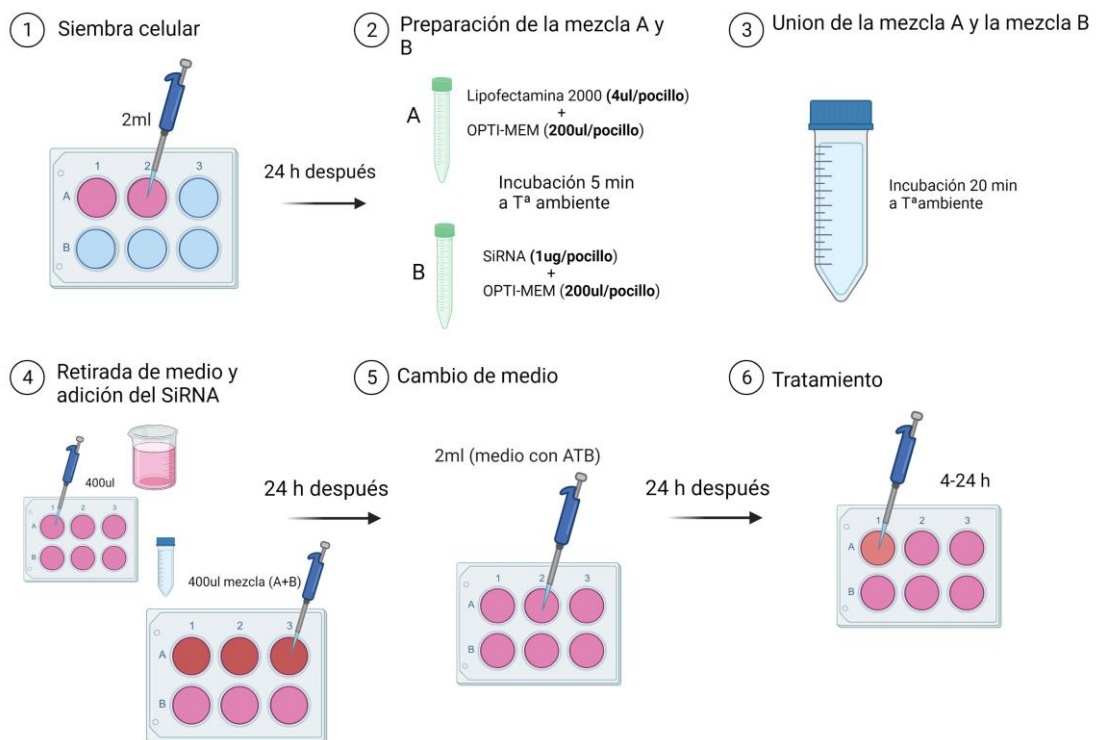


Ilustración 9. Esquema del silenciamiento génico

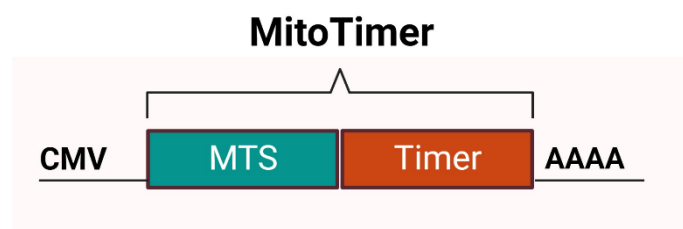
Los siRNA utilizados fueron los siguientes:

- ▶ siRNA Control Negativo; este se utiliza para determinar la eficacia del silenciamiento y controlar los efectos de la transfección. (AM4611, de AMBION)
- ▶ siRNA AMPK; Este gen interfiere en la expresión de AMPK, bloqueando el proceso de activación de la AMPK (AMPK (#HA02727114, de Sigma-Aldrich).
- ▶ siRNA BECN1; Este otro gen que interfiere en la expresión de beclina 1, bloquea el proceso autofágico a nivel del complejo PI3KCIII BECN1 (5'-JUCCGUAAG-GAACAAGUCGGdTdT-3').

► siRNA del Complejo de esclerosis tuberosa 2 (TSC2); Interfiere en la inhibición de la actividad de mTOR inactivando el proceso autofágico (5269468, de Invitrogen-Life).

4.2.5 Sobreexpresión génica

La sobreexpresión génica consiste en sobreexpresar un gen relacionado con la expresión de una proteína de interés. Durante esta tesis se realizó la sobreexpresión de un plásmido formado por la proteína DsRed (proteína fluorescente roja, de la anémona marina de la especie *IDsosoma*) mutada a DsRed1-E5 "Timer", esta es una proteína fluorescente sensible al tiempo que emite fluorescencia verde cuando se ha sintetizado recientemente y cambia de forma irreversible a rojo pasado el tiempo. Timer se encuentra unida en su extremo N terminal con una secuencia de orientación mitocondrial (MTS) del gen de la subunidad VIII del citocromo C oxidasa (matriz mitocondrial) bajo el control del promotor constitutivo "CMV". Por tanto este plásmido, denominado "MitoTimer" nos brinda in-



formación temporal y espacial sobre el recambio de mitocondrias. pues permite observar, si las mitocondrias son sintetizadas "de novo" al emitir fluorescencia verde, o por el contrario son mitocondrias maduras, al emitir fluorescencia roja. (Laker et al., 2014)

Ilustración 10. Reporter MitoTimer

A continuación se detalla el procedimiento general:

Día 1: Contaje y siembra celular en medio sin antibióticos. Tanto en las lamelas de la placa de 24 pocillos como en la placa de 96 pocillos, se utilizó una solución de colágeno a una concentración de 50µg/µl diluido en una solución de ácido acético al 0.2%, a su vez diluido en agua destilada, previo a la siembra para evitar que se levantaran las células con los diferentes lavados. La confluencia celular de la siembra en este caso fue del 80- 90%, a razón de 500 µl/ pocillo en placa de 24 pocillos y de 100 µL en placa de 96 pocillos.

Día 2: Preparación de los cálculos necesarios para la preparación de las mezclas de transfección; Tanto para la placa de 24 pocillos como para la placa de 96 pocillos, se prepararon las siguientes mezclas; mezcla A) Se añaden 2 µL/pocillo para (placa de 24 pocillos) y 0,5 µL/pocillo (para placa de 96 pocillos) de **Lipofectamina 2000** + 50 µL/pocillo (placa de 24) y 25 µL/pocillo (placa de 96) de **OPTI-MEM**, mezcla B) 0,8 µg/pocillo (en placa de 24) y 0,2 µg/pocillo (en placa de 96) del plásmido (**Mito-TIMER**) + **OPTI-MEM**, en idénticas cantidades que en la mezcla A. A continuación estas mezclas son incubadas, por separado, 5 min a temperatura ambiente, y posteriormente se unen en un mismo tubo, generando la mezcla final que se incubará entre 20 y 30 min.

Tras la incubación de la mezcla A y B, se ha de eliminar de cada pocillo el mismo volumen que se añade de la mezcla final. Para placas de 96 pocillos, se añaden 50 µL/pocillo, mientras que para placas de 24 pocillos se añaden 100 µL/pocillo de la mezcla final.

Día 3: Cambiamos el medio de la placa por medio con antibióticos.

Día 4: Tratamos pasadas 48 post-transfección.

4.2.6 Estudio de expresión diferencial de genes

Para investigar la expresión de un determinado gen atendiendo al estímulo con los diferentes extractos de cascabullos o tratamientos, se aplica la técnica de PCR (del inglés "Polymerase Chain Reaction") a tiempo real, conocida como PCR cuantitativa. Se utiliza el marcaje SYBR Green I, éste se une de forma específica al ADN (ácido desoxirribonucleico) de doble cadena, de tal forma que la cantidad de fluorescencia verde emitida es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR formado.

Para poder realizar comparaciones con otros genes, se emplea el método de la cuantificación del ciclo umbral o Ct (del inglés *threshold cycle*). Cuando la fluorescencia supera un valor umbral arbitrario (ruido de fondo), aparece el Ct, de tal modo que a Ct bajos habrá mayor cantidad de ADN inicial, mientras que por el contrario, para Ct altos habrá menor cantidad. Para realizar la comparativa, se utiliza la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Dicha fórmula se realizará, ya que la comparativa es realizada en la fase exponencial de la PCR.

4.2.6.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA será un paso imprescindible para poder comparar la expresión de genes de las células. En nuestro caso, para llevar a cabo este protocolo, utilizamos TriSure (trizol).

Previo a la extracción, se siembran las células de las que queramos obtener el RNA en placas de 6 pocillos, a razón de 3 pocillos por condición, a una confluencia del 80% y 24h después de la siembra, con las células adheridas, se tratan.

Tras el tratamiento, se elimina el medio en el que se encuentran las células y se añaden 333 μ L de TriSure/pocillo (aproximadamente 1ml entre los 3 pocillos), a continuación se trasvasan las células a eppendorf de 1,5ml, rotulados previamente con cada condición.

A partir de este paso podemos, bien congelar a -80°C (máximo un mes), o bien continuar con la extracción; de ser así, tras añadir TRISURE y recoger las células con este, se incuban a temperatura ambiente 5 min, posteriormente se añaden 0.2 ml de cloroformo y se agita 15 seg vigorosamente, posteriormente se incuban 5 o 10 min a temperatura ambiente y se centrifugan a 10400 rpm 15 min a 4°C . Cada microtubo presentará dos fracciones, la fracción que nos interesa será la fracción acuosa (parte superior), esta se trasvasa a otro eppendorf de 1,5 ml y al igual que en el apartado anterior, en este momento podríamos parar la extracción congelando ésta a -20°C o bien continuar con el protocolo.

A continuación, se añaden 0.5 ml de Isopropanol 100X e incubamos 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga a 10400 rpm 10 min más a 4°C .

Finalmente eliminaremos el sobrenadante con especial cuidado para no perder el pellet y cuando se haya evaporado parcialmente añadiremos 1 ml de etanol al 75% (preparado con agua libre de ARNasas). El almacenamiento de las muestras podrá hacerse durante un año a -20°C o bien una semana a 4°C .

4.2.6.2. Calidad del ARN

La calidad ARN extraído tendrá que ser analizada antes su utilización, para ello se mide su absorbancia a las longitudes de onda de 260 y 280 nm en un espectrofotómetro específico (Nanodrop, Thermo Scientific). Si el cociente obtenido

se encuentra entre 1,9 y 2,2, el ARN será de calidad y por tanto está en condiciones óptimas para ser utilizado. Un cociente de 2,0 se traduce en un ARN puro, mientras que un cociente menor o igual a 1,8 implica que el ARN esté contaminado bien por ADN, o bien por proteínas y/o polifenoles.

4.2.6.3. Síntesis del ADN codificante

Una vez extraído el ARNm de calidad, debemos realizar una transcripción inversa para obtener el ADN codificante, y poder así realizar la PCR cuantitativa.

Para ello, se utiliza un kit comercial, First Strand cDNA Synthesis kit. Previo al uso del kit, las muestras deben ser cuantificadas en el espectrofotómetro. Posteriormente se prepara cada condición en un eppendorf. A continuación adjunto la tabla que incluirá todos los compuestos utilizados (**Tabla 14**).

SINTESIS DE ADN CODIFICANTE (KIT NZY)	
Compuestos	Volumen
Master mix (dNTPs, MgCl ₂ , Taq polimerasa, agua libre de Rnasas y tampón de pH)	10 µl
Enzima retrotranscriptasa	2 µl
Muestra de RNAm	Hasta 5 µg
Agua libre de Rnasas	Completar hasta 20 µl

Tabla 14. Kit de retrotranscripción

A continuación, insertaremos las muestras en el termociclador con la secuencia que aparece en la siguiente ilustración.

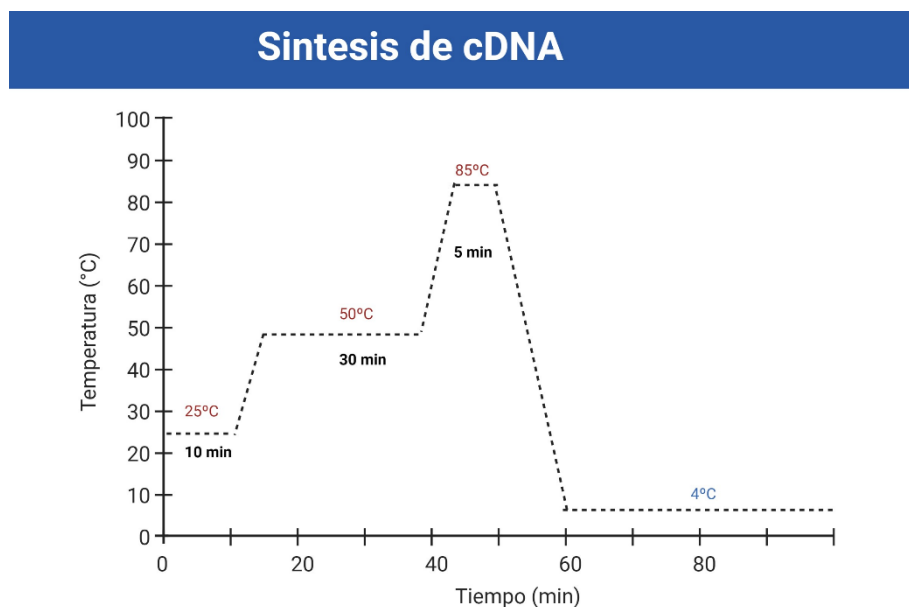


Ilustración 11. Condiciones del termociclador.

Finalmente añadiremos 1 μL de ARNasa a las muestras de la PCR resultante.

Para comprobar que el ADN codificante es de calidad, debemos realizar, al igual que se hizo con el ARNm, mediciones en el nanodrop, en este caso el cociente de la absorbancia será de 260 y 230 nm. Si el cociente entre estas dos absorbancias se encuentra entre 1,8 y 2,2 el ADN se puede considerar puro. Si este está cerca de 1,8, la muestra es de buena calidad, sin embargo valores inferiores a 1,8 indican contaminación proteica de la muestra.

4.2.6.4. PCR cuantitativa

Una vez constituido y diluido el ADN codificante a nos dispondremos a estudiar los genes de interés, mediante qPCR.

Utilizaremos una placa de 96 pocillos específica REF, donde realizan las mediciones por triplicado. Cada pocillo se preparará con la siguiente mezcla:

MUESTRAS qPCR	
Compuestos	Volumen/pocillo
ROX Low	1 μl
Cebador Sentido (del inglés "Forward" (Fw))	0.25 μl
Cebador Anti-sentido (del inglés "Reverse" (Rw))	0.25 μl
SYBR Green 2X	5 μl
Muestra de cDNA (10ng/ μl)	1 μl
Agua libre de Rnasas	3,3 μl

Tabla 15. Compuestos para la preparación de las muestras de qPCR

A continuación en la **Tabla 16** aparecen los cebadores sentido y anti-sentido de cada uno de los genes que hemos estudiado.

GEN	DIRECCIÓN	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA
CTSB	Sentido	5'-AGTGGAGAATGGCACACCCT-3'
	Antisentido	5'-AAGAAGCCATTGTACCCCA-3'
CTSC	Sentido	5'-CGCCTCCTGGTAATTCTC-3'
	Antisentido	5'-GTGGTCCCATAACCGAGCAG-3'
CTSD	Sentido	5'-GCGTCATCCCGGCTATAAG-3'
	Antisentido	5'-ATGGACGTGAACTTGTGCAG-3'
GAPDH	Sentido	5'-AGCCACATCGCTGAGACA-3'
	Antisentido	5'-GCCCAATACGACCAAATC-3'
LAMP1	Sentido	5'-AACTTCTCTGCTGCCTTCTC-3'
	Antisentido	5'-GAGTGAGTGTATGCCTCTT-3'
LAMP2	Sentido	5'-TGCTGGCTACCATGGGGCTG-3'
	Antisentido	5'-GCAGCTGCCTGTGGAGTGAG-3'
LONP-1	Sentido	5'-ATGGAGGACGTCAAGAAACG-3'
	Antisentido	5'-GATCTCAGCCACGTCAGTCA-3'
MFN1	Sentido	5'-ACCGAGGAGGTGGCAAACAAA-3'
	Antisentido	5'-GCTGGGTCTGAAGCACTAAGG-3'
MFN2	Sentido	5'-GGTGCTCAACGCCAGGATTCA-3'
	Antisentido	5'-TGCCGCTCTTCACGCATTCC-3'
TFEB	Sentido	5'-GGTGCAGTCCTACCTGGAGA-3'
	Antisentido	5'-GTGGGCAGCAAAGTTCC-3'

Tabla 16. Primers sentido y antisentido utilizados.

Para llevar a cabo la amplificación de la región codificante para ambas regiones genómicas, se utiliza un equipo de PCR a tiempo real (7500 de Applied Biosystems). Una vez introducidas las muestras preparadas (**Tabla 16**) se utilizarán unas condiciones de trabajo que se detallan en la **figura 7**. Para poder comparar y analizar resultados es imprescindible la utilización de un control endógeno. Los controles endógenos utilizados en nuestro caso fueron el gen del gliceraldehído3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), y/o bien el gen de la B-Actina, ambos controles permanecen estables de acuerdo con el tipo celular utilizado.

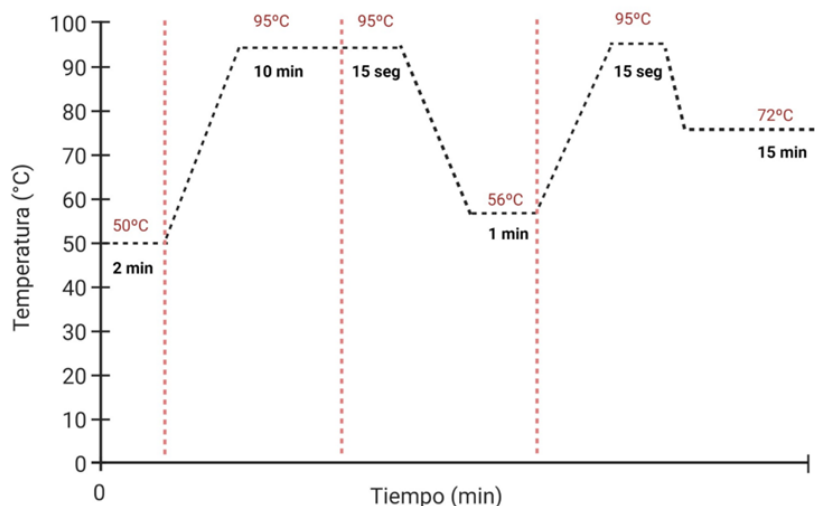


Ilustración 12. Condiciones qPCR a tiempo real en 7500

4.2.7 Microscopia de fluorescencia y marcajes celulares

Para poder visualizar las diferentes proteínas y/o marcadores de los distintos orgánulos celulares, utilizamos la microscopia óptica de fluorescencia, se trata de un fenómeno físico muy utilizado en biología celular, principalmente por su alta sensibilidad y especificidad.

Durante la tesis doctoral los ensayos de inmunofluorescencia (IF) fueron elaborados tanto en placas de 96 pocillos, como en placas de 24 pocillos con lamelas.

Para la microscopia en placa de 24 pocillos con lamelas, la adición de las lamelas en el interior de los pocillos se ha realizar antes de la siembra. Incorporadas las lamelas, se lavan con PBS 1X y se desinfectan con rayos UV durante 5 min, por último se aspira la placa y se deja preparada para la siembra de las células. En medio normal, con un volumen de 500 µl por pocillo y a la concentración correspondiente, de acuerdo con el tipo celular utilizado, se realiza la siembra celular, 24 horas más tarde, realizamos el tratamiento (4 o 24h), para su posterior recogida y procesamiento.

En caso de utilizar placa de 96 pocillos, se sembrarán las células directamente añadiendo 100 µl/pocillo a la concentración correspondiente según el tipo celular. Tras 24 horas se realizan los tratamientos oportunos (4- 24 h).

A continuación se detallan los pasos a seguir para llevar a cabo la IF:

Previo a la fijación se administran aquellos marcajes que queramos observar in vivo. Una vez finalizado el tratamiento, se retira el medio con los tratamientos y se añade medio fresco adicionado con el marcaje que queremos observar, a una concentración y durante un tiempo determinado (**Tabla 17**). Transcurrido el tiempo de incubación del marcaje, eliminamos el medio y lavamos con PBS 1X 2-3 veces. A continuación se procede a la fijación celular.

MARCAJE IN VIVO			
Marcaje	Concentración final	Tº	Casa comercial
Lysotracker (LTR) Red	500 nM	15'	Invitrogen (L7528)
Mitosox	1 µM	15'	Invitrogen (M36008)

Tabla 17. Tipos de marcajes in vivo.

Fijación celular: El primer paso tras ser tratadas si no se va a realizar un marcaje in vivo es la fijación, para ello las células se deben lavar con PBS 1X (2-3 veces), antes y después de fijarse con PFA al 4 % en PBS 1X durante 20 o 30 min a temperatura ambiente. Podremos preparar PFA 4% con Hoechst 1/10.000, un intercalante nuclear que nos permite observar y cuantificar este orgánulo.

Permeabilización y bloqueo: Cuando queramos realizar el marcaje de una proteína específica con un anticuerpo, deberemos facilitar la entrada del anticuerpo específico de reconocimiento de la proteína de estudio, a través de la membrana citoplasmática, para ello utilizaremos un detergente capaz de permeabilizar la misma. Esta permeabilización se puede realizar usando diferentes detergentes (Tritón, SDS, o Saponina). El Tritón X-100 se utiliza a una concentración de 0.1% diluido en PBS 1X durante 5 min, a continuación se han de bloquear los sitios inespecíficos de unión con BSA 1ml/ml en PBS 1X durante 20 min, o bien permeabilizar y bloquear en un mismo paso con Saponina 0.01% en BSA 1ml/ml durante 1h. Entre todos y cada uno de los pasos se lavará con PBS 1X para quitar el excedente de cada reactivo.

Incubación de anticuerpos: Tras el último lavado con PBS 1X, en caso tener que añadir anticuerpos primarios, estos se hacen diluidos en BSA 1 mg/ml a una concentración y tiempo de incubación necesario según el anticuerpo utilizado (tabla 20). Todas las incubaciones se realizan en un ambiente de humedad y oscuridad. Transcurrido el tiempo de incubación se deben realizar 2-3 lavados con PBS 1X y añadir el anticuerpo secundario específico, de nuevo diluido en BSA 1mg/ml a la concentración y tiempos correspondientes (**Tabla 18**).

Anticuerpos IF							
Anticuerpo 1°	Casa Comercial	∅	Incubación		Anticuerpo 2°	∅	Incubación
LAMP1	Abcam (ab24170)	1:250	1h	Policlonal	Alexa Fluor Anti-rabbit (11034)	1:500	30 min
P62	Abnova (H00008878-M01)	1:250 1500	1h overnight	Monoclonal	Alexa Fluor Anti-mouse (11004)	1:500	30 min
TOMM-20	Santa Cruz (sc17764)	1:250	1h	Monoclonal	Alexa Fluor Anti-mouse (11004)	1:500	30 min
TFAM	Invitrogen #PA5-29571	1:50	1h	Policlonal	Alexa Fluor Anti-mouse (11004)	1:200	30 min
ADNm	PROGEN 61014	1:50	1h	Monoclonal I	Alexa Fluor Anti-rabbit (11034)	1:200	30 min

Tabla 18. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Inmunofluorescencia

El último paso antes de la visualización al microscopio y posterior análisis será el lavado con PBS 1X. En el caso de la placa de 24 pocillos, se realiza el montaje de las lamelas con pegamento (Fluoromont-G) en los portaobjetos, y se dejan secando 24 h antes de su procesamiento en el microscopio óptico invertido de fluorescencia (Olympus IX-51). La captura de imágenes es realizada con una cámara fotográfica (Olympus DP70).

Análisis de resultados: Para la evaluación de los resultados obtenidos, se cuentan al menos 200 células por cada condición, utilizando el software de análisis ImageJ.

4.2.8 Microscopia electrónica

Para determinar si los tratamientos con los cascabellos alteran o no los distintos orgánulos o compartimentos celulares. A nivel ultraestructural se realiza un estudio mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) en las SH-SY5Y procedentes de neuroblastoma humano tratados con los extractos.

Para poder realizar este experimento, es necesario un gran contenido celular, por ello se siembra una placa de 6 pocillos por condición, a una concentración de 100.000 células/ml. Una vez sembradas las células, son tratadas durante 4

horas con sus respectivos tratamientos, por último se realiza la recogida y procesamiento de estas.

Para la recogida y el procesamiento de las muestras se siguen los siguientes pasos:

En primer lugar, el medio en el que las células son tratadas es retirado y eliminado, posteriormente se han de realizar 3 lavados con PBS 1X, y a continuación se añaden 150 µl de tripsina/pocillo que dejamos actuar 5 min a temperatura ambiente. La tripsina de los 6 pocillos es recogida en un mismo eppendorf de 2 ml previamente rotulado, donde con anterioridad se ha añadido 1 ml de medio fresco nuevo. A continuación centrifugamos a 1200 rpm 5 min a 4°C. Se retira el sobrenadante con mucho cuidado y se le añaden 300 µl de glutaraldehído al 2,5 %, que se incuba durante 2 horas a 4°C. Se repite la centrifugación con las mismas condiciones y se retira de nuevo el sobrenadante con cuidado. Añadimos 300 µl de cacodilato 0.1M a pH 7.4 e incubamos 5 min a 4°C, este paso se realiza suavemente pues no nos interesa que el pellet se despreque, a continuación se centrifuga a 1200 rpm 4 min a 4°C, finalmente repetimos este paso en dos ocasiones más, desde la adición de cacodilato, sin realizar la última centrifugación.

Las muestras son procesadas y enviadas para su análisis al Servicio de microscopía del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla

4.2.9 Técnica de MTT

Este ensayo, consiste en un ensayo colorimétrico que se utiliza para determinar el número de células vivas. El ensayo de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio) se basa en la conversión, del MTT a cristales de formazán. De acuerdo con esto, la cantidad de formazán formada será proporcional al número de células viables o bien, a la capacidad mitocondrial de estas células de convertir el MTT en un precipitado de formazán insoluble, mediante la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, en particular de la succinato deshidrogenasa, presente en la cadena de transporte mitocondrial, además de otras reductasas citosólicas o de otros compartimentos celulares, que serán responsables de la formación de las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH)

que a su vez convertirán el MTT a cristales de formazán insolubles en medio acuoso pero soluble en isopropanol ácido. (Supino, 1995)

Para llevar a cabo la técnica, se siembra y se trata una placa de 96 pocillos, (cada condición por triplicado), posteriormente, transcurrido el tiempo de tratamiento, se añaden 10 µl/ pocillo de MTT (5 mg/ml) diluido en PBS 1X (**Tabla 15**) y a continuación, se introducen las células en el incubador a 37 °C, en atmósfera de CO₂ y durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se retira el medio y el formazán precipitado se disuelve con una solución ácida de isopropanol puro.

Para determinar la cantidad de formazán presente en la muestra, se mide la absorbancia a 570 nm (TECAN INFINITE M NANO⁺). Los resultados obtenidos se expresan como porcentaje de viabilidad celular, respecto al grupo control, el cual se establece como el 100 %.

4.2.10 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología unicelular que mide la dispersión de la luz y la fluorescencia con el fin de determinar ciertas propiedades celulares como el tamaño, el estado organelar o bien determinar el número de células vivas mediante marcaje celular. (Robinson, 2022)

Los marcajes se realizan con fluorocromos que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda, esto permite que las células se puedan marcar con diferentes fluorocromos a la vez, obteniéndose así más información con un solo experimento. Además permiten identificar diferentes subconjuntos fenotípicos e incluso aislar una única célula en suspensión.

Se utilizaron dos modelos para el análisis por citometría de flujo, en primer lugar el citómetro de Cytomics FC 500 de Beckman and Coulter, y en segundo lugar el citómetro de Cytoflex Beckman Coulter Life Sciences.

A continuación detalla el protocolo utilizado durante esta técnica:

1. Siembra celular en placa de 6 pocillos, donde se destinan 3 pocillos a cada condición.
2. A continuación se lleva a cabo el marcaje celular con aquellos marcajes que requieren preincubación, se añaden entre 15-30 min previo a la adición de los tratamientos para que puedan ser evaluados posteriormente.

De tal modo que, antes de añadir el tratamiento seleccionado se aspira la placa y se añade medio fresco preparado con el marcaje a la concentración requerida. Una vez finalizado y previa a la adición de los tratamientos, se retira el medio y se realizan dos lavados con PBS 1X.

3. Seguidamente se realizan los tratamientos y se dejan en el incubador el tiempo necesario (4-24h).
4. Recogemos las células con tripsina 1X, recogiendo el medio de los 3 pocillos/condición en un falcón de 15ml, centrifugamos a 1200 rpm durante 12 min y eliminamos el sobrenadante.
5. Resuspendemos el pellet de cada falcón con 300 µl de medio fresco, adicionado con el marcaje a las dosis indicadas (**Tabla 19**).
6. Por último se reparten los 300 µl en 3 pocillos de una placa de 96, y se lleva a cabo el procesamiento de esta en el citómetro.

A continuación en la siguiente tabla se muestra cada marcaje utilizado, con las concentraciones y los tiempos de incubación usados.

MARCAJE IN VIVO				
Marcaje	Concentración final	T°	Tª	Casa comercial
Anexina V FITC	1X		37°C	
Cell ROS	2,5 µM		37°C	
Ioduro de Propidio (IP)		15'	37°C	
Lysotracker (LTR) Red	500 nM	15'	37°C	Invitrogen (L7528)
Mitsox red	2,5 µM	15'	37°C	Invitrogen (M36008)
Mitotracker Green (MTG)	100nM	15'pretratamiento 15'postratamiento)	37°C	
TMRM	50nM	15'	37°C	

Tabla 19. Marcajes in vivo utilizados en Citometría de flujo

Anexina V FITC: La anexina V, también denominada anticoagulante vascular humana, es una proteína que posee una alta afinidad, dependiente de Ca^{2+} , por la fosfatidilserina (PS). En condiciones normales la PS se encuentra en el interior de la membrana plasmática (a nivel citosólico). Cuando la célula sufre apoptosis la PS migra al exterior de la membrana y es reconocida y marcada por la anexina V FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) mediante fluorescencia verde, de tal manera que a mayor cuantificación de verde mayor porcentaje de muerte celular (Vermes et al., 1995)

Ioduro de propidio: El ioduro de propidio (IP, Sigma P4170) es un fluoróforo que no es capaz de atravesar la membrana plasmática, por lo que solo será capaz de teñir aquellas células que presenten un defecto en su membrana. Dentro de la célula, el IP actúa como un agente intercalante de ácidos nucleicos, y aumenta de 20 a 30 veces su fluorescencia cuando está unido a ellos.

Lysotracker red (LTR): Fluoróforo que se une selectivamente a los orgánulos acídicos, y que atraviesa fácilmente las membranas celulares. Se trata de una tinción útil para la detección de la masa lisosomal en poblaciones y subpoblaciones celulares.

MitosoX red: Es un detector rápido y sencillo, muy específico de estrés mitocondrial, en células vivas, generado por especies reactivas de oxígeno (ROS). Este colorante fluorogénico es muy selectivo, pues solo puede ser oxidado por el superóxido mitocondrial, esta oxidación da lugar a un producto rojo altamente fluorescente.

Por tanto, utilizaremos este marcaje para evidenciar el estrés mitocondrial generado y/o revertido tras la adición de los cascabullos.

Mitotracker Green (MTG): Marcador capaz de teñir mitocondrias de células vivas. Para etiquetar las mitocondrias, el MTG difunde pasivamente a través de la membrana plasmática y se acumula en las mitocondrias activas.

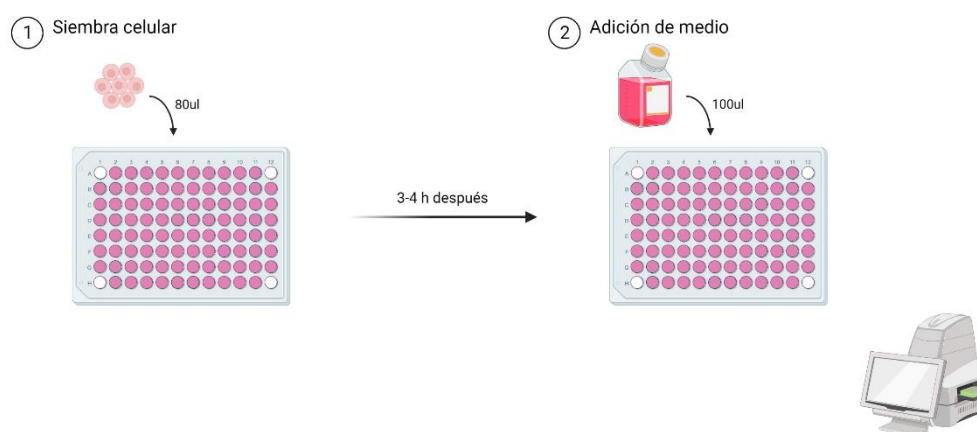
4.2.11 Análisis de flujo metabólico (Seahorse)

Para realizar el análisis del flujo metabólico se utilizó el analizador Agilent Seahorse XFe96, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Este se empleó para la determinación del estado de la respiración mitocondrial, tanto en fibroblastos humanos, como en células SH-SY5Y. Para la determinación del estado de la respiración mitocondrial se estudiaron las variaciones de la tasa de consumo de oxígeno (OCR, pmol O₂/min, del inglés "Oxygen consumption rate"), y del pH (ECAR, mpH/min del inglés "ExtraCellular Acidification Rate"). En este equipo existen numerosos sensores capaces de medir estos parámetros en espacios y volúmenes muy pequeños, además, está permitida la adición programada de distintos compuestos que se inyectan de forma secuencial en los pocillos y que permiten estudiar diferentes estados metabólicos.

4.2.11.1 Siembra en placa y preparación del cartucho del sensor

La confluencia celular óptima de la siembra se estableció según el tipo celular. De tal modo que, para los fibroblastos humanos (Co y G2019S) se estableció una confluencia óptima de siembra de 20.000 cél/pocillo, mientras que, para las SH-SY5Y se utilizaron 15.000 cél/pocillo. Es imprescindible que antes de realizar cualquier siembra, se compruebe que las células que se van a utilizar tienen una alta viabilidad, y que no llevan en cultivo más de 3 semanas pues observamos que un aumento excesivo del número de pases puede interferir en los resultados finales obtenidos.

Las células se siembran en toda la placa, excepto en los pocillos de las 4 esquinas (estos nos servirán como controles), con un volumen de 80 μ L de medio. Si las células se siembran a primera hora de la mañana, se les añadirá 100 μ L más



de medio fresco DMEM, una vez que las células estén adheridas (3-4 h después de la siembra aproximadamente) para evitar la deshidratación celular por evaporación del medio.

Ilustración 13. Protocolo de Siembra celular para análisis metabólico mediante seahorse.

A continuación se hidratará el cartucho. La hidratación de este se puede realizar el día antes de la medición, con 200 μ L de agua destilada miliQ, y al día siguiente, 1 hora antes de la misma, añadirle 200 μ L de la solución calibradora (XF Calibrant), o bien realizar la hidratación directamente 1h antes de la medición. El tampón calibrador debe actuar durante al menos 1 h precalentado y no más de 24 h. Tanto si añadimos agua destilada como la solución de

calibración directamente, el cartucho ha de mantenerse en una estufa a 37°C, sin CO₂, hasta el momento de la preparación del kit, carga de este en el cartucho, y puesta en marcha y calibración del aparato.

Por último se enciende el analizador XFe96, el ordenador y el software (Wave). Estos dos últimos los dejaremos encendidos hasta que se alcance la temperatura óptima (37°C), una vez alcanzada la temperatura, podremos apagarlos y dejar encendido el aparato para poder utilizarlo al día siguiente.

4.2.11.2 Tratamiento

El segundo día se preparan y se adicionan los tratamientos a razón de 100 µL / pocillo en el medio DMEM que corresponda, según el tipo celular. Además, se prepara un falcón con 45 ml de medio seahorse (XF DMEM (103575-100, Agilent) (**Tabla 21**), y se deja en el baño termostático a 37°C.

MEDIO SEAHORSE		
Compuestos	Concentración final	Volumen (ml)
Medio DMEM XF (sin rojo fenol)	-	39,55
Glutamina 200mM	2mM	0,45
Sodio piruvato 200mM	1mM	0,45
Glucosa 100mM	10mM	4,5

Tabla 20. Componentes del medio seahorse.

Este medio se utilizará para reemplazar el medio con el que hemos realizado los tratamientos previamente (con rojo fenol). El reemplazo se realiza 1 h antes de la finalización de la incubación con estos, es decir, cuando realizamos un tratamiento de 4 h, pasadas 3 h desde su incorporación, retiramos el medio de los tratamientos de la placa, realizamos un lavado con 120 µL de medio XF DMEM (sin rojo fenol), y por último retiramos el lavado y añadimos de nuevo los mismos tratamientos con 180 µL de medio XF DMEM.

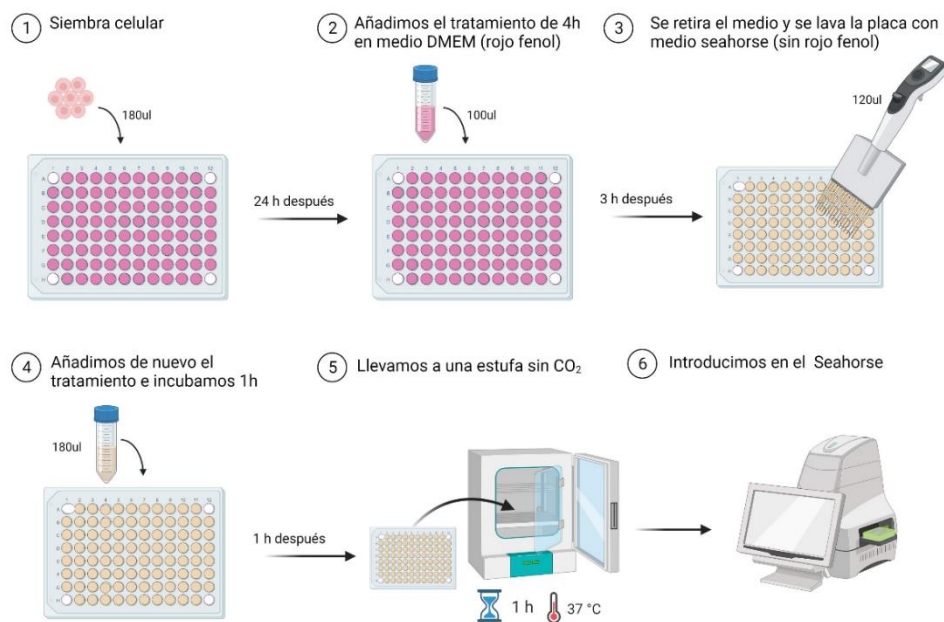


Ilustración 14. Procedimiento para el análisis metabólico mediante seahorse

4.2.11.3 Kits comerciales

Existen diferentes kits comerciales que permiten analizar la modulación de la respiración mitocondrial y la glicolisis mediante la inyección de determinados compuestos. Cada kit tiene bien establecido el efecto de cada uno de sus compuestos sobre el OCR y el ECAR, por tanto, las variaciones de estos en función de los diferentes tratamientos o mutaciones celulares permitirá conocer de manera altamente fiable si existe o no modulación de la respiración mitocondrial.

4.2.11.3.1 Kit Mito Stress

Este kit es capaz de determinar parámetros relativos a la actividad mitocondrial de células en cultivo, a través de la medición de variaciones en la tasa de consumo de oxígeno, para ello, utiliza 4 compuestos que provocan cambios en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. **(Tabla 21)**.

XF CELL KIT MITO STRESS			
Compuestos	Puerto	Volumen/puerto	Concentración final
Oligomicina	A	20 µl	1 µM
FCCP	B	22 µl	2 µM
Rotenona/Antimicina	C	25 µl	0,5 µM

Tabla 21. Compuestos Kit Mitro Stress

Secuencialmente, se utilizan en el siguiente orden; en primer lugar se utiliza la oligomicina (1 µM), ésta inhibe el complejo V (ATP-sintasa) de la cadena de transporte mitocondrial, provocando una caída del OCR al bloquear el transporte de protones hacia la matriz mitocondrial y en consecuencia la producción de ATP mitocondrial. Posteriormente se inyecta FCCP (del inglés "Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone") (2 µM), este es un protonóforo que permite el paso de protones hacia el espacio intermembrana mitocondrial independientemente de la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, induciendo así el aumento OCR al máximo. En último lugar se inyecta rotenona/antimicina A (ambas a 0,5 µM). La rotenona actúa bloqueando el complejo I mitocondrial y la Antimicina A bloquea el complejo III mitocondrial, la combinación de ambas bloquea por completo la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial al impedir el paso de protones al espacio intermembrana, provocando la disminución total del OCR, a excepción de aquel que se produzca por procesos de "respiración no mitocondrial".

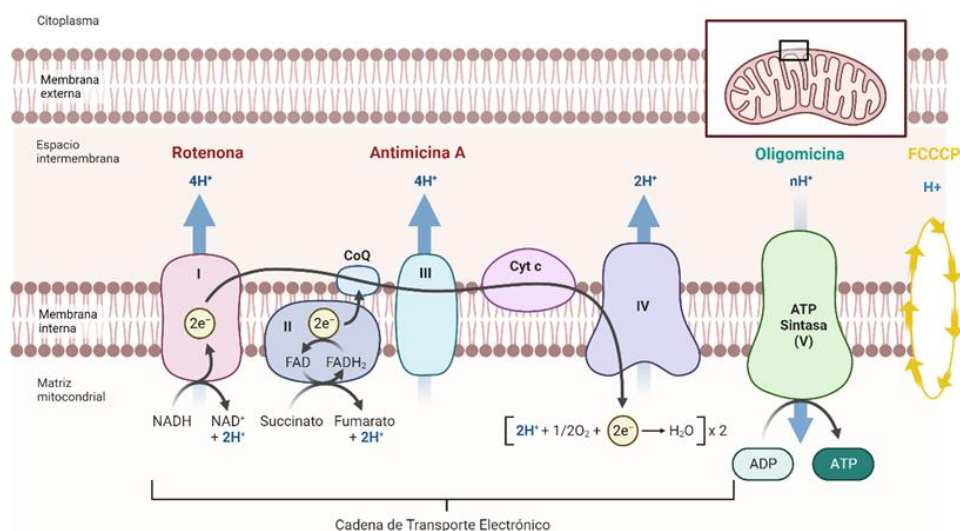


Ilustración 15. Cadena de transporte mitocondrial. Created with BioRender.com

4.2.12 Determinación de la degradación de proteínas de larga vida.

Normas de seguridad

Debido a que en esta técnica se trabaja con un compuesto radioactivo, se deben evitar los riesgos de contaminación. Para ello debemos adoptar medidas de seguridad específicas tanto en la manipulación de los residuos, como en la gestión de estos. Aunque la actividad del compuesto utilizado no es muy alta, conviene utilizar doble guante, a ser posible, que cubra las mangas de la bata, uso de campana extractora de gases y gafas protectoras de metacrilato. Todas estas medidas han sido monitorizadas y validadas por el Servicio de Protección Radiológica del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura (SAIUEX), servicio donde se han realizado las determinaciones.

Para llevar a cabo la determinación de la degradación de proteínas de vida media larga se utilizó valina marcada con el isótopo radiactivo ^{14}C (0,2 mCi/mL). Este precursor se utilizó sobre la línea celular SH-SY5Y.

Las SH-SY5Y fueron sembrados en placas de 6 pocillos, con medio DMEM completo, a razón de 3 pocillos/condición. Tras 24 h, se deben aspirar las placas y posteriormente añadirles 1 ml/pocillo de L- ^{14}C -Valina al 0,5 $\mu\text{l/ml}$ diluido en medio DMEM, para, a continuación, dejar en el incubador a 37°C, en atmósfera de CO_2 , durante otras 24 h. Al día siguiente eliminamos la cantidad de radioisótopo que no ha sido incorporado mediante 3 lavados de PBS 1X. Posteriormente las células serán incubadas en medio DMEM completo en presencia de 10 mM de L-valina a 37°C durante 1 h. Tras este paso, eliminamos el medio de las placas y añadimos los tratamientos diluidos en medio completo con L-valina a 10 mM, durante 4 h a 37 °C. A partir de este punto se trabaja con tres fracciones, fracción celular (**Rc**) adherida a la placa, fracción suspendida en el medio (**Rs**) y fracción precipitada en el medio (**Rp**).

Tras la finalización de los tratamientos se recoge el medio de cada condición en un eppendorf llamado (**Rp**). A este medio se le añaden 100 μl de TCA (ácido tricloroacético) al 100 %, y se mantiene en agitación *overnight*, a 4 °C. Al día siguiente se centrifugan las muestras a 5206 rpm durante 20 min a 4 °C, a continuación el sobrenadante o fracción en suspensión (**Rs**) es trasvasado a un microtubo limpio denominado (**Rs**), donde se añadirá 1 ml de líquido de centelleo

previo a su análisis. El pellet obtenido tras la centrifugación es resuspendido en 500 µl de NaOH 0,2 M, para finalmente, obtener la fracción precipitada (**Rp**), a este último también deberemos añadirle 1 ml de líquido de centelleo previo al análisis.

Por otra parte para formar la **Rc**, las placas sin medio son congeladas a -80°C.

Una vez sacadas del congelador de -80°C, se lavan 3 veces con PBS 1X, tras eliminarlo, añadiremos 1 ml/pocillo de TCA frío al 10 % (vol/vol) que dejamos actuar durante 30 min a 4 °C, para así poder precipitar las proteínas marcadas. Posteriormente se reemplaza el TCA por 0,5 mL de NaOH 0,2 M que dejamos actuar durante 1 h a 37 °C, tiempo tras el cual se procede a la recogida celular en un microtubo nuevo en el que se ha obtenido la fracción celular (**Rc**). De nuevo, se añadirá 1 ml de líquido de centelleo, previo al análisis.

El análisis y medición de los resultados se lleva a cabo por el servicio de Protección Radiológica de la Universidad de Extremadura, que se encarga de mandarnos los resultados obtenidos en un periodo de 1 a 2 semanas.

El resultado obtenido por cada condición será referenciado a la concentración de proteína total que obtenemos en cada fracción y la proteólisis será expresada como % de degradación de proteínas con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Degradación } h^{-1} = \frac{Rs}{Rs + Rc + Rp}$$

4.3 Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se utiliza el programa GraphPad Prism 8, con el que se realiza el test no paramétrico *t student* o el test ANOVA de una o dos vías Tukey, indicando las diferencias significativas de la siguiente forma: *, p < 0,05 ; **, p<0.01; ***, p <0,001; ****, p < 0,0001.

Resultados

5.1 Caracterización de los extractos de cascabello verde y maduro.

Una vez obtenidos los extractos de cascabello según lo descrito en el apartado 1 del apartado 4.2.2 de *Materiales y Métodos*, **Tratamientos con cascabello maduro y verde**. Se analizaron las actividades antioxidantes y los compuestos bioactivos tanto de los extractos de cascabello verde, como de los extractos de cascabello maduro. (**Tabla 22**)

EXTRACTOS DE CASCABELLO MADURO								
	Agua		Etanol		Agua: Etanol 50:50		Agua: Etanol 30:70	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Compuestos bioactivos								
PHENOL	40,1	0,42	16,7	0,70	40,9	0,19	31,3	0,87
FLAV	10,7	0,77	2,0	0,72	10,0	0,81	5,8	0,98
DTOC	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,000
GTOC	0,080	0,014	1,044	0,132	0,048	0,007	0,409	0,035
ATOC	0,004	0,003	1,044	0,077	0,014	0,004	0,759	0,078
Actividades antioxidantes								
ABTS	57,1	5,11	18,7	4,01	60,4	1,74	39,7	3,06
FRAP 30	118,9	4,66	60,0	2,53	109,0	5,47	94,8	11,71
DPMD	5,8	0,27	6,0	0,08	8,6	0,34	6,3	0,16
DPPH INH	14,0	1,36	11,7	1,42	19,5	0,15	15,5	0,73
EXTRACTOS DE CASCABELLO VERDE								
	Agua		Etanol		Agua: Etanol 50:50		Agua: Etanol 30:70	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
Compuestos bioactivos								
PHENOL	43,1	0,77	39,7	0,98	48,5	0,70	47,1	0,85
FLAV	13,9	0,97	12,9	0,82	18,7	4,19	18,0	0,60
DTOC	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,001
GTOC	0,004	0,004	0,715	0,069	0,051	0,030	1,015	0,131
ATOC	0,006	0,003	1,438	0,124	0,030	0,007	1,287	0,155
Actividades antioxidantes								
ABTS	59,0	8,56	65,8	6,71	100,1	7,76	106,9	7,56

FRAP 30	174,7	25,05	171,4	23,18	210,3	24,90	219,4	22,41
DPMD	7,6	0,23	7,1	0,13	8,5	0,48	8,4	0,29
DPPH INH	32,2	0,36	23,3	1,34	29,1	0,29	30,6	1,23

Tabla 22. Caracterización de los extractos de cascabello de bellota verde y maduro. PHENOL: compuestos fenólicos totales (expresados como equivalentes de ácido gálico/muestra); FLAV: compuestos flavonoides totales (expresados como mg de catequina/muestra); TOC: tocoferol (expresado como $\mu\text{g/g}$ muestra, siendo D, delta, G, gamma y A, alfa. ABTS, DPMD y DPPH expresados como mg Trolox/g muestra); DPPH expresado como % de inhibición a 515nm. FRAP 30: Poder antioxidante reductor del hierro a los 30 min del ensayo.

Esta caracterización sirvió de base para realizar una normalización de los extractos, en sus diferentes estados de maduración, en función de su contenido en compuestos fenólicos totales (CFT) y en función a la actividad antirradical (ABTS), como se muestra en la **Figura 1**.

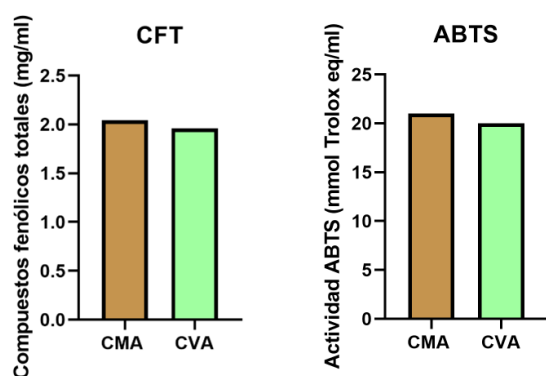


Figura 1. Normalización de los extractos de cascabello de bellota maduro (CMA) y verde (CVA). La normalización se realizó en función de la cantidad de compuestos fenólicos totales (CFT) y de la actividad antirradical (ABTS).

Una vez analizada la composición de los extractos de cascabello, se realizaron varios ensayos preliminares donde testamos la toxicidad que éstos presentaban eluidos en los diferentes solventes, y en varios modelos celulares (datos no mostrados). En base a esto, se han elegido para este estudio los extractos de cascabello de fracción acuosa, por no presentar toxicidad, a ninguna de las concentraciones usadas tal y como se muestra en la **Figura 2**.

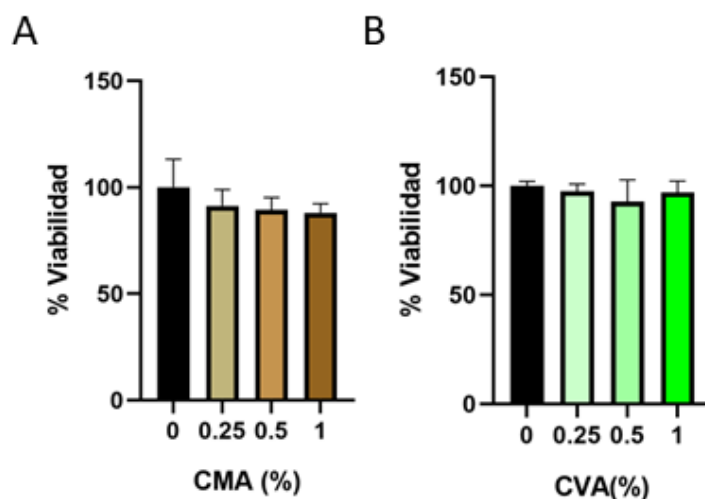


Figura 2. Determinación de viabilidad celular mediante ensayo por MTT. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se tratan con los extractos de cascabello en fracción acuosa maduro (CMA) y/o verde (CVA) durante 24 horas. Posteriormente, las células se tratan con MTT según se indica en Materiales y Métodos. La cantidad de formazán presente en la muestra se determina midiendo la absorbancia a 570 nm. (A) Muestra la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con CMA a diferentes concentraciones, considerándose el control (0) como 100% de viabilidad. (B) Muestra la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con CVA a diferentes concentraciones, considerándose el control (0) como 100% de viabilidad.

5.2 Determinación de la autofagia

5.2.1 Estudio del mecanismo de la respuesta autofágica inducida por los extractos de cascabello de bellota

Actualmente se ha descrito que entre los metabolitos resultantes de la digestión de los extractos de cascabello se encuentran los elagitaninos, Cantos et al., (2003). No obstante, los elagitaninos son un tipo de polifenol que tras ser ingeridos en la dieta necesitan ser digeridos por las bacterias intestinales para posteriormente producir ácido elágico o urolitinas. Dentro de las urolitinas, la urolitina A, se ha descrito como buen inductor de autofagia/mitogia (Ren & Zhang, 2018), por ello, se decidió realizar diferentes estudios en los que se investigó si los extractos de cúpula de bellota, independientemente de su estado de maduración, promovían la autofagia.

Para ello se decidió analizar en primer lugar los niveles de ácido ribonucleótido mensajero (ARNm) mediante qPCR. En el estudio de ARNm se analizaron múltiples genes que codifican para proteínas relacionadas con las diferentes etapas del flujo autofágico, desde la formación de la vacuola, hasta la degradación del contenido.

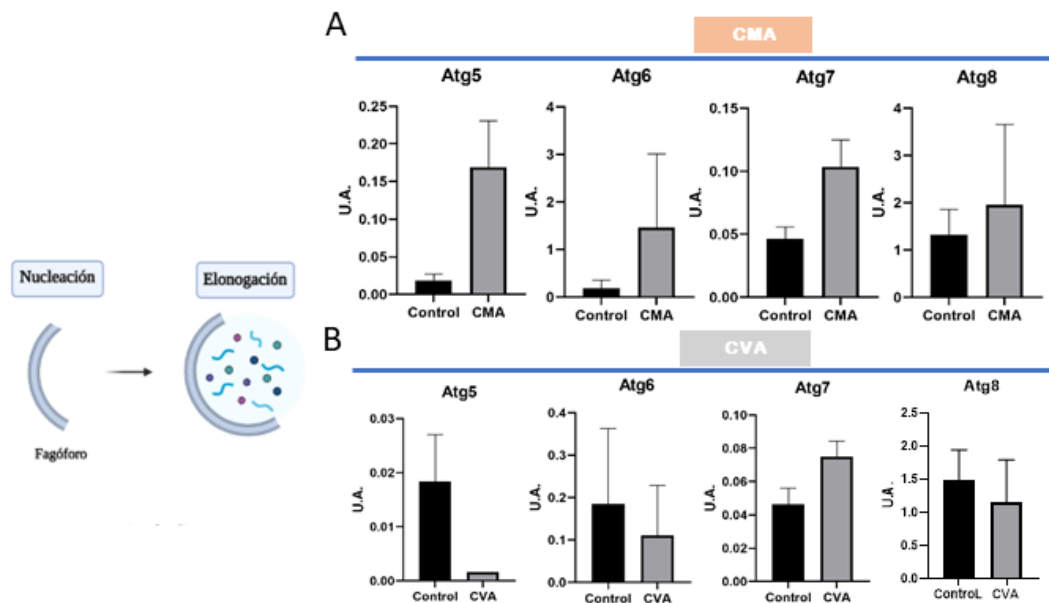


Figura 3. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la etapa de nucleación y elongación. A las células SH-SY5Y se les trató durante 4 horas con los diferentes extractos de cascabello maduro y verde (CMA y CVA). A continuación, se realizó una extracción de ARN genómico y se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para los genes Atg5, Atg6 (Beclina 1), Atg7 y Atg8 (LC3), de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. GAPDH fue utilizado como control endógeno de expresión génica. Los histogramas muestran la media de los niveles de expresión respecto a sus controles de carga de 3 experimentos independientes más su desviación típica.

Como se observa en la **Figura 3.A** los resultados de PCR a tiempo real, muestran que el tratamiento con CMA induce un aumento en los niveles de algunos de los genes implicados en la codificación de proteínas relacionadas con el inicio de la autofagia (Atgs). Sin embargo con el tratamiento de CVA (**Figura 3.B**), los datos obtenidos fueron más dispares, mostrando, en algunos casos, (salvo los obtenidos en Atg7), variaciones no significativas respecto al control (Atg6 y 8), o incluso por debajo de este (Atg5).

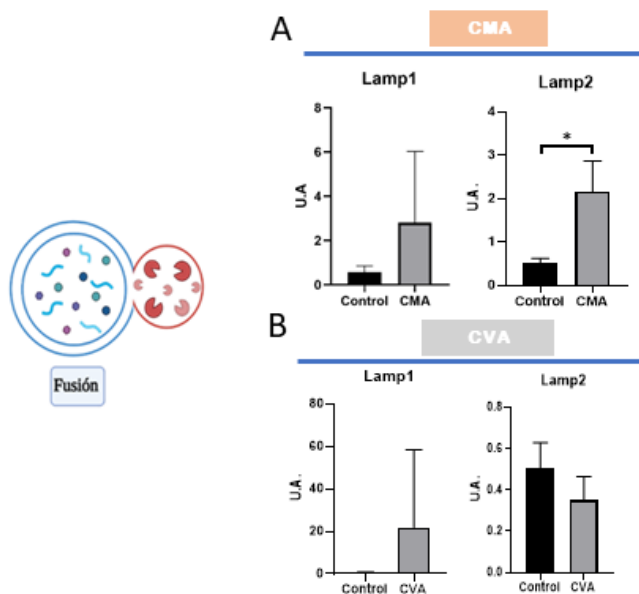


Figura 4. Expresión de los genes implicados en la etapa de fusión. Las SH-SY5Y se tratan durante 4 horas con los extractos de cascabello de bellota maduro y verde (CMA y CVA). A continuación, se realiza una extracción de ARN genómico y se realiza una PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) para los genes *Lamp1* y *Lamp2* de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. GAPDH fue utilizado como control endógeno de expresión génica. Los histogramas muestran la media de los niveles de expresión respecto a sus controles de carga de 3 experimentos independientes más su desviación típica. * Representa diferencias significativas entre líneas celulares estudiadas para un mismo gen (*, $p < 0.05$).

Los resultados muestran que en las células tratadas con CMA (**Figura 4.A**), hay un aumento de los niveles de mRNA de genes relacionados con la estructura de la membrana lisosomal (*Lamp1* y *Lamp2*), siendo el aumento de la expresión del gen que codifica para *Lamp2* significativa. Sin embargo, en el caso de las células tratadas con CVA (**Figura 4.B**), existen resultados distintos entre *LAMP1* y *Lamp2*, pues en el caso de *Lamp1* se puede observar al igual que en CMA un aumento de su expresión, sin embargo para el gen que codifica *LAMP2* se observa una disminución aunque no significativa (**Fig 4B**).

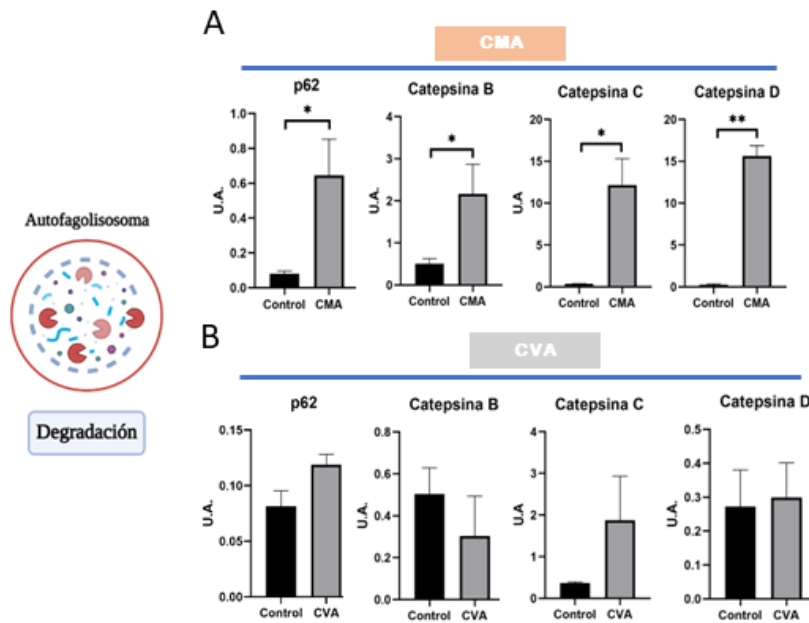


Figura 5. Caracterización de la expresión de los genes implicados en la etapa degradativa de la autofagia. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se tratan durante 4 horas con los extractos de cascabello maduro (CMA) y verde (CVA). A continuación, se realiza la extracción de ARN genómico y la PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), para los genes SQT1(p62), Catepsina B, Catepsina C y Catepsina D, de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. GAPDH fue utilizado como control endógeno de expresión génica. Los histogramas muestran la media de los niveles de expresión respecto a sus controles de carga de 3 experimentos independientes más su desviación típica. * Representa diferencias significativas entre líneas celulares estudiadas para un mismo gen (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Los resultados de la **Figura 5** muestran, para el tratamiento con CMA un aumento significativo de la expresión del gen implicado en la síntesis de la proteína p62, señalizadora del cargo a degradar, SQTMs(p62). En el tratamiento con CVA, se observa también una tendencia al alza en p62 pero en este caso no es significativa. Por otra parte, en aquellos genes que codifican las proteínas implicadas en la degradación del componente intravacuolar, como las catepsinas B, C y D, tras el tratamiento con CMA presentaron un aumento significativo respecto a su control (**Fig 5A**), mientras para el tratamiento de CVA los resultados obtenidos mostraron una tendencia al alza en Catepsina C y D pero no en el gen que codificaba para Catepsina B (**Fig 5B**).

Tras la confirmación mediante qPCR de que ambos extractos activaban la maquinaria, mediante RNAm de los genes implicados en autofagia, se decidió analizar mediante WB los niveles de las proteínas que son codificadas por estos genes en diferentes líneas celulares.

De esta manera, se analizó los niveles de las proteínas p62 y Lc3 tras el tratamiento de las células de neuroglioma humano H4 con CMA a diferentes concentraciones, en presencia o ausencia de Baf. A1, sustancia que bloquea la fusión de las vacuolas de autofagia con los lisosomas.

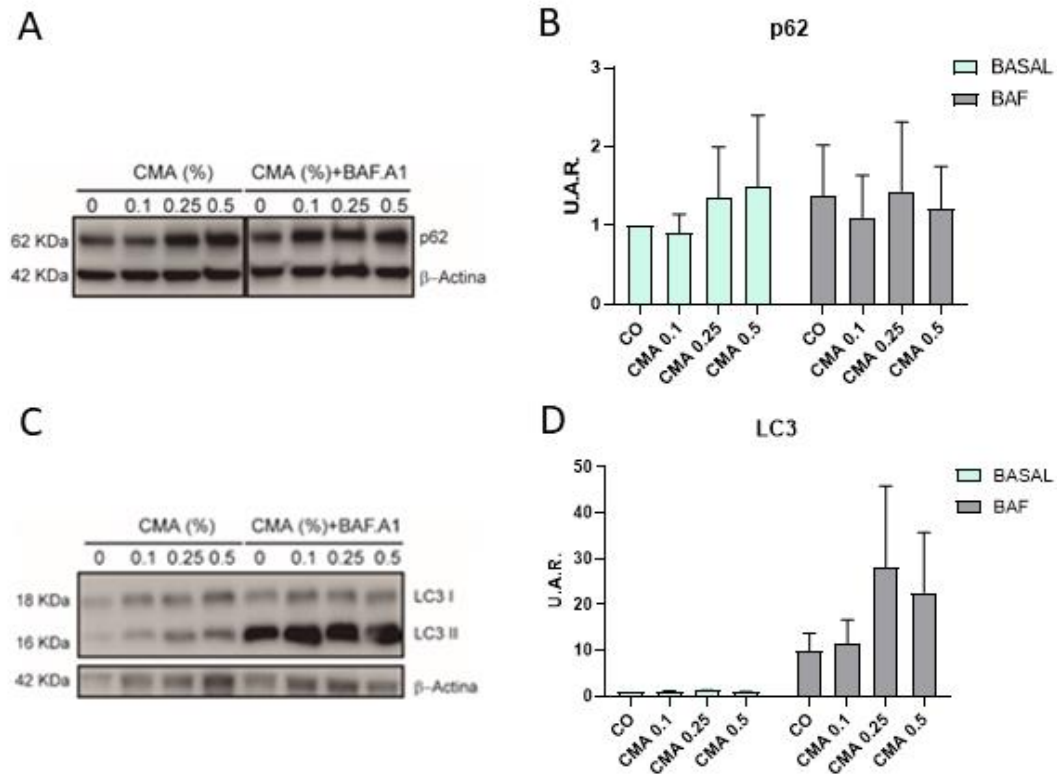


Figura 6. Flujo autofágico inducido por extractos de cascabello de bellota maduro. Las células H4 que expresan GFP-LC3 se mantuvieron en condiciones basales (0) o se trataron con extractos de cúpula de bellota maduro (CMA) a concentraciones ascendentes, desde 0.1% al 0.5%, durante 4 horas, solos o combinados con 100 μ M de bafilomicina A1 (Baf. A1). A, C Blots representativos de p62 y LC3 utilizando β actina como control de carga. (B, D) Análisis densitométrico de cada banda, expresado en unidades arbitrarias relativas de intensidad y correspondiente a la media \pm desviación de 3 experimentos independientes. La masa molecular esta expresada en kilodaltons (kDa)

Como se puede observar en la figura 6 (A, B), existe un aumento dosis dependiente de CMA de los niveles de p62 en ausencia de BAF. A1. Los niveles de LC3 basalmente no sufren cambios a las dosis estudiadas. No obstante existe un aumento considerable en presencia de Baf.A1 (Fig. 6 C y D)

Una vez estudiado el flujo autofágico con el tratamiento de CMA, decidimos realizar el mismo experimento con el tratamiento de CVA, pues como hemos mencionado, uno de los principales objetivos era comparar si el grado de maduración era relevante en los mecanismos estudiados.

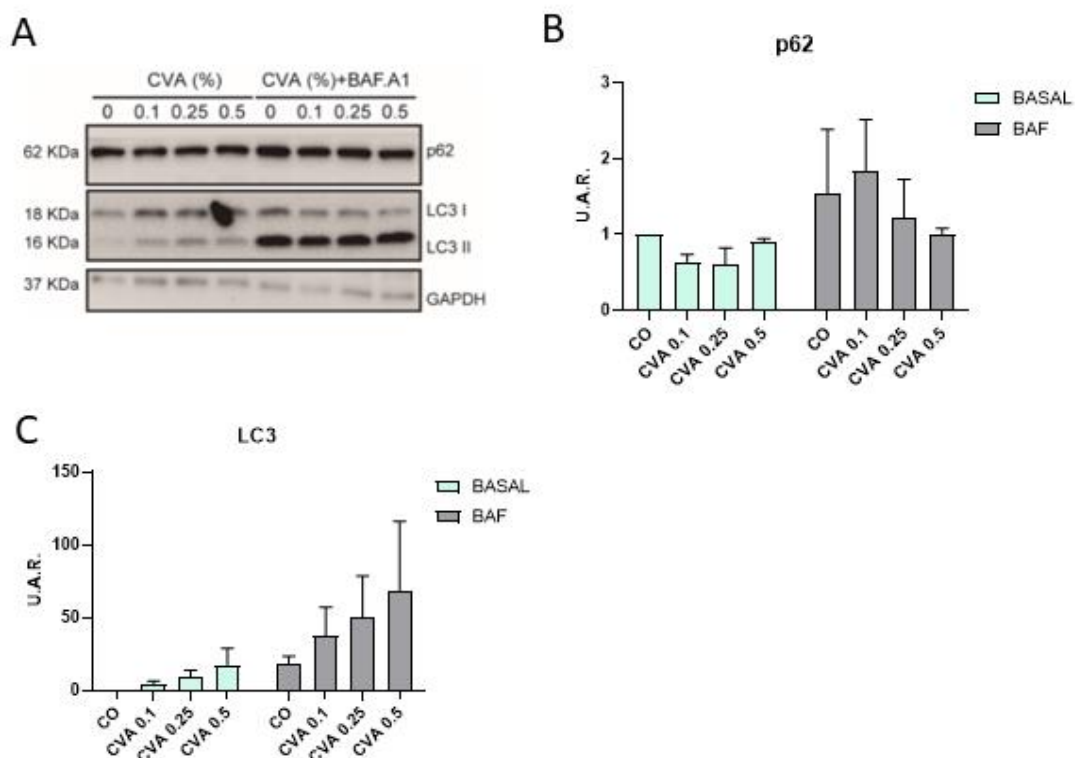


Figura 7. Flujo autofágico inducido por extractos de cascabello de bellota verde. Las células H4 que expresan GFP-LC3 se mantuvieron en condiciones basales (0) o se trataron con extractos de cúpula de bellota madura (CVA) a concentraciones ascendentes, desde 0.1% al 0.5%, durante 4 horas, solos o combinados con 100 μ M de bafilomicina A1 (Baf. A1.) A. Blots representativos de p62 y LC3 utilizando GAPDH como control de carga. (B, C) Análisis densitométrico de cada banda, expresado en unidades arbitrarias relativas de intensidad y correspondiente a la media \pm desviación de 3 experimentos independientes. La masa molecular esta expresada en kilodaltons (kDa)

Los datos mostrados con CVA (**Figura 7**), revelan que tanto basalmente, como tras el bloqueo autofágico con Baf.A1, LC3 II aumenta de manera dosis-dependiente (**Figura 7 A, C**). Los niveles de la proteína p62 son más variables (**Figura 7 A, B**), aunque sí se observa un aumento de ellos tras el tratamiento con Baf. A1, solo o en combinación con CVA.

Una vez estudiado el flujo autofágico dosis-dependiente, realizamos las determinaciones de los niveles de proteínas p62 y LC3 tras diferentes tiempos de exposición a los extractos en combinación o no con Baf.A1.

Los resultados obtenidos a continuación, corroboran los mostrados previamente (**Figura 6 y 7**), en los que se muestra que los extractos de cúpula de bellota, independientemente de su estado de maduración, promueven la formación de vacuolas de autofagia LC3 positivas.

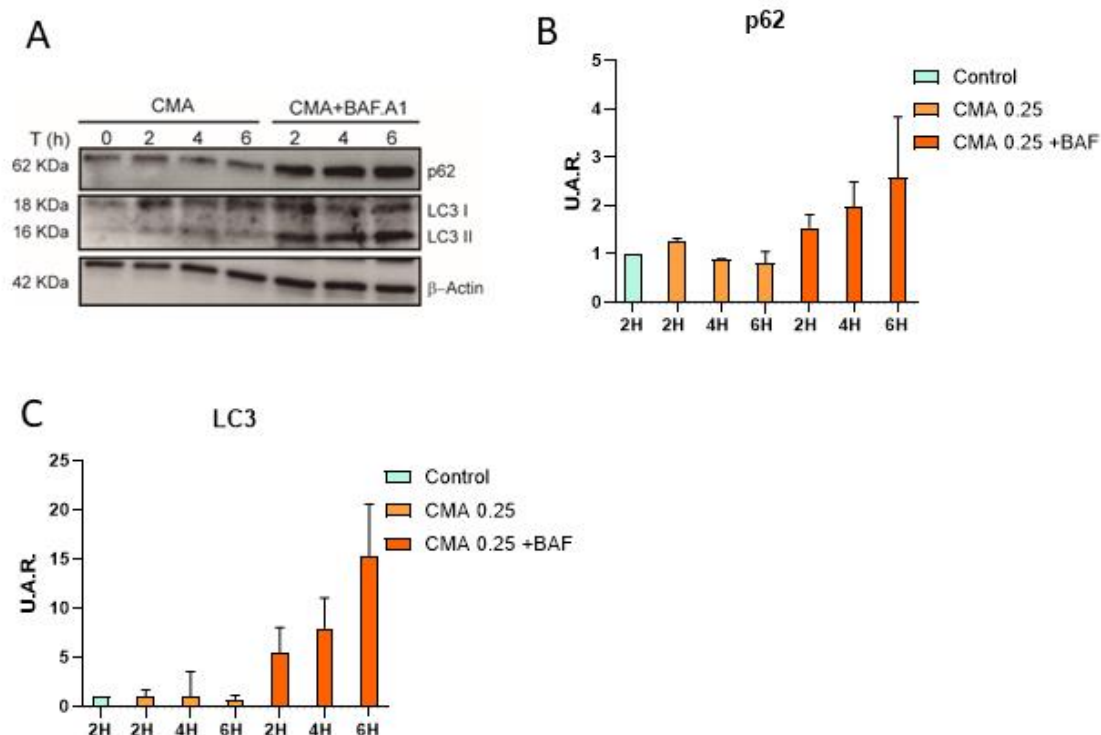


Figura 8. Flujo autofágico inducido por extractos de cascabello de bellota maduro. Las células H4 que expresan GFP-LC3 se mantuvieron en condiciones basales (0), o se trataron con extractos de cúpula de bellota madura (CMA) 0.25% a diferentes tiempos, desde 0 a 6 horas. A. Blots representativos de p62 y LC3 utilizando β -actina como control de carga. (B, C) Análisis densitométrico de cada banda, expresado en unidades arbitrarias relativas de intensidad y correspondiente a la media \pm desviación de 3 experimentos independientes. La masa molecular está expresada en kilodaltons (kDa)

En la **Figura 8** se observa cómo la isoforma II de la proteína LC3, en células tratadas con CMA experimenta un aumento progresivo dependiente del tiempo, este aumento se hace más evidente cuando se bloquea el mecanismo de autofagia con Baf.A1. De igual modo, el aumento de manera tiempo-dependiente de p62 se hace más evidente tras el bloqueo de la autofagia con Baf.A1.

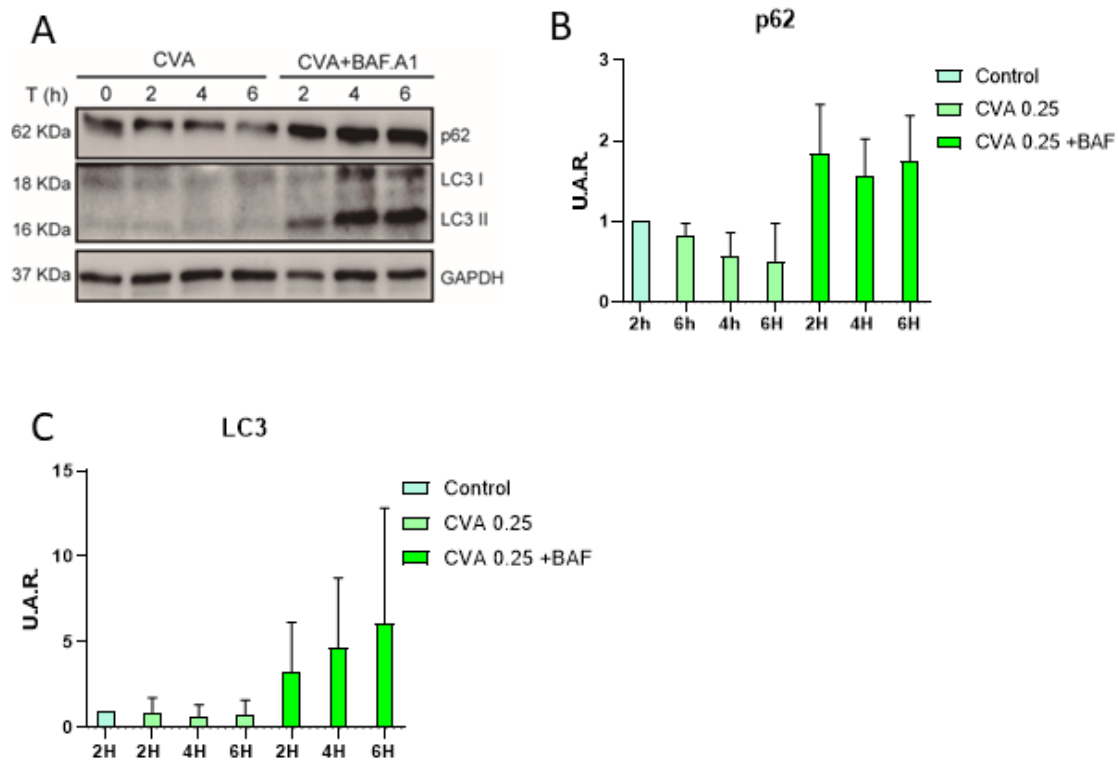


Figura 9. Flujo autofágico tiempo-dependiente inducido por extractos de cascabello de bellota verde. Las células H4 que expresan GFP-LC3 se mantuvieron en condiciones basales (0), o se trataron con extractos de cúpula de bellota verde (CVA) 0.25% a diferentes tiempos, desde 0 a 6 horas. A. Blots representativos de p62 y LC3 utilizando GAPDH como control de carga. (B, C) Análisis densitométrico de cada banda, expresado en unidades arbitrarias relativas de intensidad y correspondiente a la media \pm desviación de 3 experimentos independientes. La masa molecular esta expresada en kilodaltons (kDa)

Del mismo modo que con CMA al 0.25%, el tratamiento con CVA induce un aumento de la isoforma II de LC3 de manera tiempo-dependiente con o sin Baf.A1. Sin embargo en cuanto a los niveles de p62 se refiere, parece que el aumento que se experimenta tras el bloqueo con Baf.A1 no es dependiente del tiempo.

Una vez comprobado el aumento de la lipidación de la isoforma II de LC3, tras la exposición de la línea de neuroglioma humano H4 a los extractos de cascabello a diferentes tiempos y concentraciones, se realizó un análisis de los niveles de esta proteína en el SN de ratones (hembras y machos) ICR tratados durante 4 h con los extractos en presencia del inhibidor del flujo autofágico, leupeptina (**Figura 10 y 11**).

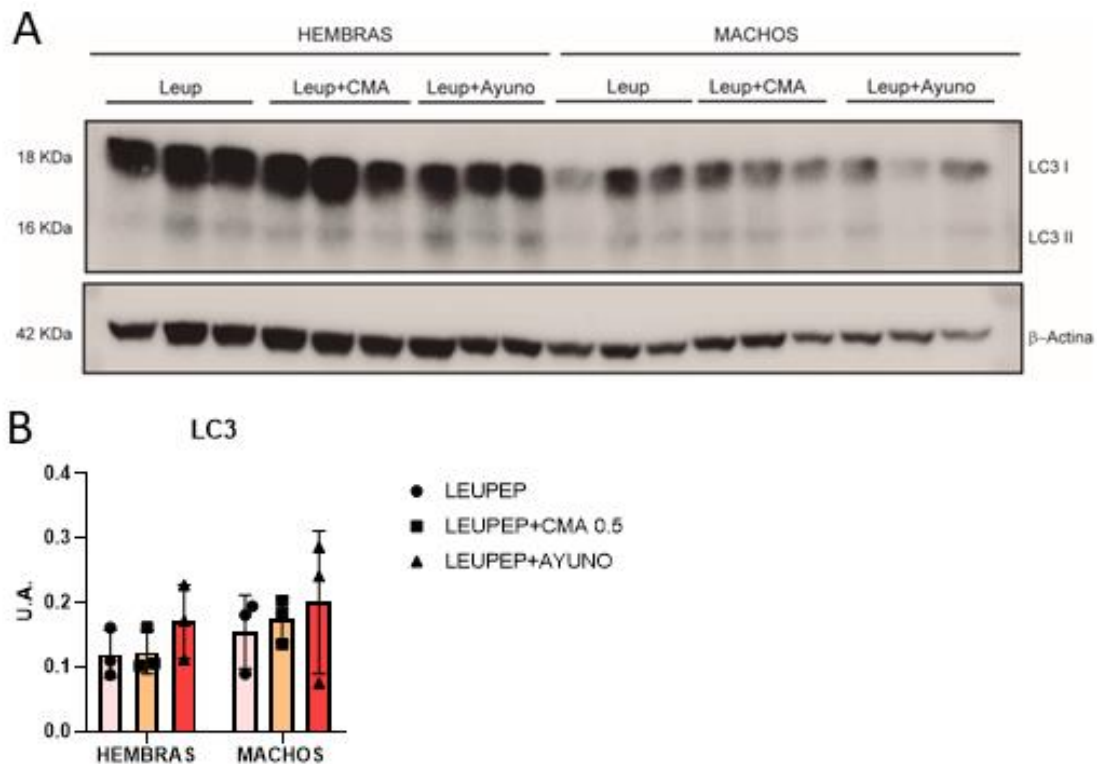


Figura 10. Flujo autofágico inducido por cascabello maduro (CMA) en ratones ICR. Los ratones ICR se trataron mediante una inyección intraperitoneal con leupeptina (Leup) (15 mg/ml) durante 4 h sola o en combinación con cascabello maduro (CMA) 0.5% durante 4 horas tras la inyección del inhibidor. Los ratones utilizados como controles positivos de autofagia fueron mantenidos durante 12 horas en ayuno. Tras los tratamientos, los animales fueron sacrificados y el SN fue extraído para su análisis. Los extractos de proteínas fueron analizados mediante WB. A. Se muestra el blot representativo de los niveles de LC3 de los extractos de proteínas procedentes del sistema nervioso. B. Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto al control de β -actina expresado en unidades arbitrarias. Los datos representan las medias \pm SD de tres ratones por condición

En la **Figura 10** se muestra que existe un ligero aumento en los machos tratados con CMA en combinación con leupeptina respecto a los tratados solo con el inhibidor, este ligero aumento no se aprecia en las hembras. En cuanto a los ratones mantenidos en condiciones de ayuno ese aumento de la lipidación de la isoforma II de la proteína LC3 es más evidente, tanto en machos, como en hembras, respecto al control con leupeptina.

De la misma manera, se realizó el tratamiento con CVA de los ratones, para comprobar los niveles de LC3 II en el SN de los ratones ICR expuestos a estos extractos.

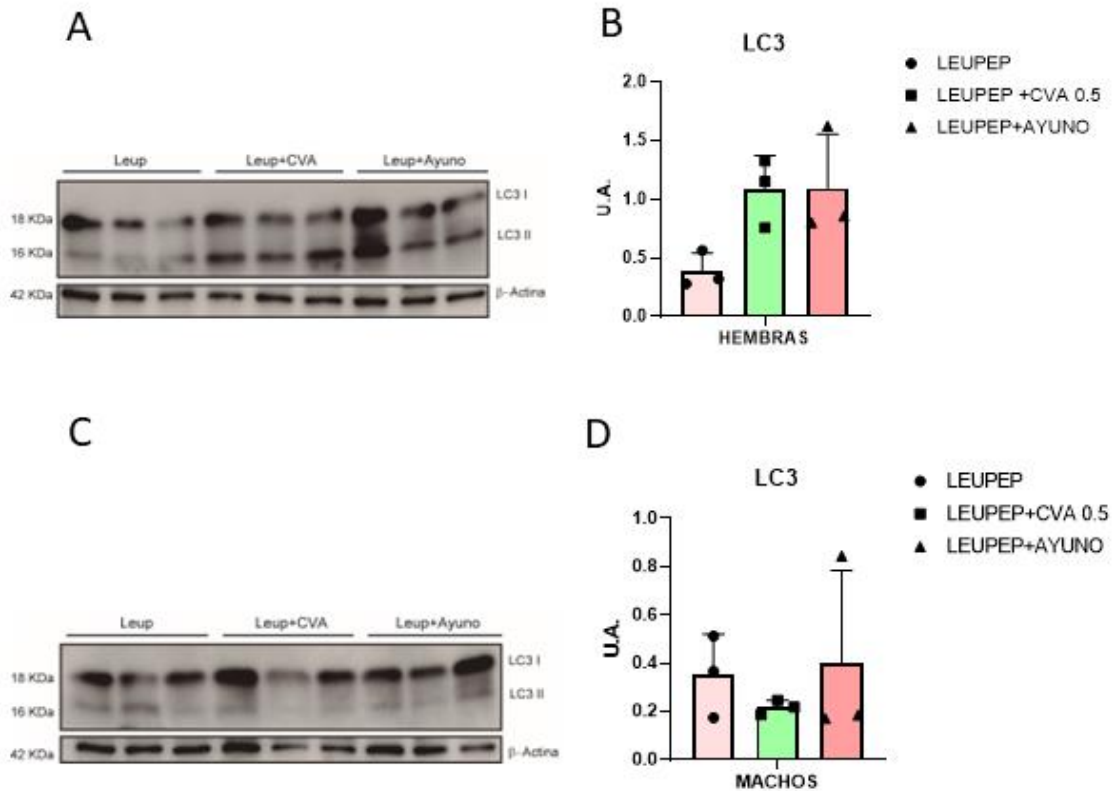


Figura 11. Flujo autofágico inducido por cascabello verde (CVA) en ratones ICR. Los ratones ICR se trataron mediante una inyección intraperitoneal con leupeptina (Leup) (15 mg/ml) durante 4h sola o en combinación con cascabello verde (CVA) 0.5% durante 4 horas tras la inyección del inhibidor. Los ratones utilizados como controles positivos de autofagia fueron mantenidos durante 12 horas en ayuno. Tras los tratamientos, los animales fueron sacrificados y el SN fue extraído para su análisis. Los extractos de proteínas fueron analizados mediante WB. A. Se muestra blot representativos de los niveles de LC3 de los extractos de proteínas procedentes del sistema nervioso. B. Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto al control de β -actina expresado en unidades arbitrarias. Los datos representan las medias \pm SD de tres ratones por condición

Tal y como se observa en la **Figura 11**, los resultados obtenidos en el caso de las hembras (**Figura 11 A y B**) muestran un aumento de LC3-II tras el tratamiento con CVA, así como los ratones mantenidos en ayuno. Este hecho no se observa en el caso de los machos (**Figura 11 C, D**).

Una vez analizados mediante WB los niveles de las proteínas LC3 y p62, tanto *in vitro* como *in vivo*, analizamos mediante estudios de IF en células de neuroglioma humano H4 que expresan LC3-GFP, la colocalización de esta proteína que monitoriza la formación de vacuolas de autofagia, con la proteína p62, señalizadora del cargo a degradar por la vacuola, mediante el empleo de anticuerpos específicos, tal y como se detalla en el apartado de M y M.

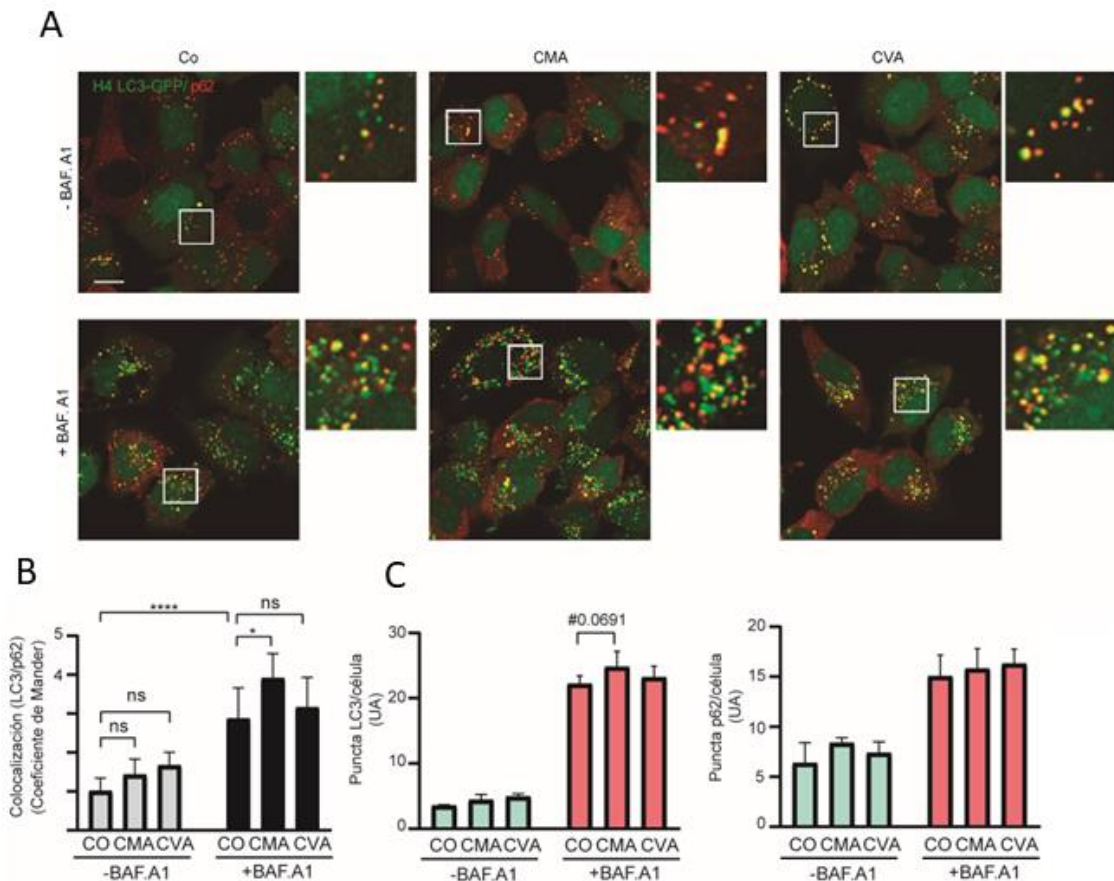


Figura 12. Colocalización entre la proteína p62 y LC3 en H4-GFP-LC3. Las células H4 que expresan GFP-LC3 se mantuvieron en condiciones basales (co), o se trataron con los extractos de cascabello de bellota maduro (CMA) y verde (CVA) al 0.25%, durante 4 horas, solos o en combinación de 100 μM de bafilomicina A1 (Baf. A1). Posteriormente, las células fueron fijadas y marcadas frente a la proteína p62 con Alexa Fluor 488 de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. (A) Muestra imágenes representativas de cada uno de los grupos celulares en las condiciones estudiadas. La barra de escala representa una longitud de 10 μm. (B) La gráfica representa la media del coeficiente de Mander para la proporción de marcaje de LC3 sobre el marcaje de p62 más la desviación típica (C). Muestra la cuantificación de los puntos de p62 y LC3. * Representa diferencias significativas entre tratamientos (*, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$).

Como podemos observar (**Figura 12**), los resultados del estudio de colocalización de LC3 y p62 revelan que tras el bloqueo de la autofagia por Baf.A1, en presencia de CMA se observa una tendencia al alza de puntos p62 y LC3 positivos, además de un aumento significativo de la colocalización de las vacuolas LC3 positivas y la proteína p62.

Posteriormente estudiamos las células a nivel ultraestructural mediante microscopía electrónica, lo cual nos permite visualizar en detalle la formación de los diferentes orgánulos y el contenido intravacuolar tras ser tratados con los diferentes orgánulos implicados en la macroautofagia tras ser tratados con los extractos de cascabello verde y maduro, y el bloqueante autofágico Baf.A1.

Al mismo tiempo se realizó un estudio con valina radiactiva, para corroborar si la degradación autofágica era o no efectiva.

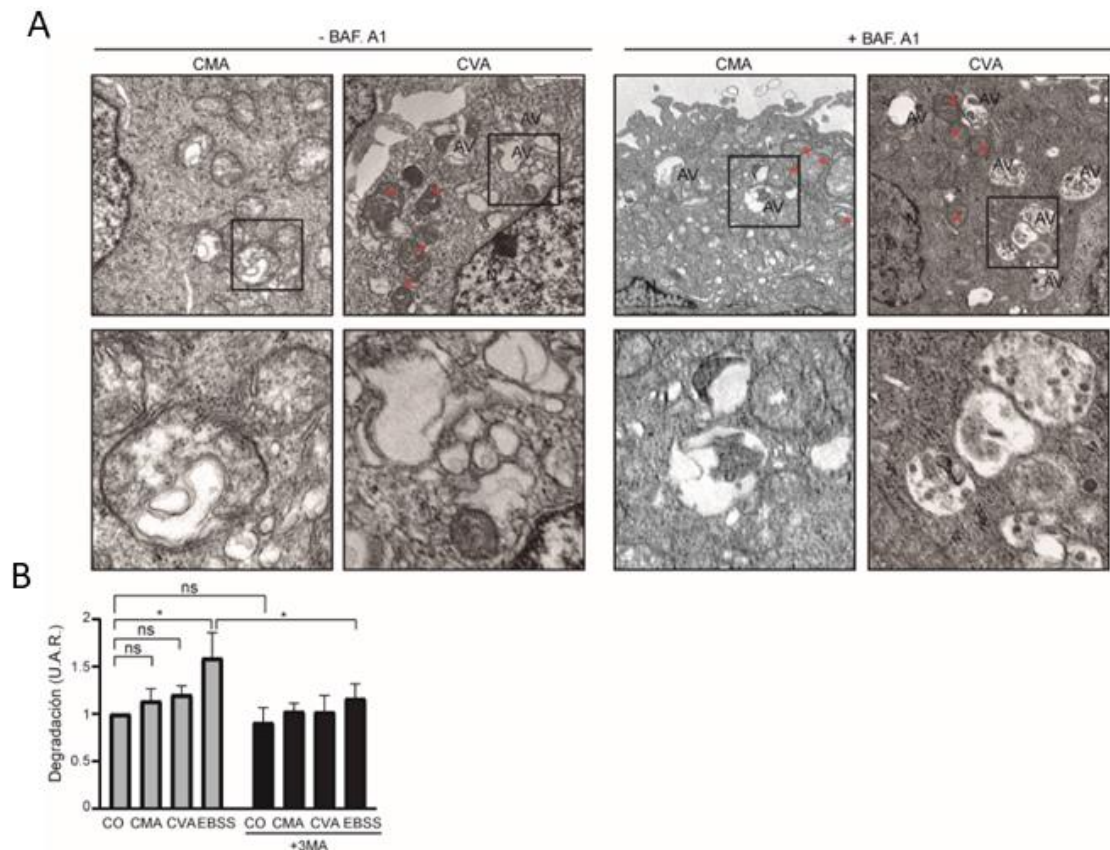


Figura 13. Estudio ultraestructural de orgánulos involucradas en el proceso de autofagia, y estudio de la degradación de proteínas de vida media larga. (A) Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se trataron con extractos de cúpula de bellota madura (CMA) y verde (CVA) al 0,25% durante 4 horas, solos o en combinación de 100 μ M de bafilomicina A1 (Baf. A1). A continuación el pellet fue fijado y procesado para MET según lo descrito en la sección de Material y Métodos. Se muestran fotos representativas y las ampliaciones de estructuras autofágicas de interés. AV: Vacuolas de autofagia; ER: Retículo endoplásmico; M: Mitocondria; N: Núcleo (B) Las células SH-SY5Y se sembraron en presencia del aminoácido marcado con Valina- C^{14} , posteriormente se mantuvieron en condiciones de inanición (EBSS), o bien se trataron con los extractos de cúpula de bellota madura (CMA) y verde (CVA) al 0,25% durante 4 horas, en presencia o ausencia de 3-metiladenina (3-MA) 10 mM, como se explica en el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. * Representa diferencias significativas entre los grupos analizados. (*, $p < 0,05$).

Los datos de la **Figura 13** sugieren que, tanto CMA como CVA, en ausencia de Baf.A1, dan lugar a la formación de vacuolas autofágicas (AV). Además en presencia de Baf.A1 es más evidente que el contenido del interior de las vacuolas es diferente en las células tratadas con CVA o CMA, encontrándonos con el tratamiento de CVA un contenido más electrodenso.

En la periferia de los lisosomas, además con CVA es evidente el aumento del número de autofagosomas no fusionados en los que se aprecia un gran número de mitocondrias en el interior.

Una vez comprobada la formación de vacuolas LC3 positivas tras el tratamiento de los extractos, su colocalización con p62, y la degradación de las proteínas

de larga vida, el siguiente paso fue analizar el principal organelo ácido involucrado en la etapa degradativa del flujo autofágico, el lisosoma. Para ello marcamos estas estructuras con un agente específico, el LTR.

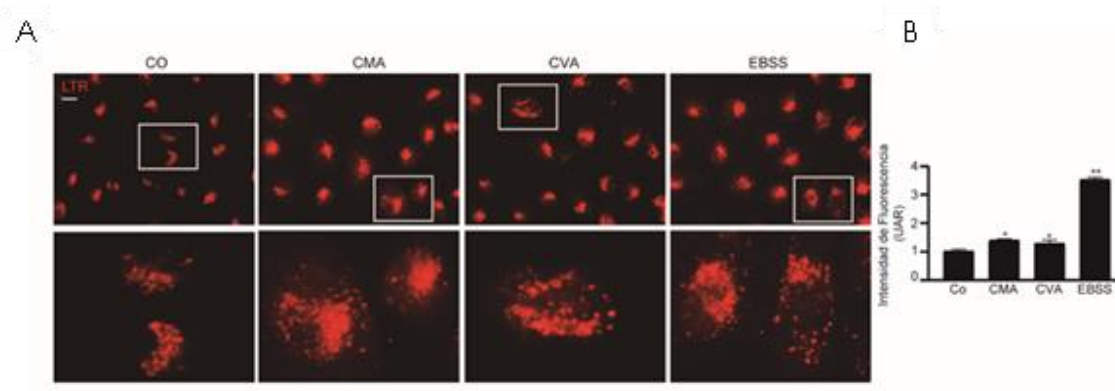


Figura 14. Marcaje con Lysotracker Red (LTR) de células de neuroglioma humano (H4 GFP-LC3) tratadas con extractos de cúpula de bellota y EBSS. Las células de neuroglioma humano H4 que expresan GFP-LC3 se mantuvieron en condiciones basales (Co), se expusieron a condiciones de inanición (EBSS), o se trataron con extractos de cúpula de bellota madura (CMA) y verde (CVA), con una concentración de 0.25%, durante 4 horas. Tras este tiempo se realizó una tinción in vivo con Lysotracker Red (LTR) y se procesó las muestras para adquirir imágenes de IF, de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. (A) Muestra imágenes representativas para cada grupo celular estudiado para este marcaje y ampliaciones de este. La barra de escala representa una longitud de 10 μ m (B) Muestra la media de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia por número de células en tres experimentos independientes. Se analizaron, al menos, 200 células por condición. * señala diferencias estadísticamente significativas entre cultivos celulares estudiados. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

En la **Figura 14** los resultados obtenidos muestran que tanto con el tratamiento de EBSS, utilizado como control positivo, como con los tratamientos de CMA y CVA la intensidad de fluorescencia aumento de forma significativa.

A continuación nos centramos en estudiar el mecanismo a partir del cual los extractos de cascabello inducen autofagia.

5.2.1.1 Papel de ATG5

El gen ATG5 (Autophagy-related gene 5) juega un papel fundamental en el proceso de autofagia. ATG5 es uno de los genes relacionados con la autofagia y codifica una proteína del mismo nombre que se une a ATG12 para formar un complejo proteico conocido como conjugado ATG12-ATG5. Este complejo es esencial para la elongación y cierre de la membrana del autofagosoma.

Para analizar el papel que desempeña ATG5 en la autofagia inducida por los extractos de cascabello se empleó la línea celular H4 deficientes para ATG5.

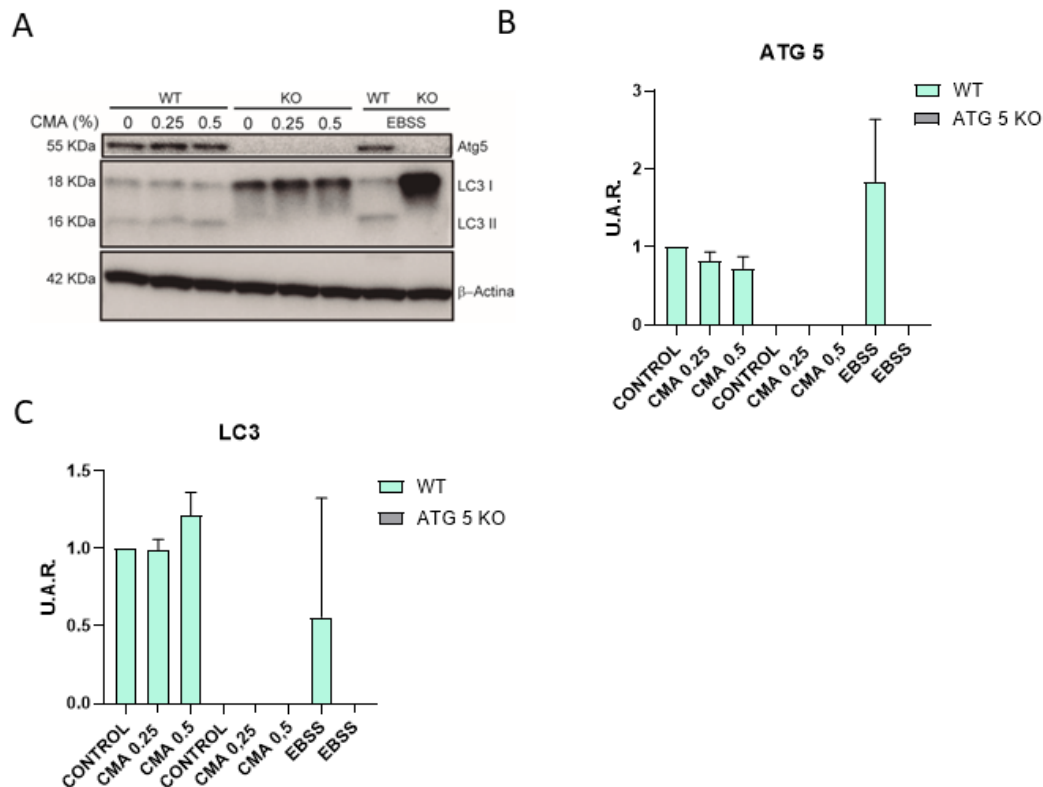


Figura 15. Determinación del papel de la proteína Atg5 en la autofagia inducida por extractos de cascabello maduro (CMA). Las células de neuroglioma H4 GFP-LC3 WT y ATG5 KO fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 70.000 células/ml. 24 horas después de la siembra, se trataron o no con CMA 0.25 y 0.5% y EBBS durante 4h. Tras los tratamientos, las células fueron lisadas y los extractos de proteínas fueron analizados mediante Western blotting. A. Se muestran blots representativos de los niveles de Atg5 y LC3. β-actina de usó como control de carga. B, C. Análisis densitométrico de los niveles de ATG5 respecto a β-actina, expresado en unidades arbitrarias relativizadas respecto al control (UAR). C) Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto a β-actina, expresado en unidades arbitrarias relativizadas respecto al control (UAR).

Analizamos por WB los extractos celulares y observamos que la ausencia de ATG5, abolió completamente los niveles de LC3-II tras el tratamiento tanto de CMA (**Fig 15**), como de CVA (**Fig 16**) comparado con los controles que sí expresan la proteína.

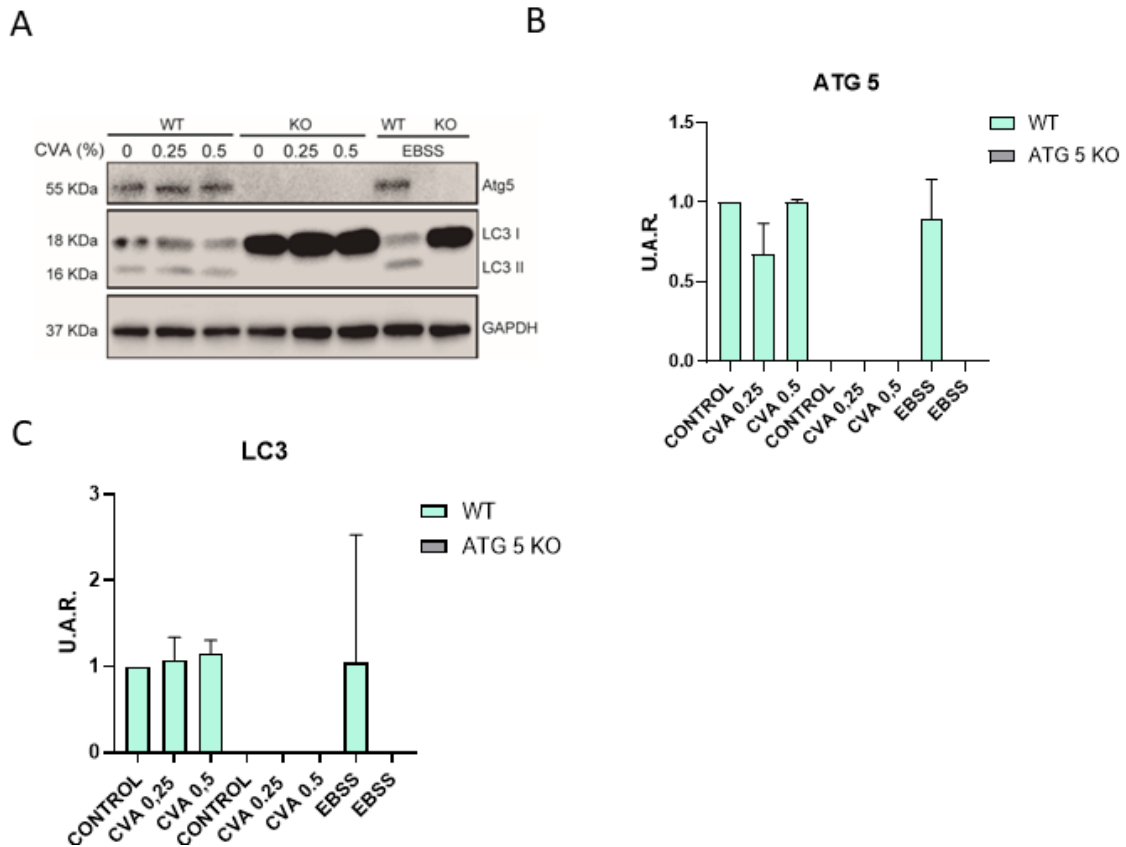


Figura 16. Determinación del papel de la proteína Atg5 en la autofagia inducida por extractos de cascabello verde (CVA). Las células de neuroglioma H4 GFP-LC3 WT y ATG5 KO fueron sembradas en medio de cultivo completo a una densidad de 70.000 células/ml. 24 horas después de la siembra, se trataron o no con CVA 0.25 y 0.5% y EBBS durante 4h. Tras los tratamientos, las células fueron lisadas y los extractos de proteínas fueron analizados mediante Western blotting. A. Se muestran blots representativos de los niveles de Atg5 y LC3. β -actina se usó como control de carga. B, C. Análisis densitométrico de los niveles de ATG5 respecto a β -actina, expresado en unidades arbitrarias relativizadas respecto al control (UAR). C) Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto a β -actina, expresado en unidades arbitrarias relativizadas respecto al control (UAR).

Estos resultados corroboran la importancia de ATG5 en la autofagia inducida por los extractos de cascabello en sus diferentes etapas de maduración, ya que la ausencia del gen que codifica ATG5 inhibe completamente la lipidación de la isoforma LC3 II.

5.2.1.2 Papel de la vía mTOR/AMPk

Una vez estudiada la vía ATG5, nos propusimos estudiar la vía mTORC1 mediante el estudio indirecto de la lipidación de LC3 tras el silenciamiento de TSC2.

Actualmente la proteína TSC2 forma parte de un complejo proteico conocido como complejo TSC, que también incluye a la proteína TSC1. Este complejo

actúa como un regulador negativo de la vía de señalización mTOR, una vía crucial para el control del crecimiento celular y el metabolismo.

Por ello queremos comprobar si la autofagia generada por ambos cascabullos puede ser o no dependiente de la regulación de la vía mTORC.

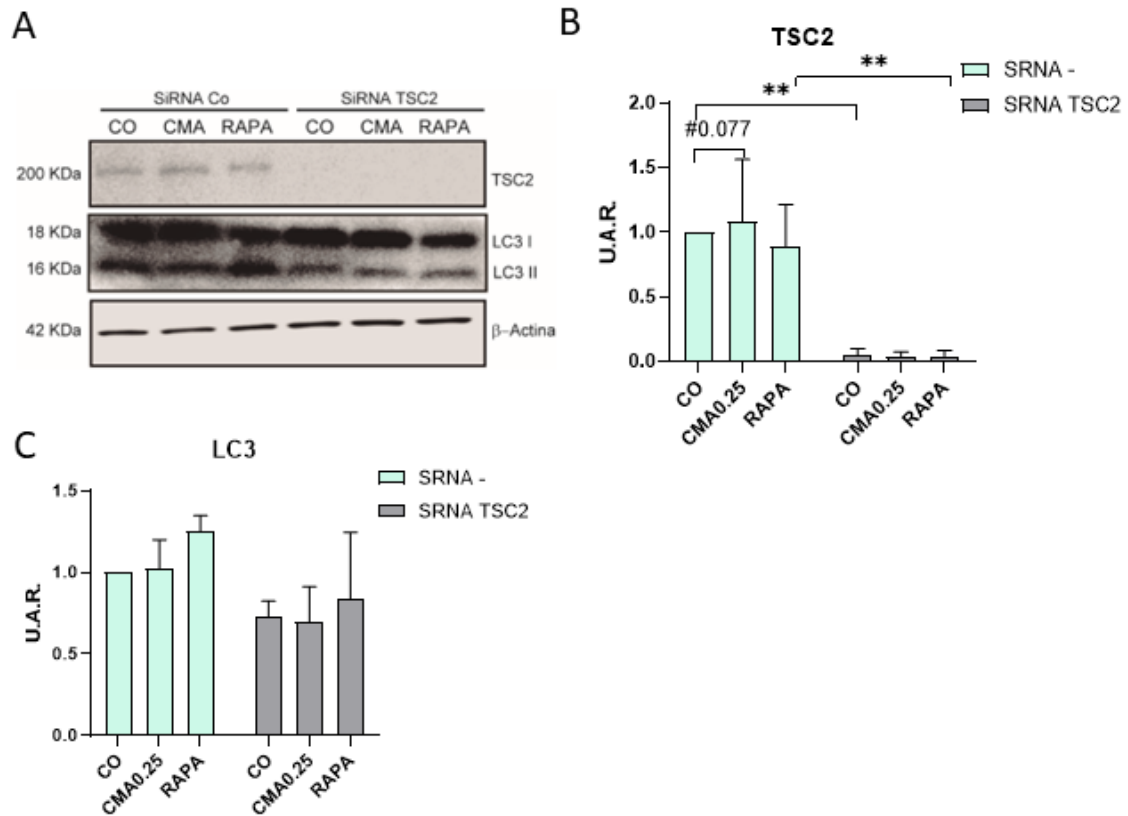


Figura 17. Efecto del silenciamiento de TSC2 sobre los niveles de LC3 tras el tratamiento con cascabullo maduro (CMA). Los fibroblastos de ratón (MEF), fueron transfectadas con el siRNAs Co y siRNA para TSC2 durante 48 horas. Posteriormente, se trataron con (CMA 0,25%) y rapamicina (RAPA) (1 μ M). Se procesaron, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra el blot representativo de los niveles de la TSC2, LC3 y β -ACTINA. B. Análisis densitométrico de TSC2 con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.) ** $p < 0.01$

Para realizar estos ensayos, las células MEF y fueron transfectadas con siRNA control y siRNA específico frente a TSC2 y tratadas con el inhibidor alostérico de la vía mTOR, rapamicina, y CMA. La **figura 17** muestra que el silenciamiento de TSC2 disminuye parcialmente la lipidación de LC3 II, tanto con el tratamiento con CMA, como con rapamicina.

Posteriormente realizamos el mismo tratamiento con CVA. De nuevo queríamos comprobar si además del estado de maduración, la vía MTORC1 era clave para la activación o inhibición del mecanismo de autofagia.

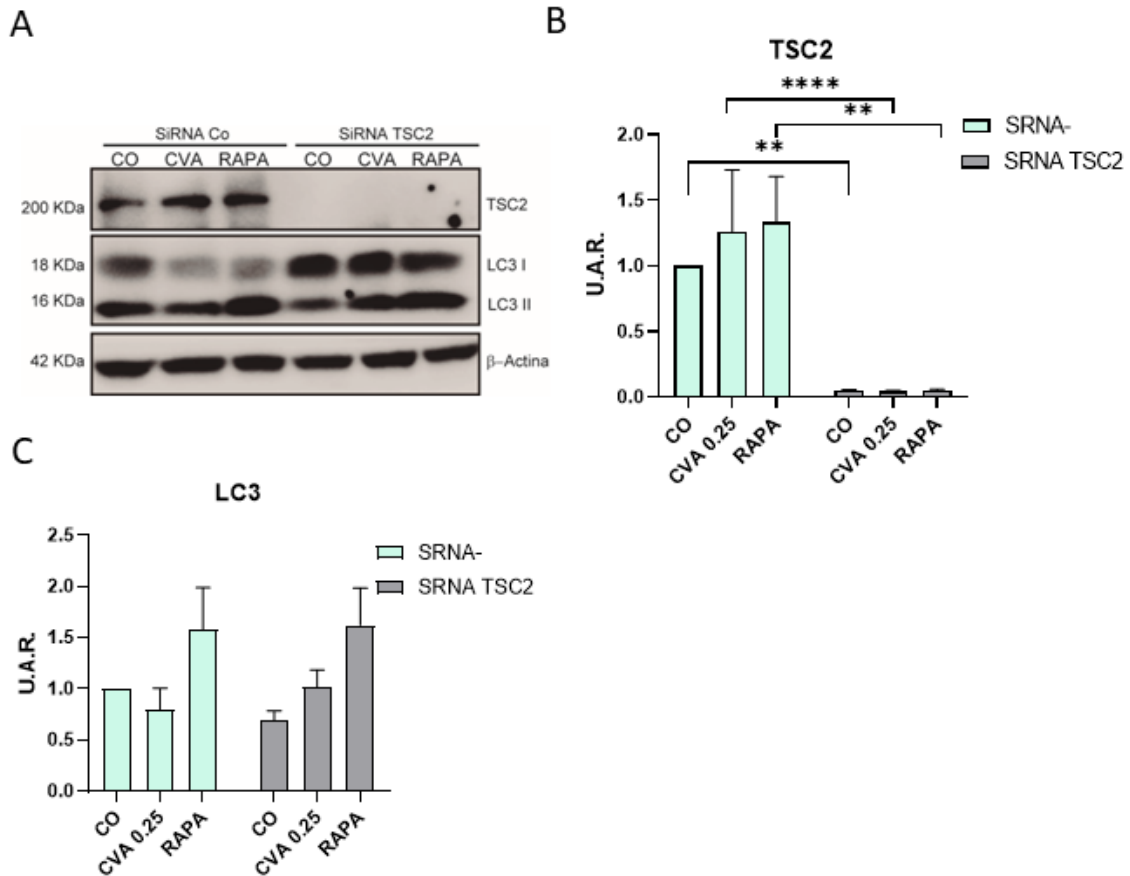


Figura 18. Efecto del silenciamiento de TSC2 sobre los niveles de LC3 tras el tratamiento con cascabello verde (CVA). Los fibroblastos de ratón (MEF), fueron transfectadas con el siRNAs Co y siRNA para TSC2 durante 48 horas. Posteriormente, se trataron con (CMA 0,25%) y rapamicina (RAPA) (1 μ M). Se procesaron, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra blots representativos de los niveles de la TSC2, LC3 y β -actina. B. Análisis densitométrico de TSC2 con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.) ** $p < 0.01$.

Como vemos (**Figura 18**), los resultados mostrados para CVA, revelan datos dispares, pues nos sugieren dos posibilidades tanto con CVA como con rapamicina. En primer lugar podíamos pensar que la rapamicina no había sido efectiva y/o que CVA actúa por una vía independiente a la vía MTORC1, descartada la primera hipótesis tras el estudio de proteínas de la vía mTORC1 (p-S6k y p-mTOR) (datos no mostrados), cabe pensar que esta vía no es fundamental para la activación de autofagia medida por CVA.

Debido a que los datos obtenidos no eran concluyentes se decidió realizar el estudio de la vía AMPk, mediante el uso del silenciamiento génico de dicha proteína. AMPK puede inhibir la actividad de mTOR mediante la fosforilación de la proteína TSC2. La fosforilación de TSC2 por la AMPK estimula la formación del complejo TSC1-TSC2, que inhibe la actividad de mTOR y suprime la síntesis de proteínas y el crecimiento celular.

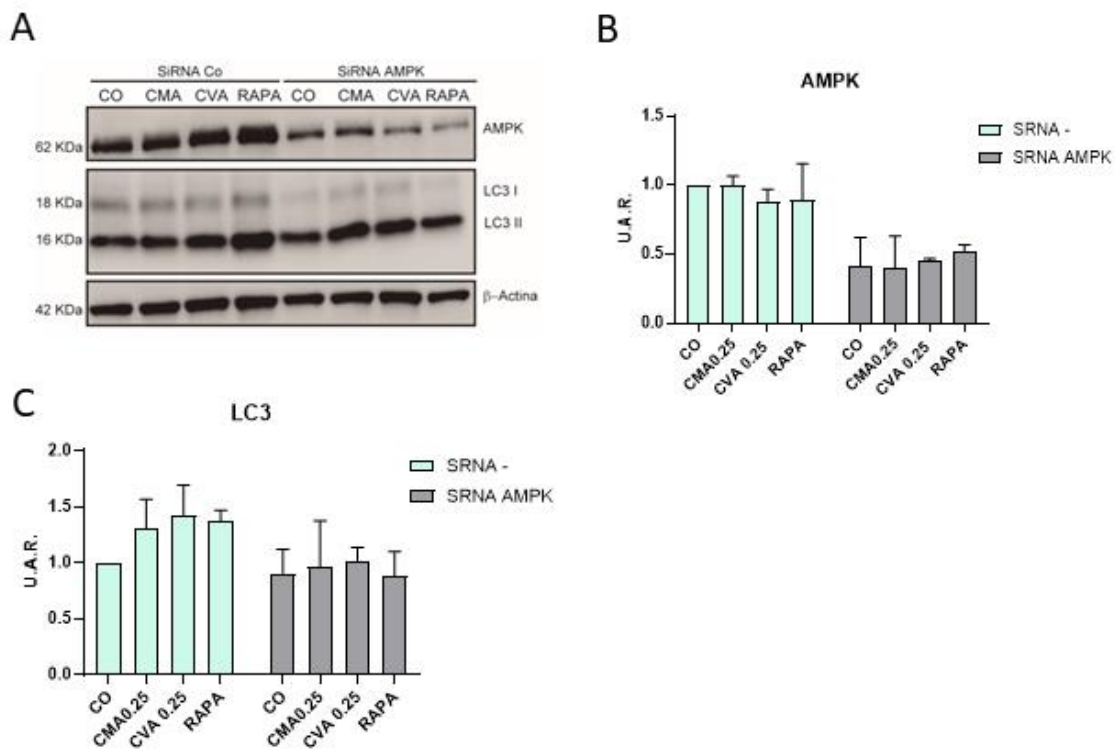


Figura 19. Efecto del silenciamiento de AMPk sobre los niveles LC3 en células tratadas con los extractos de cascabello maduro (CMA) y verde (CVA). Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, fueron transfectadas con el siRNA Co y siRNA para AMPk durante 48 horas. Posteriormente, se trataron con los extractos de CMA y CVA, además de con rapamicina (RAPA) ($1\mu\text{M}$). Se procesaron, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. **A.** Muestra blots representativos de los niveles de la AMPK, LC3 y β -actina. **B.** Análisis densitométrico de AMPK con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). **C.** Análisis densitométrico de los niveles de LC3-II con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.) ****p<0.01**

En la **Figura 19**, podemos ver cómo tras el silenciamiento efectivo de la proteína AMPk, el tratamiento, tanto de los extractos de cascabello en sus diferentes estados de maduración, como de rapamicina, provoca una disminución parcial de la lipidación de LC3 II, lo cual hace pensar que esta vía que puede tener un papel en la inducción de la autofagia mediada por CMA y CVA, aunque no sería crucial.

5.3 Determinación de la inducción de mitofagia tras el tratamiento con los extractos de cascabello de bellota

5.3.1 Estudio del mecanismo de inducción de mitofagia en presencia de los extractos de cascabello.

El concepto de autofagia en mamíferos como un sistema de degradación no selectivo ha sido repudiado, en parte debido a importantes descubrimientos en enfermedades neurodegenerativas, que abrieron el campo de la autofagia selectiva. El sistema de autofagia mediada por la vía lisosomal representa un importante sistema de control de calidad, que es capaz de degradar tanto los agregados de proteínas como los orgánulos dañados, como las mitocondrias (en un proceso de autofagia selectiva llamada mitofagia). La alteración de la mitofagia es clave en la patogénesis de la EP. Diferentes estudios han demostrado que la inducción regulada de la autofagia o la mitofagia puede tener efectos beneficiosos en diferentes enfermedades neurodegenerativas.

En la figura siguiente utilizamos un modelo de fibroblastos humanos con una de las mutaciones patogénicas más comunes en el desarrollo de la EP, la mutación G2019S de la proteína LRRK2. Se realizó una inmunofluorescencia empleando dos anticuerpos, específicos de lisosomas (LAMP1) y de mitocondrias (TOMM20) para analizar si ambos orgánulos colocalizaban en presencia de los extractos de cascabello. Se empleó el desacoplante mitocondrial CCCP como control positivo de inducción de mitofagia. Como se muestra en la **Figura 20**, en los fibroblastos WT.

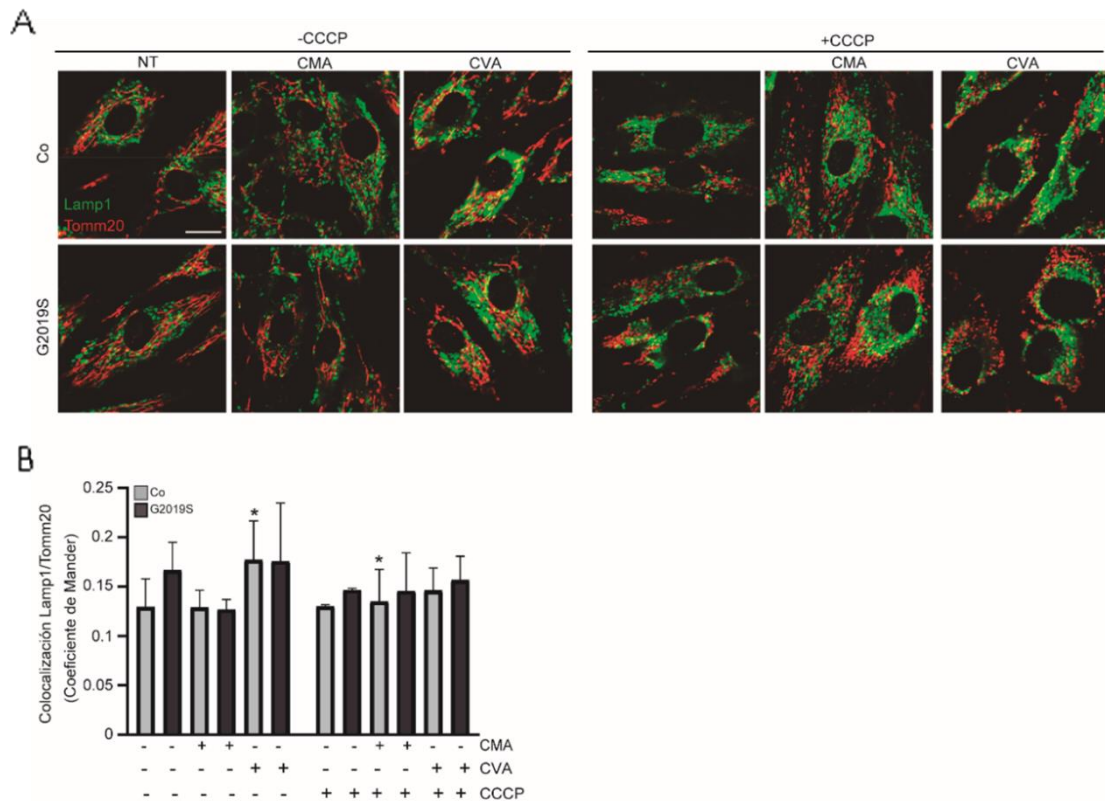


Figura 20. Efecto de los extractos de cúpula de bellota en la colocalización de las proteínas TOMM20 y LAMP1 en fibroblastos controles y procedentes de enfermos de Parkinson. Los fibroblastos humanos controles (Co) o con mutación LRRK2 (G2019S) se trataron o no con extractos de cascabello de bellota madura y verde (CMA y CVA) al 0,25%, solos o en combinación con 10 μ M de cianuro de carbonilo 3-cloro-fenilhidrazona (CCCP) durante 4 h. El panel A muestra imágenes representativas para cada una de las condiciones estudiadas. La barra de escala representa 10 μ m. El panel B muestra la colocalización de LAMP1 con TOMM20 expresado por el coeficiente de Mander. * Representa diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma línea (*, $p < 0,05$).

Los fibroblastos control tratados con CVA 0.25%, presentan un aumento significativo respecto a su control no tratado, en la localización de la proteína mitocondrial TOMM20 con la proteína lisosomal LAMP1 (**Fig 20. A, B**). Este aumento de la colocalización con CVA también se observa en los fibroblastos portadores de la mutación, aunque no es significativa.

Sin embargo, con CMA 0.25% es necesario un daño con CCCP, para ver ese aumento de manera significativa.

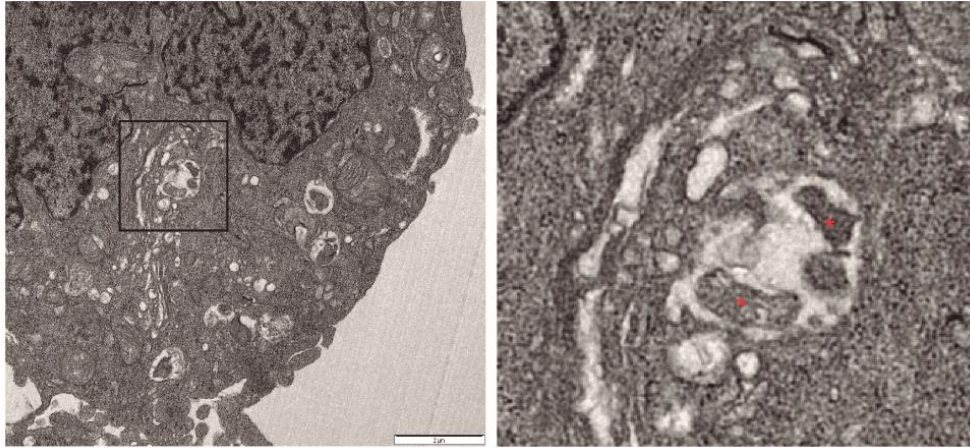


Figura 21. Imágenes ultraestructurales de mitofagosomas. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con extractos de cascabello verde (CVA 0.25%) durante 4 h. Transcurrido este tiempo los precipitados celulares fueron procesados tal y como se detalla en el apartado de Materiales y métodos. Las fotografías muestran una imagen de microscopía electrónica representativa de un mitofagosoma en el citoplasma celular y una ampliación de dicha estructura tras el tratamiento con CVA.

El análisis ultraestructural mediante MET mostrado en la **Figura 21** muestra en detalle la formación de un mitofagosoma tras el tratamiento con CVA 0.25%, corroborando la presencia de vacuolas de autofagia que englobaban mitocondrias en su interior.

Posteriormente para confirmar que existía una degradación efectiva de las mitocondrias englobadas en las vacuolas mediante el proceso de mitofagia, se utilizó un modelo celular basado en la inclusión de un reporter mitoQC en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

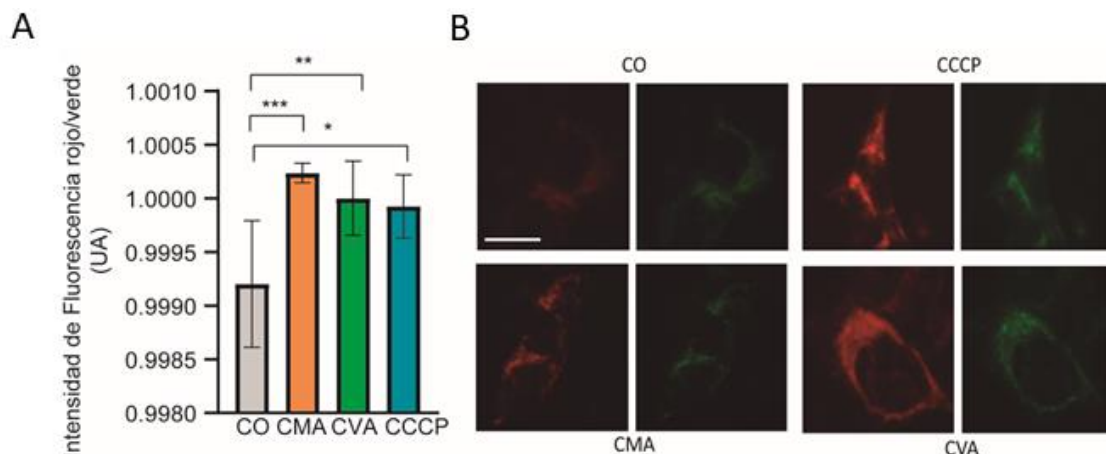


Figura 22. Efecto de los extractos de cúpula de bellota en la mitofagia. Las células SH-SY5Y MitoQC se sembraron a una confluencia de 100.000 cél/ml, a continuación se mantuvieron en condiciones basales (CO), o fueron tratadas con los extractos de cascabello maduro (CMA 0.25%) o verde (CVA 0.25%), y con CCCP, 10 μ M. A. La gráfica representa la media \pm SD de un experimento independiente del cociente de la intensidad de fluorescencia rojo/verde representado en unidades arbitrarias (UA). * Muestra diferencias significativas entre los grupos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). B. El panel B muestra imágenes representativas para cada una de las condiciones estudiadas. La barra de escala representa 10 μ m.

Como mostramos (**Figura 22**), el tratamiento tanto con CMA como con CVA, aumentan el mecanismo de mitofagia de forma significativa, del mismo modo que lo hace CCCP.

Posteriormente analizamos mediante estudio por WB, los niveles de las proteínas estructurales de las membranas mitocondriales, tanto externa (TOMM20), como interna (TIMM23).

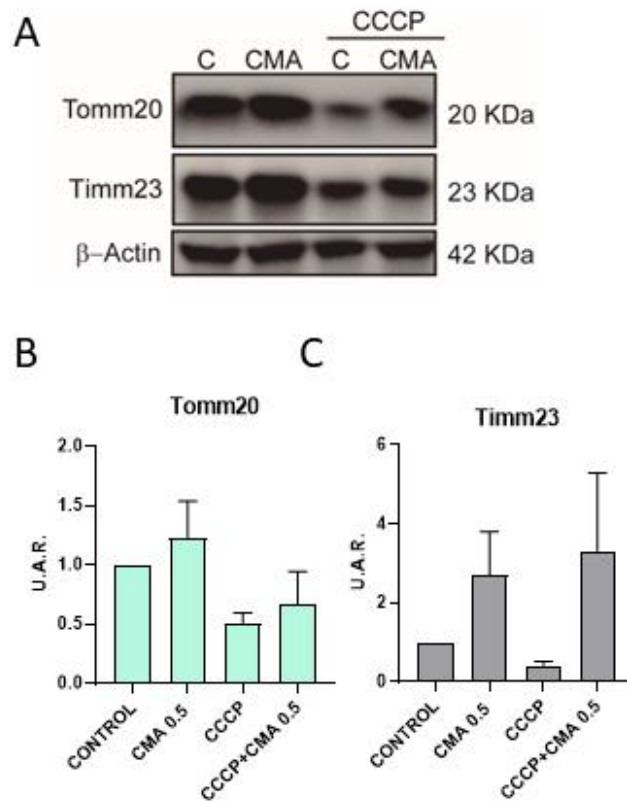


Figura 23. Determinación de los niveles de proteínas mitocondriales (TOMM20 y TIMM23) con CMA. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se mantuvieron en condiciones basales (CO), o bien se trataron con el extracto de cascabello maduro (CMA 0.5%), con o sin (CCCP, 10 μ M). Tras los tratamientos, las células fueron lisadas y los extractos de proteínas fueron analizados mediante Western blotting según se detalla en el apartado de materiales y métodos. A. Muestra blots representativos de 3 experimentos independientes (esto tenemos que decirlo en todos) de los niveles de TOMM20, TIMM23 y β -ACTINA. B, Análisis densitométrico de TOMM20 con respecto al control de carga β -ACTINA expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de los niveles de TIMM23 con respecto al control de carga β -ACTINA expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.)

En la **Figura 23**, observamos como, tras el tratamiento con CMA de manera basal, es decir sin un daño previo, se observa una tendencia al alza de los niveles de TIMM23 y de TOMM20. Tras un daño con CCCP, CMA es capaz de revertir este, y aumentar los niveles tanto de TOMM20 como de TIMM23 por encima de los niveles de estas proteínas.

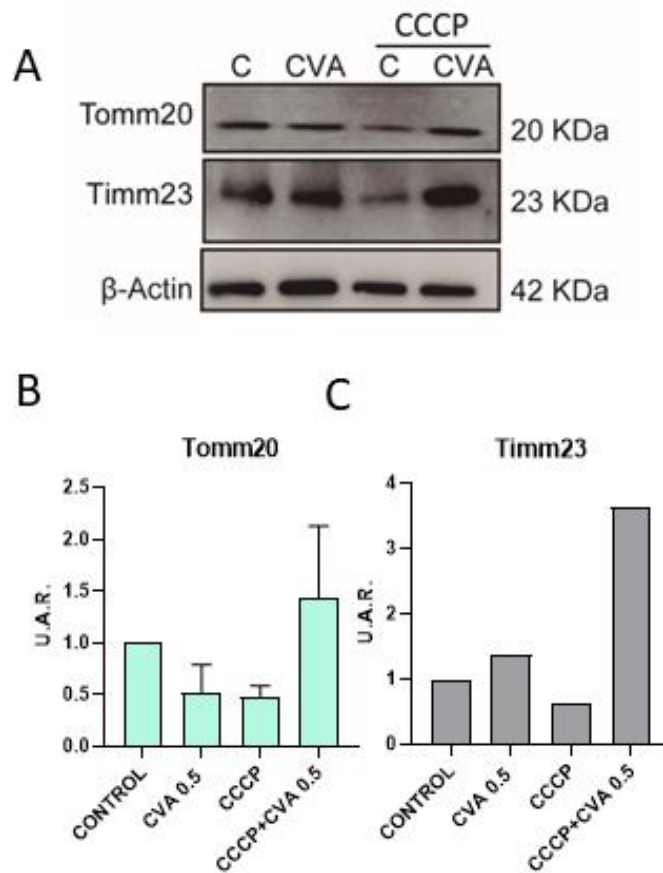


Figura 24. Determinación de los niveles de proteínas mitocondriales (TOMM20 y TIMM23) con CVA. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se mantuvieron en condiciones basales (CO), o bien se trataron con el extracto de cascabello maduro (CMA 0.5%), con o sin (CCCP, 10 μ M. Tras los tratamientos, las células fueron lisadas y los extractos de proteínas fueron analizados mediante Western blotting según se detalla en el apartado de materiales y métodos. A. Muestra blots representativos de 3 experimentos independientes (esto tenemos que decirlo en todos) de los niveles de TOMM20, TIMM23 y β -ACTINA. B. Análisis densitométrico de TOMM20 con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de los niveles de TIMM23 con respecto al control de carga β -actina expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.)

Los resultados mostrados (**Figura 24**), sugieren que el tratamiento con CVA provoca una disminución de los niveles de la proteína TOMM20, sin embargo, en presencia de CCCP, CVA es capaz de revertir la disminución de los niveles de las proteínas mitocondriales inducidas por este agente, tanto de la membrana externa (TOMM20), como interna (TIMM23).

5.3.1.1 Papel de la proteína PINK1

La proteína PINK1 es una proteína clave involucrada en el proceso de mitofagia, La acumulación de PINK1 en la membrana externa de las mitocondrias activa una cascada de eventos que conducen a la eliminación selectiva de las mitocondrias dañadas. A su vez PINK1 se encarga de reclutar y fosforilar la proteína

PARKIN, ésta promueve la fosforilación de ubiquitina en el residuo de serina 65 (p-Ubser 65). Finalmente la p-UbSer65 es un marcador específico que se encarga de señalar las mitocondrias dañadas para su eliminación a través de la mitofagia.(Kazlauskaite et al., 2014)

Para verificar si las proteínas PINK1 y p-UbSer65 estaban implicadas en el mecanismo a través del cual se estaba produciendo la inducción de mitofagia tras el tratamiento de los extractos, se realizó un aislamiento de la fracción mitocondrial y se analizó mediante WB los niveles de estas proteínas en ellos. Se utilizó CCCP como control positivo de la mitofagia a través de esta vía.

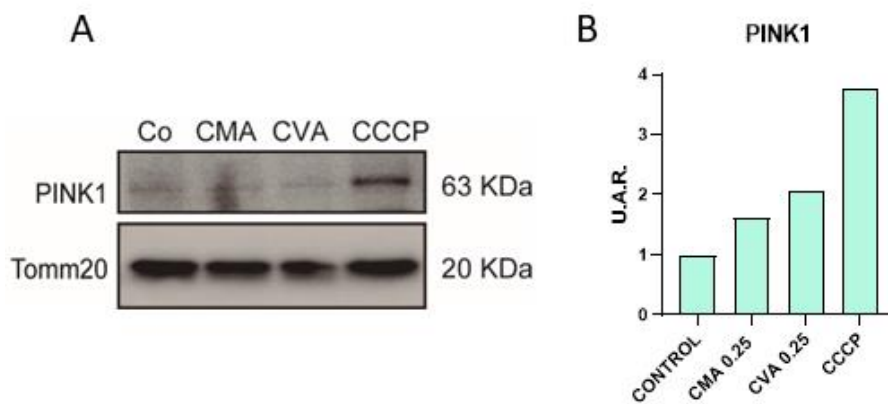


Figura 25. Determinación de los niveles de la proteína PINK1 tras un aislamiento mitocondrial. Las células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), se mantuvieron sin tratar (Co), o bien se trataron con los extractos de cascabello maduro (CMA 0,25%) y verde (CVA 0,25%), además de con CCCP, 10 μ M, durante 28 horas. Tras el tratamiento, las células recogieron y lisaron mediante el protocolo de extracción citosólica y mitocondrial, incluido en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra el blot preliminar de los niveles de PINK1 y TOMM20. B. Análisis densitométrico de PINK1 con respecto al control de carga mitocondrial TOMM20 expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Como vemos (**Figura 25**), La exposición, tanto de CMA como de CVA inducen un aumento en los niveles de PINK1 en la fracción mitocondrial, aunque es más relevante en las células tratadas con el desacoplante CCCP.

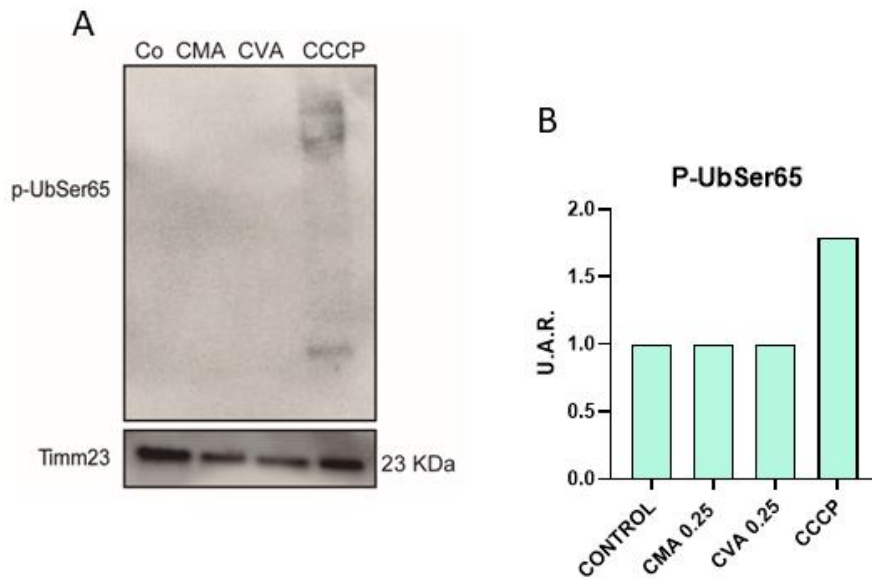


Figura 26 Determinación de los niveles de la proteína p-UbSer65 tras un aislamiento de la fracción mitocondrial. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se mantuvieron sin tratar (Co), o bien se trataron con los extractos de cascabello maduro (CMA 0,25%) y verde (CVA 0,25%), además de con CCCP, 10 μ M, durante 4 horas. Tras el tratamiento, las células se recogieron y lisaron mediante el protocolo de extracción citosólica y mitocondrial, incluido en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra el blot preliminar de los niveles de p-UbSer65 y TIMM23. B. Análisis densitométrico de p-UbSer65 con respecto al control de carga mitocondrial TIMM23 expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Sin embargo, cuando se analizó la fosforilación de la ubiquitina en la Ser 65 (**Figura 26**), se comprobó que sólo con el tratamiento con CCCP se aprecia un aumento de la fosforilación de esta proteína.

5.3.1.2 Papel de LONP1

En base a estos resultados previos, no queda claro si el papel de la vía PINK1 es fundamental en el mecanismo de inducción de mitofagia mediado por los extractos de bellota.

Por este motivo, analizamos los niveles de LONP1 (Lon protease 1), una enzima mitocondrial conocida como proteasa de tipo ATPasa que desempeña un papel en varios procesos celulares, incluida la mitofagia. LONP1 se encuentra en la matriz mitocondrial y puede tener un papel en el reclutamiento de mitocondrias dañadas, facilitando así su eliminación selectiva. (Gibellini et al., 2020)

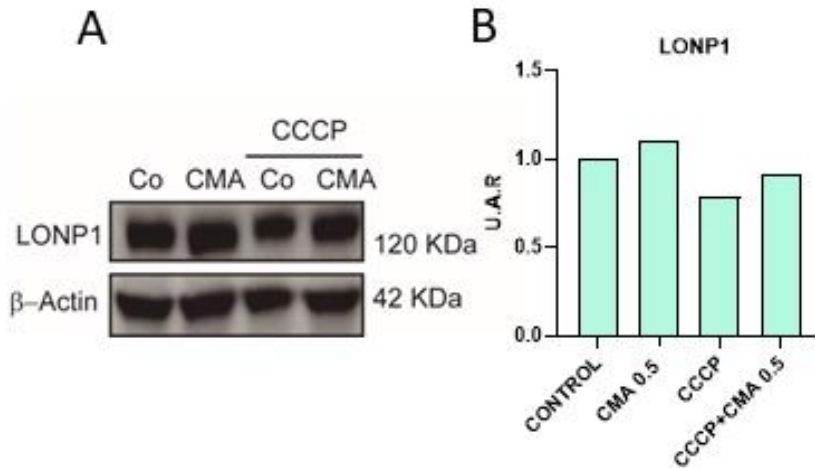


Figura 27. Determinación de los niveles de la proteína LONP1. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se mantuvieron en condiciones basales (Co), o bien se trataron con el extracto de cascabello maduro (CMA 0,5%), con o sin (CCC) (10 μ M). Tras su procesamiento, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. **A.** Muestra blot preliminar de los niveles de LONP1. **B.** Análisis densitométrico de LONP1, respecto al control de carga β -actina, expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Los resultados preliminares mostrados en la (**Figura 27**), no muestran resultados significativos respecto a los niveles de la proteína LONP1 con el tratamiento de CMA, sí se observa una ligera disminución de los niveles de esta proteína tras la exposición de las células al desacoplante CCCP.

Posteriormente se repitió este análisis tras el tratamiento de las células con CVA

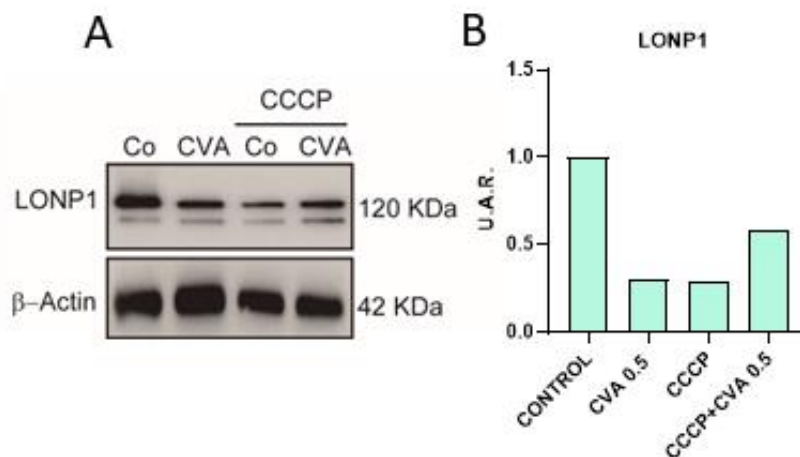


Figura 28. Determinación de los niveles de la proteína LONP1. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se mantuvieron en condiciones basales (Co), o bien se trataron con el extracto de cascabello verde (CVA 0,5%), con o sin (CCC) (10 μ M). Tras su procesamiento, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. **A.** Muestra blots representativos de los niveles de LONP1. **B.** Análisis densitométrico de LONP1, respecto al control de carga β -actina, expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Como podemos observar (**Figura 28**), tras la exposición de las células SH-SY5Y con CVA se observa una disminución de LONP1 respecto a su control, al igual que ocurre tras el daño mitocondrial mediante CCCP.

Posteriormente al estudio de LONP1 en lisados totales, se decide estudiar LONP1 tras un aislamiento de la fracción mitocondrial, donde verificaremos los niveles de esta proteína en dicho organelo

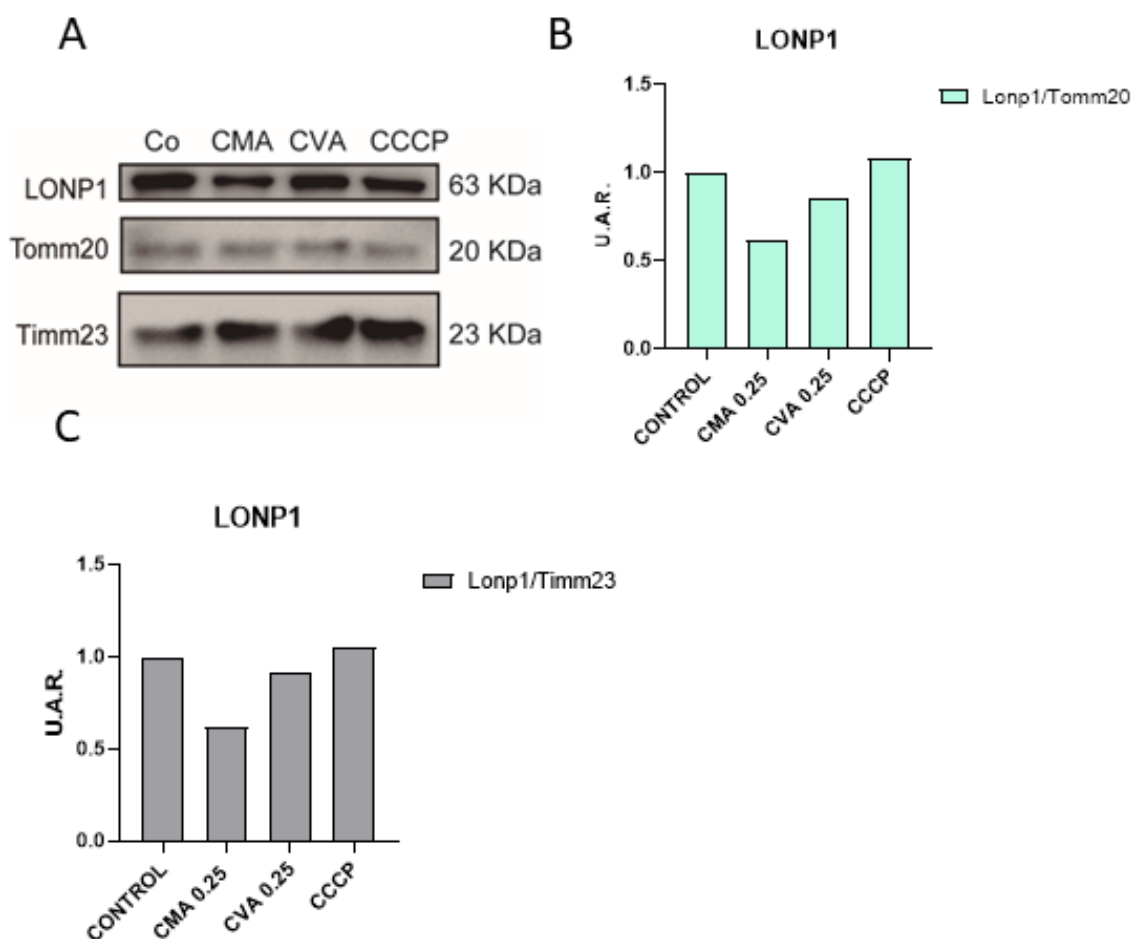


Figura 29. Determinación de los niveles de la proteína LONP1, tras aislamiento de la fracción mitocondrial. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se mantuvieron en condiciones basales (Co), o bien se trataron con los extractos de cascabello maduro (CMA 0,25%) y verde (CVA 0,25%), además de con (CCCP, 10 μ M), durante 4 horas. Tras el tratamiento, las células se recogieron y lisaron mediante el protocolo de extracción citosólica y mitocondrial, incluido en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra blots representativos de los niveles de LONP1, TOMM20 y TIMM23. B. Análisis densitométrico de LONP1 con respecto al control de carga mitocondrial TOMM20 expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de LONP1 con respecto al control de carga mitocondrial TIMM23 expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

En la **Figura 29**, podemos ver cómo a nivel mitocondrial, tanto con el tratamiento con CMA como con CVA, se aprecia una disminución de la proteína LONP1

respecto a su control. Sin embargo tras la exposición a CCCP, los niveles de esta proteína se equiparán al control sin tratar.

Tras el análisis previo de la proteína LONP1 en lisados totales y tras el aislamiento de la fracción mitocondrial, decidimos analizar los niveles de esta proteína tras diferentes tiempos de incubación de los extractos, en combinación o no con CCCP.

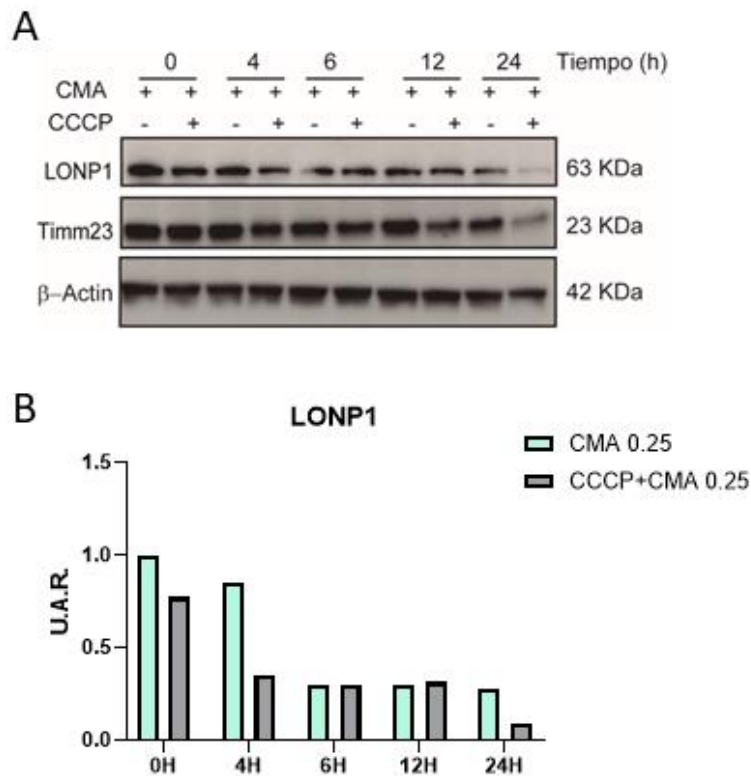


Figura 30. Determinación de los niveles de la proteína LONP1. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se trataron con el extracto de cascabello maduro (CMA 0,25%), con o sin CCCP, 10 μ M, a diferentes tiempos (0,4,6,12 y 24h). Se procesaron, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra blots representativos de los niveles de LONP1, TIMM23 y β -actina. B. Análisis densitométrico de LONP1 con respecto al control de carga β -actina, expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Tras el análisis de LONP1 a diferentes tiempos de exposición con CMA (**Figura 30**), observamos de nuevo que a 4h existe una disminución de los niveles de LONP1, siendo más acusado en presencia de CCCP. La disminución de los niveles de la proteína se mantiene a lo largo de los tiempos analizados, aunque sin diferencias apreciables entre el tratamiento con CMA solo o en combinación con el desacoplante mitocondrial, salvo a 24h, donde el tratamiento combinado presenta una mayor disminución de los niveles de LONP1 que solo en presencia de CMA.

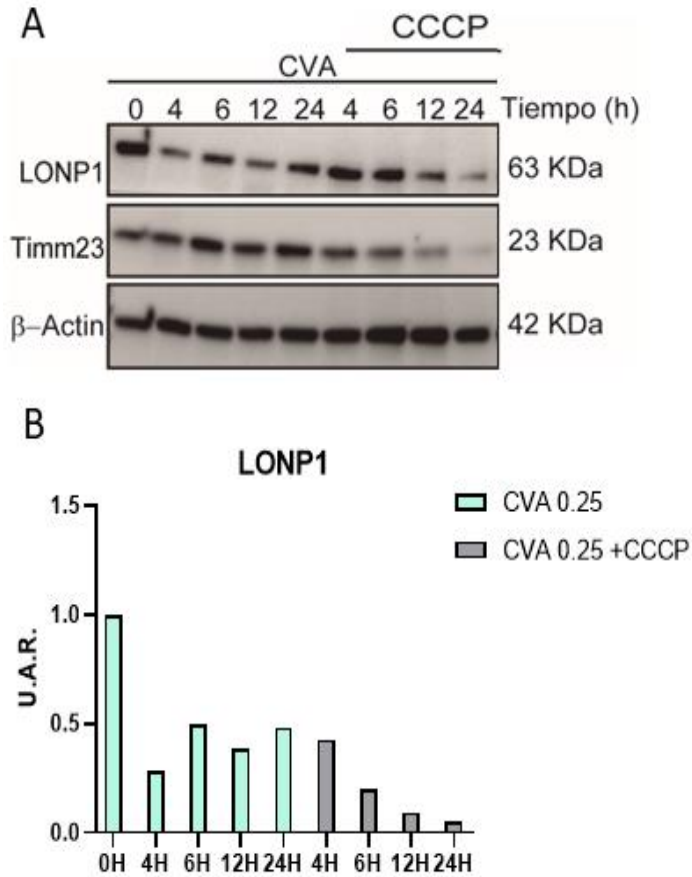


Figura 31. Determinación de los niveles de la proteína LONP1. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, se trataron con el extracto de cascabello verde (CVA 0,25%), con o sin 10 μ M de CCCP, a diferentes tiempos (0,4,6,12 y 24h). Se procesaron, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra blots representativos de los niveles de LONP1, TIMM23 y β -actina. B. Análisis densitométrico de LONP1 con respecto al control de carga β -actina, expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Si analizamos los niveles de la proteína LONP1 tras la exposición a CVA durante diferentes tiempos (**Figura 31**), podemos observar que la proteína LONP1 disminuye de forma fluctuante en todos los tiempos mostrados.

5.3.1.3 Papel de NIX

La proteína NIX (también conocida como BNIP3L o BCL2/adenovirus E1B 19kDa *Interacting Protein 3-Like*) desempeña un papel importante en la mitofagia. NIX es un receptor de ubiquitina que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias. En estado activado, NIX interactúa con la proteína LC3, que es un componente esencial de los autofagosomas. Esta interacción entre NIX y LC3 ayuda a reclutar y anclar las mitocondrias dañadas a los autofagosomas. (Springer et al., 2021a)

De esta manera, nos propusimos analizar el posible papel de NIX en la mitofagia inducida tras el tratamiento con CVA, y para ello analizamos mediante WB los niveles de dicha proteína en la fracción mitocondrial. En paralelo analizamos el señalizador de mitocondrias dañadas p62, en las mismas condiciones.

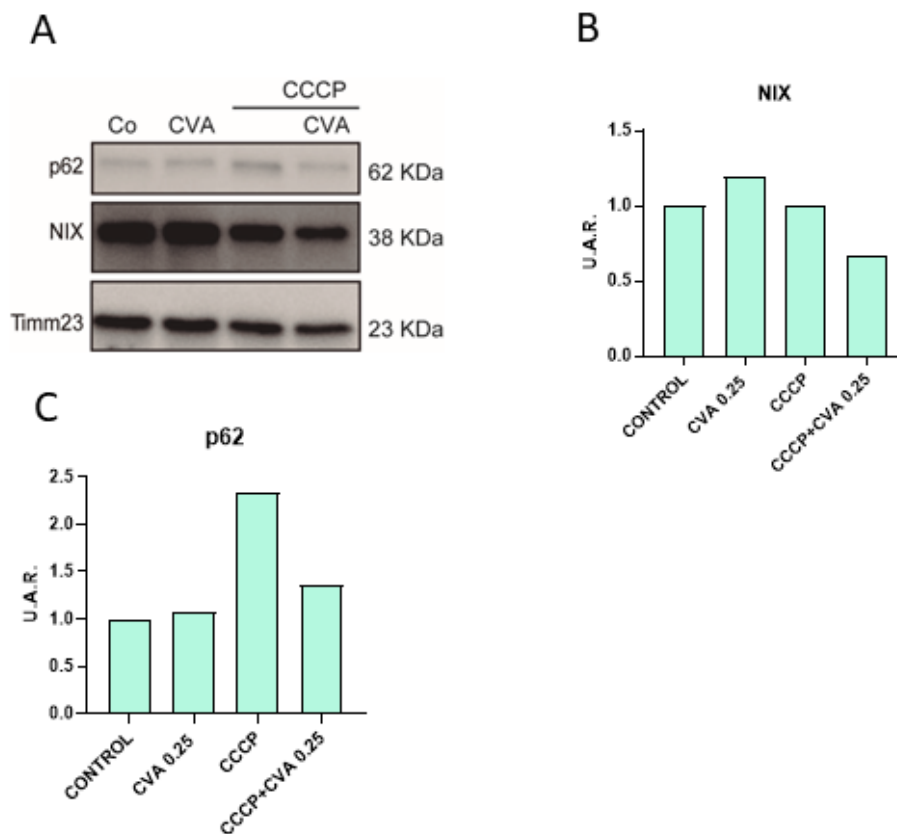


Figura 32. Determinación de los niveles de la p62 y NIX, tras un aislamiento mitocondrial. Las células SH-SY5Y, se mantuvieron en condiciones basales (Co), o bien se trataron el con el extracto de cascabello de bellota verde (CVA 0,25%), con o sin (CCCP, 10 μ M), durante 4 horas. Tras el tratamiento, las células se recogieron y lisaron mediante el protocolo de extracción citosólica y mitocondrial, incluido en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra blots representativo de los niveles de p62, NIX y TIMM23. B. Análisis densitométrico de NIX con respecto al control de carga mitocondrial TIMM23 expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de p62 con respecto

al control de carga mitocondrial TIMM23 expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R).

Como se observa en la **Figura 32**, existe un ligero aumento de los niveles de la proteína NIX en la mitocondria de las células tratadas con el CVA, no así en presencia del desacoplante CCCP, solo, o en combinación con el cascabullo.

En cuanto a los niveles de p62 mitocondriales, estos son muy elevados en presencia de CCCP.

5.4 Protección del estrés mitocondrial tras la exposición de los extractos de cascabullo de bellota

Actualmente se sabe que la regulación del estrés oxidativo es clave para el desarrollo de múltiples enfermedades, entre ellas las enfermedades neurodegenerativas, como la EP, además sabemos que la mitocondria es la principal productora de ROS, por lo que es necesario un equilibrio en la producción para el correcto funcionamiento celular. De esta manera nos planteamos si la exposición a los extractos de cascabullo podría tener un efecto protector frente al estrés mitocondrial, inducido en presencia de rotenona, un inhibidor del complejo II mitocondrial.

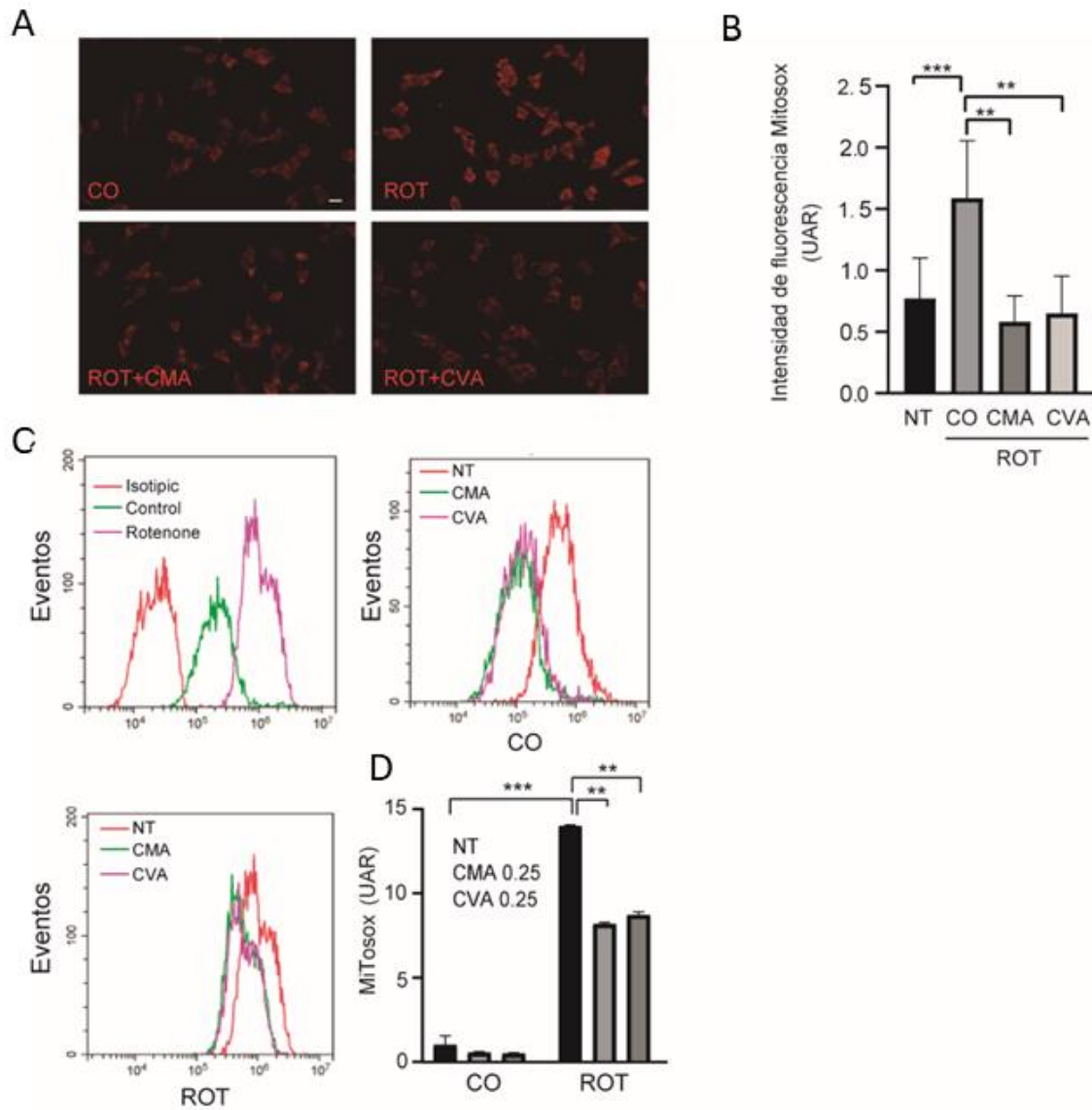


Figura 33. Protección de los extractos de cascabellos de bellota frente al estrés mitocondrial inducido por rotenona en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. A, B. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron tratadas o no, control (Co), con extractos de cúpula de bellota madurada (CMA) y verde (CVA) al 0,25%, solos o en combinación con 100 μ M de rotenona (ROT) durante 4 h. El estrés mitocondrial se midió mediante la oxidación del fluorocromo Mitosox, por el superóxido mitocondrial, provocando un aumento de la fluorescencia. El panel A muestra imágenes representativas para cada una de las condiciones estudiadas, analizadas con el microscopio de inmunofluorescencia Olympus IX-51. La barra de escala representa 10 μ m. El panel B muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias relativas (UAR). Se analizaron al menos 200 células por condición. * Representa diferencias significativas entre tratamientos (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). C, D. Análisis de la fluorescencia emitida por el fluorocromo Mitosox mediante el citómetro de flujo CytoFLEX Beckman Coulter Live Science. Se analizaron al menos 10000 eventos (células) por condición. El panel C muestra los citogramas representativos, mientras que el panel D muestra la cuantificación de la fluorescencia en unidades arbitrarias relativas (UAR). (*) Muestra diferencias significativas entre los grupos celulares estudiados (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Si analizamos los niveles del estrés mitocondrial con Mitosox mediante IF o citometría de flujo (**Figura 33**), podemos observar que tras la exposición de las células SH-SY5Y a rotenona (ROT), se observa un aumento significativo del estrés producido. Sin embargo, cuando tratamos las células con rotenona, tanto en combinación de CMA como de CVA, se observa una disminución significativa con ambos cascabellos del estrés mitocondrial generado por la rotenona.

Por otra parte, analizamos la morfología mitocondrial en presencia del desacoplante CCCP.

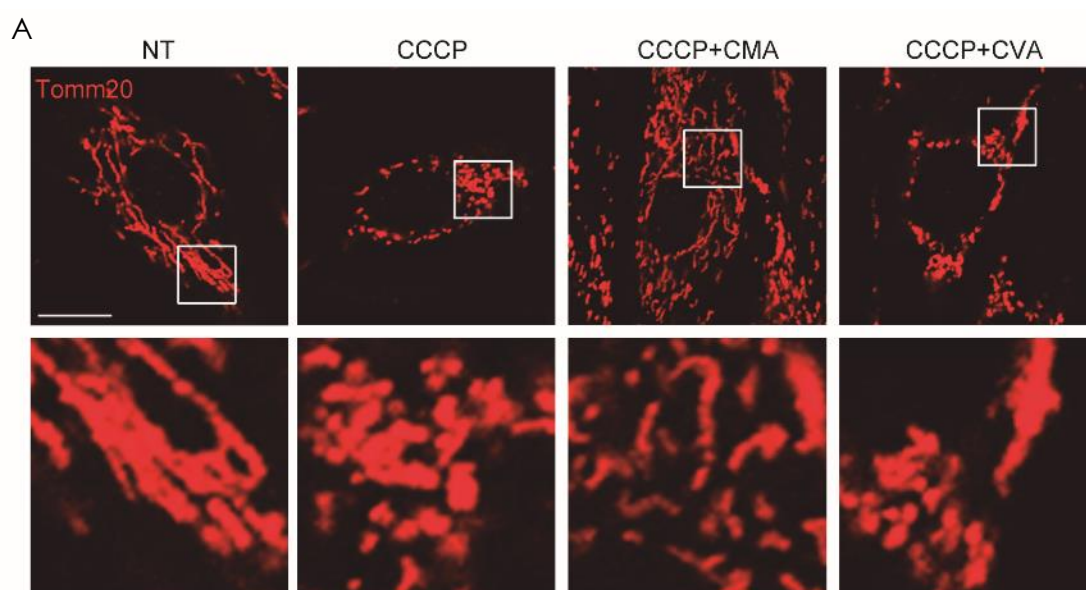


Figura 34. Determinación de la ramificación mitocondrial, mediante el análisis de TOMM20 en fibroblastos WT. Los fibroblastos humanos WT, se mantuvieron en condiciones basales (Co) o bien, fueron tratados con 10 μ M de CCCP, con o sin la presencia de los extractos de cúpula de bellota madura (CMA 0.25%) o verde (CVA 0.25%). Posteriormente se procesaron con el protocolo de inmunofluorescencia contenido en la sección de Materiales y Métodos. A. Se muestran imágenes de cada condición marcadas con TOMM20 en rojo.

En la **Figura 34** observamos que los estudios de IF utilizando un anticuerpo específico que reconoce la proteína externa mitocondrial TOMM20, en presencia de CCCP, se visualiza una morfología puntiforme. Sin embargo, el tratamiento con CMA en este escenario revierte esa morfología puntiforme hacia una morfología más ramificada, indicativo de una mitocondria más saludable. Este hallazgo se aprecia también en las células tratadas con CVA en presencia del desacoplante, aunque no de manera tan significativo a la observada con CMA.

Posteriormente, con la intención de completar el estudio del análisis de la mejora del estado mitocondrial tras el tratamiento de los extractos de cascabello, se realizó una transfección en células SH-SY5Y, con el *reporter* MitoTimer, con el

objetivo de estudiar la calidad de las mitocondrias, tras el tratamiento con ambos extractos de cascabello de bellota.

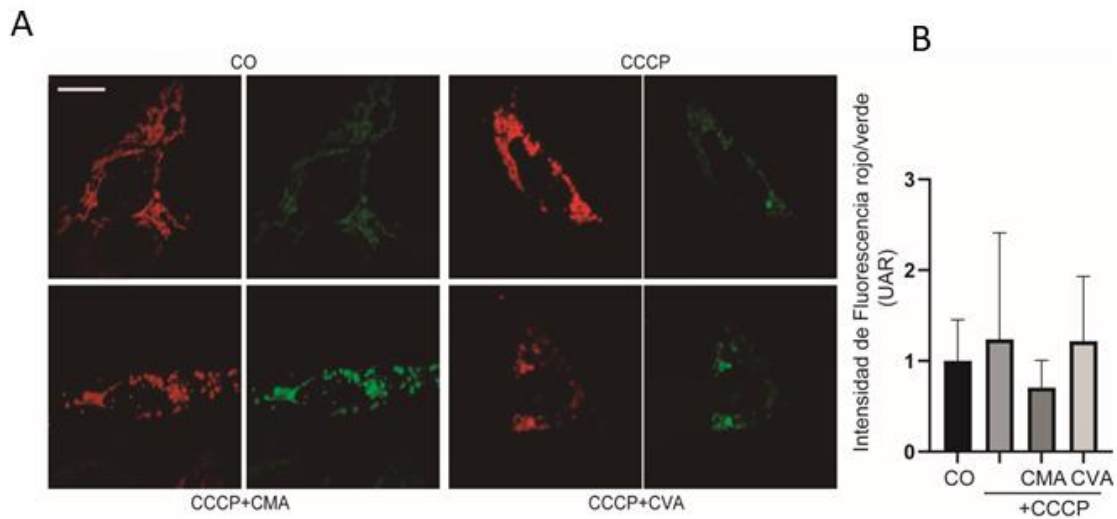


Figura 35. Estudio de la calidad mitocondrial en SH-SY5Y, mediante la expresión del reporter MitoTimer. Las células SH-SY5Y se transfectan con el reporter MitoTimer, de forma estable, como hemos descrito en la sección de Materiales y Métodos. A continuación se mantuvieron de manera basal (Co), o bien fueron tratadas durante 4 h, con los extractos de cascabello maduro (CMA 0,25%) o verde (CVA 0,25%), con o sin CCCP (10 μ M). (A) El panel A muestra imágenes representativas para cada una de las condiciones estudiadas, analizadas con el microscopio de inmunofluorescencia Olympus IX-51 Fluorescencia roja (mitocondrias envejecidas) y verde (mitocondrias de síntesis de "novo") El panel B muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia rojo/verde en unidades arbitrarias relativas (UAR). Se analizaron al menos 200 células por condición.

Podemos observar (**Figura 35**), que las células tratadas con CCCP, aumentaron el ratio, rojo/verde, esto ocurre por un aumento del número de células rojas y por tanto, un aumento de mitocondrias dañadas o envejecidas, en cambio, tras la combinación de CCCP con los diferentes cascabellos, se observa una disminución de este ratio, en el caso de CMA, se observa un aumento de células marcadas en verdes, lo que implica un aumento de la síntesis de "novo". Cuando tratamos las células SH-SY5Y con CCCP en combinación con CVA, también se observa una disminución del ratio, aunque en este caso esta disminución es menos evidente.

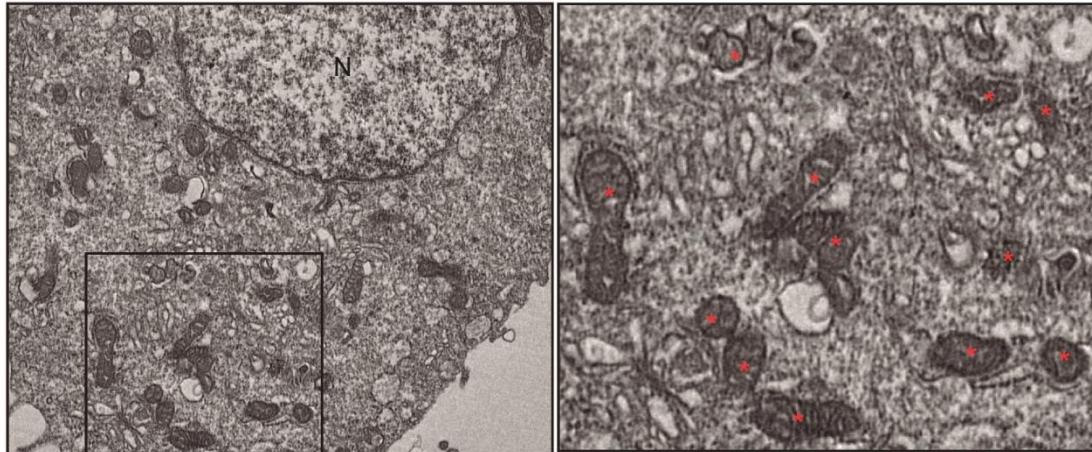


Figura 36. Imágenes ultraestructurales de mitocondrias en células SH-SY5Y tratadas con CMA 0.25%. Las células SH-SY5Y fueron tratadas con extractos de cascabello maduro (CMA 0.25%) durante 4 h. Transcurrido este tiempo los precipitados celulares fueron procesados tal y como se detalla en el apartado de Materiales y métodos. Las fotografías muestran una imagen de microscopía electrónica representativa de varias mitocondrias presentes en el citoplasma celular y la ampliación de las mismas tras el tratamiento con el extracto de cascabello maduro (CMA)

Los datos mostrados en la **Figura 35** donde parece que CMA aumenta la síntesis de “novo” de las mitocondrias, se correlacionarían con el hallazgo a nivel ultraestructural analizado mediante MET observado en presencia de CMA (**Figura 36**), en el citoplasma.

Por otra parte, realizamos un estudio comparativo del metabolismo mitocondrial y de cómo afecta la exposición de los extractos de cascabello, entre células de fibroblastos WT y células de fibroblastos procedentes de pacientes con la mutación G2019S de LRRK2, mediante el analizador metabólico seahorse.

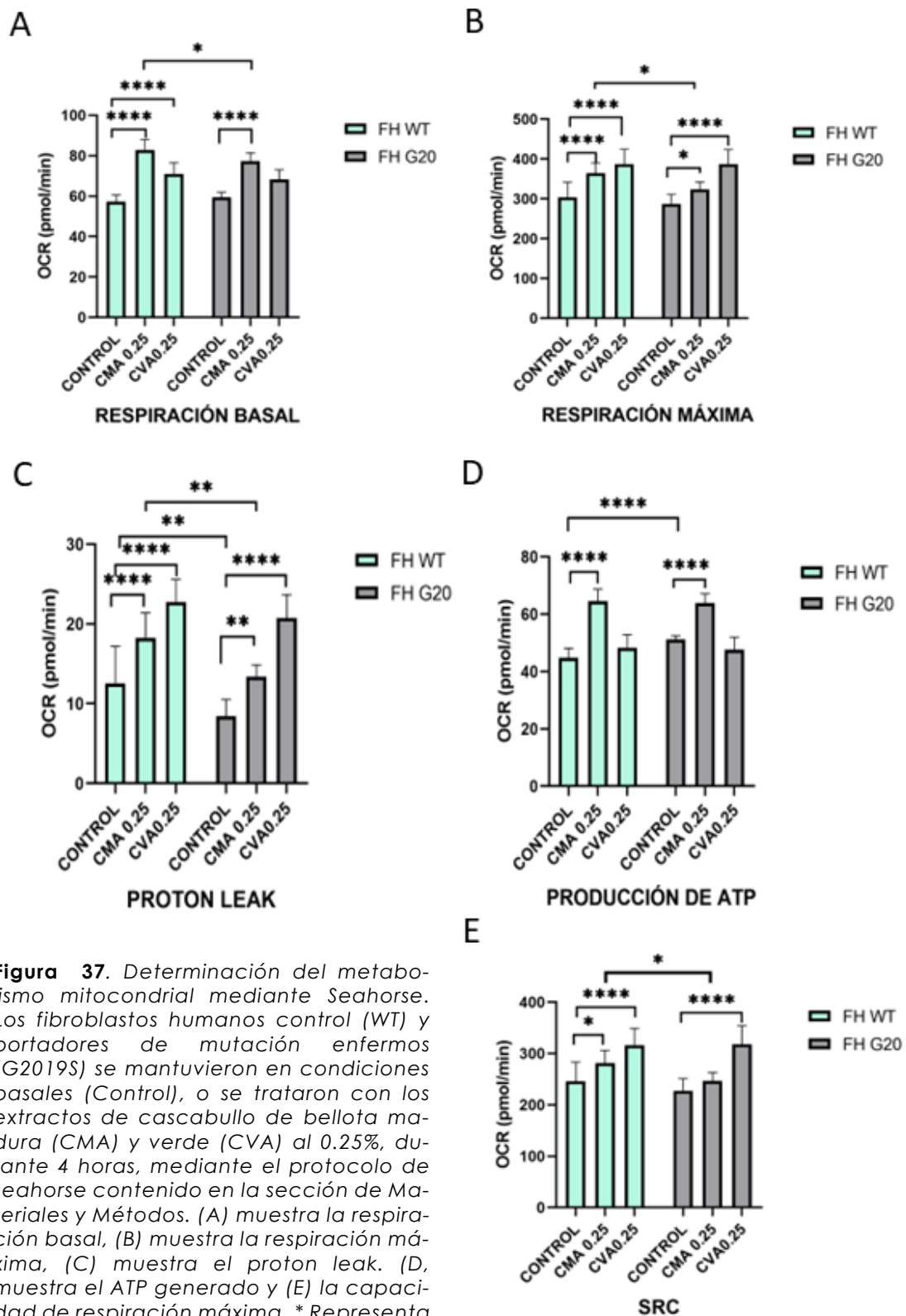


Figura 37. Determinación del metabolismo mitocondrial mediante Seahorse. Los fibroblastos humanos control (WT) y portadores de mutación enfermos (G2019S) se mantuvieron en condiciones basales (Control), o se trataron con los extractos de cascabello de bellota madura (CMA) y verde (CVA) al 0.25%, durante 4 horas, mediante el protocolo de seahorse contenido en la sección de Materiales y Métodos. (A) muestra la respiración basal, (B) muestra la respiración máxima, (C) muestra el proton leak. (D, muestra el ATP generado y (E) la capacidad de respiración máxima. * Representa diferencias significativas entre tratamientos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

El resultado muestra los parámetros calculados en forma de gráfico de barras entre los que se incluyen la respiración ligada a ATP, la fuga de protones, la respiración basal, la respiración máxima y la capacidad respiratoria.

Los datos mostrados tanto en fibroblastos WT como fibroblastos con la mutación G2019S (**Figura 37**), demuestran que el tratamiento con CMA aumenta de manera significativa todos los parámetros nombrados (respiración basal, respiración máxima, producción de ATP, capacidad respiratoria y proton leak) respecto a su control. Además, se observa como este tratamiento aumenta la producción de ATP en fibroblastos G2019S por encima de su control WT (**fig 37.D**), siendo este aumento significativo. Por otra parte el tratamiento con CVA, al igual que CMA produce un aumento en todos los parámetros, sin embargo este aumento sólo es significativo en la respiración máxima (**fig 37.B**), el proton leak (**fig 37.C**), y la capacidad respiratoria (**fig 37.E**).

Tras el estudio del metabolismo mitocondrial mediante seahorse, decidimos investigar los niveles de TFAM. Este factor de transcripción es clave en el metabolismo del ADNmt, ya que interviene en la compactación y el ensamblaje del ADNmt en nucleoides, estructuras en las que se cree que se produce la replicación y la transcripción del ADNmt. (Kozhukhar & Alexeyev, 2022)

En definitiva TFAM, es la primera proteína de mamífero que se ha demostrado que regula el número de copias de ADNmt que es esencial para la biogénesis mitocondrial y el desarrollo embrionario.

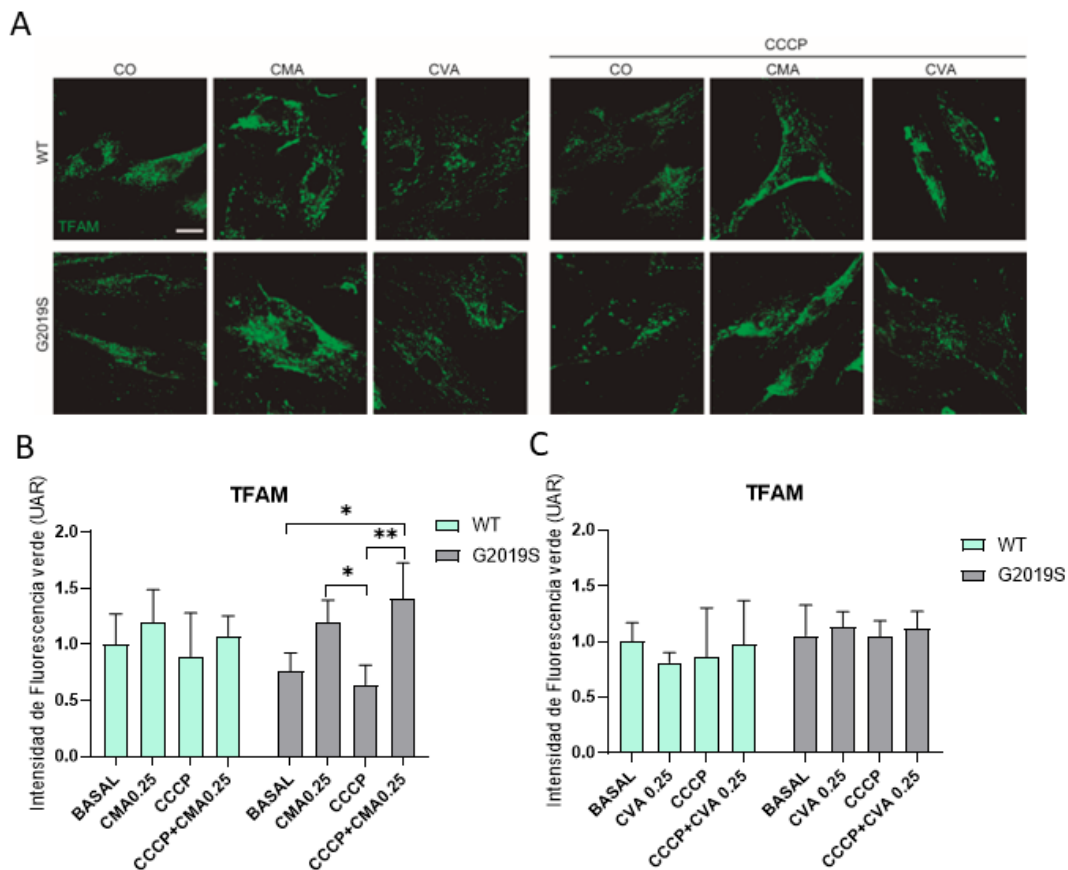


Figura 38. Determinación de del factor de transcripción A (TFAM) en fibroblastos controles y procedentes de enfermos de Parkinson. Los fibroblastos humanos control (WT) y portadores de mutación enfermos (G2019S) se mantuvieron en condiciones basales (co), o se trataron con los extractos de cascabello de bellota madura (CMA) y verde (CVA) al 0.25%, durante 4 horas, solos o en combinación de 10 μ M de CCCP. (A) muestra la fluorecencia en verde de células marcadas con TFAM. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio Olympus X1-51. (B) Muestra la cuantificación de la intensidad de la proteína TFAM, por condición. * Representa diferencias significativas entre tratamientos (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Si analizamos los niveles de TFAM (**Figura 38**), en células de fibroblastos WT y en células de fibroblastos con la mutación G2019S, tras el tratamiento de CMA, solos o en combinación con CCCP, observamos un aumento o tendencia al alza, pues sólo en fibroblastos G2019S se observa un aumento de manera significativa. Mientras en el tratamiento con CCCP se observa una disminución, que resulta significativa para los fibroblastos que presentan la mutación G2019S.

No obstante, cuando analizamos los niveles de TFAM tras el tratamiento de CVA combinado o no con CCCP, en los fibroblastos WT, se aprecia una disminución con CVA sólo, sin embargo en fibroblastos con la mutación G2019S no se observan cambios aparentes.

Además para completar el estudio, a continuación mostramos los datos obtenidos tras el estudio de ADNmt por cada condición.

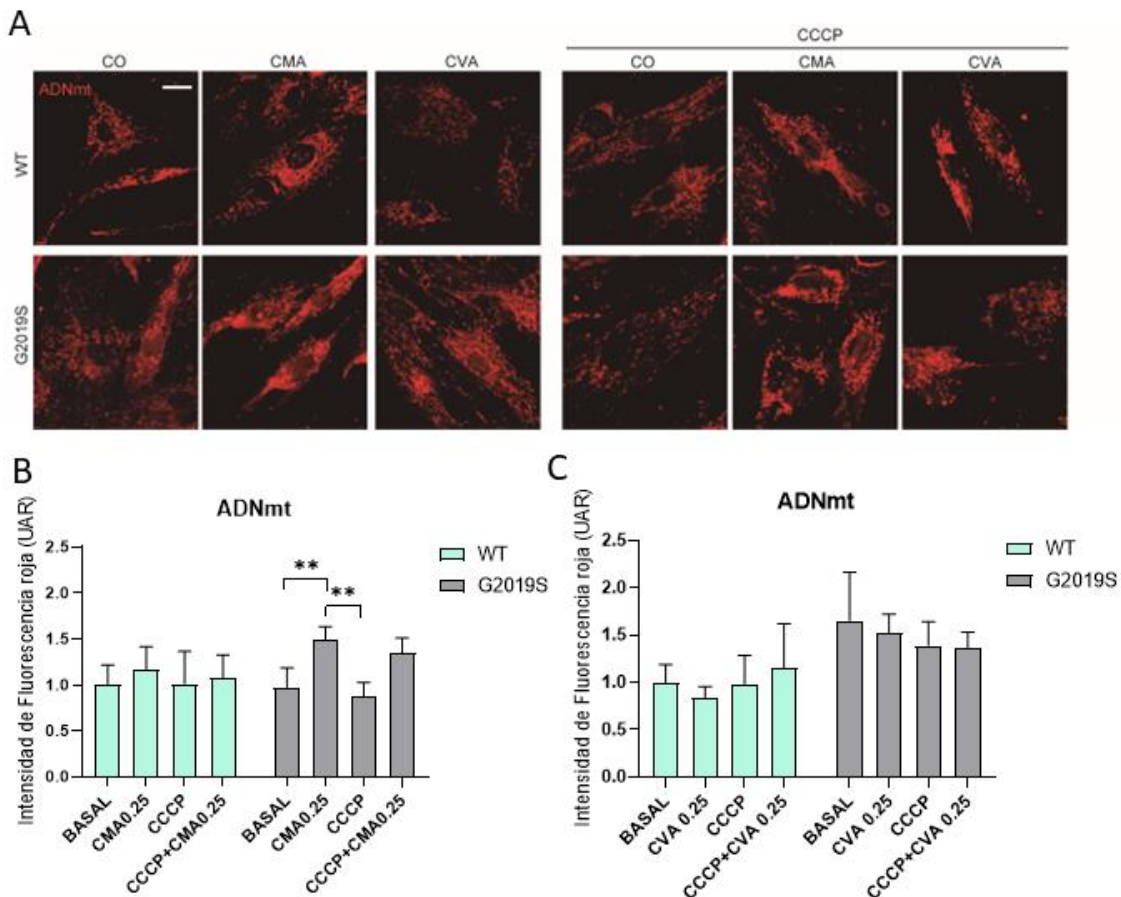


Figura 39. Determinación de ADNmt en fibroblastos controles y procedentes de enfermos de Parkinson. Los fibroblastos humanos control (WT) y portadores de mutación enfermos (G2019S) se mantuvieron en condiciones basales (Co), o se trataron con los extractos de cascabello de bellota madura (CMA) y verde (CVA) al 0.25%, durante 4 horas, solos o en combinación de 10 μ M de CCCP. (A) Muestra la fluorescencia en rojo de células marcadas con ADNmt. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio Olympus X1-51. (B) Muestra la cuantificación de la intensidad de la proteína ADNmt, por condición. * Representa diferencias significativas entre tratamientos (**, $p < 0.01$).

Si analizamos los niveles de ADNmt (**Figura 39**), al igual que analizamos TFAM (**Figura 38**), en células de fibroblastos WT y en células de fibroblastos con la mutación G2019S, podemos observar de nuevo como tras el tratamiento de CMA, solos o en combinación con CCCP, observamos un aumento o tendencia al alza, y que sólo en fibroblastos G2019S se observa un aumento de manera significativa. Por otro lado el tratamiento con CCCP provoca una disminución, que resulta significativa para los fibroblastos que presentan la mutación G2019S.

No obstante, tras analizar los niveles de ADNmt tanto en los fibroblastos portadores o no de la mutación patológica en presencia del tratamiento con CVA, se aprecia una tendencia a la baja tanto en presencia como en ausencia del desacoplante.

Con el objetivo de poder ampliar los estudios que corroboren una posible inducción de biogénesis mitocondrial, se realizaron estudios mediante WB de diversas proteínas relacionadas con este proceso. Una molécula clave en la regulación de la biogénesis es la proteína PGC1 α , que juega un papel importante en la formación mitocondrial y la regulación del metabolismo de la glucosa y los lípidos. (Zeng & Chen, 2022)

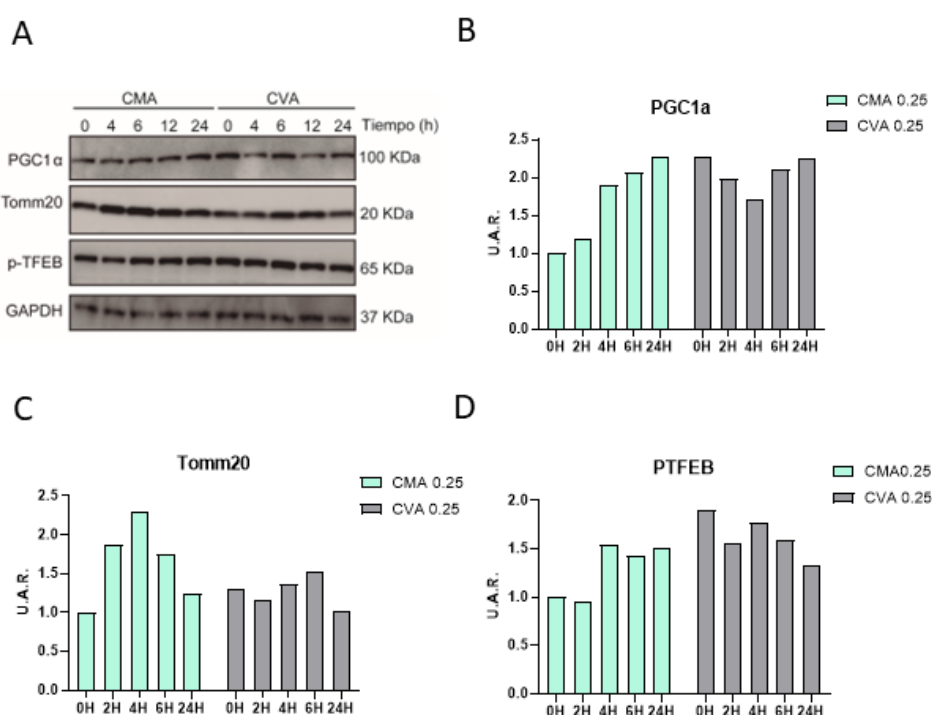


Figura 40. Determinación de los niveles de las proteínas (PGC1 α , Tomm20 y P-TFEB) en células de osteosarcoma (U2OS). Las células de osteosarcoma humano U2OS, que expresan GFP-RFP-LC3 se trataron con los extractos de cascabello maduro (CMA) y verde (CVA) al 0,25% en diferentes tiempos (0,4,6,12 y 24h). Tras el tratamiento las células se recogieron y lisaron, según se explica en la sección de Materiales y Métodos. A. Muestra blots representativo de los niveles de PGC1 α , TOMM20 y P-TFEB. B. Análisis densitométrico de PGC1 α con respecto al control de carga GAPDH expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). C. Análisis densitométrico de TOMM20 con respecto al control de carga GAPDH expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.). D. Análisis densitométrico de p-TFEB con respecto al control de carga GAPDH expresado en unidades arbitrarias relativas (U.A.R.).

Los datos mostrados tras el tratamiento con CMA (**Figura 40**), sugieren que los niveles de PGC1 α aumentan de manera tiempo-respuesta. En el caso de TOMM20, sin embargo, este aumento se cumple hasta llegadas las 6 horas, que comienza a descender. La proteína p-TFEB por su parte aumenta a partir de las 4 horas de exposición a CMA, dicho aumento además se mantiene hasta las 24 h, inclusive.

Por otra parte, tras el tratamiento con CVA a diferentes tiempos, podemos observar que la proteína PGC1 α (**Fig. 40.B**) y la proteína p-TFEB (**Fig. 40.D**) presentan

una tendencia a la baja, no obstante la proteína TOMM20(Fig. 40.C) presenta valores variables independientes del tiempo.

5.5 Protección o viabilidad celular

El análisis de la viabilidad celular o de la protección que el tratamiento con los extractos de cascabello podía causar sobre las células, fue fundamental para dilucidar que estos tratamientos suponían un efecto positivo sobre el organismo, por ello tanto los fibroblastos humanos WT como aquellos que poseían las mutaciones R1441G y G2019S, fueron tratados con los extractos de cascabello maduro (CMA) y verde (CVA).

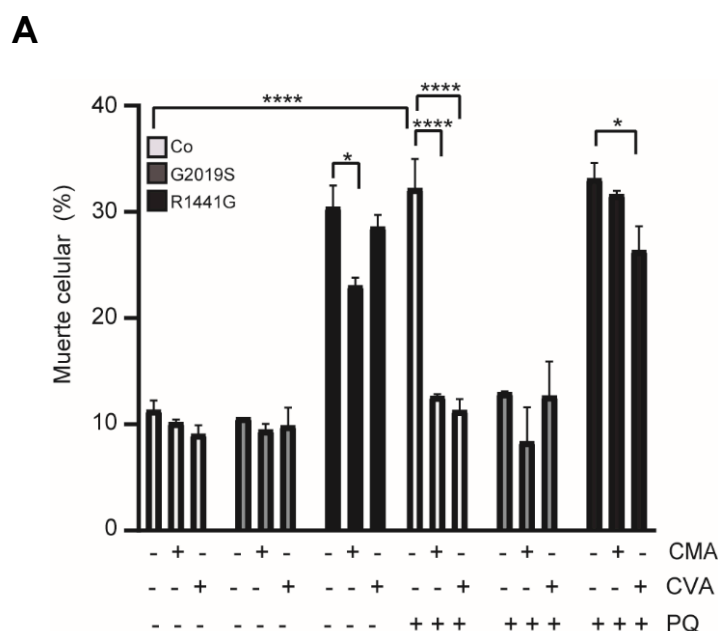


Figura 41. Protección de la muerte celular por extractos de cúpula de bellota en fibroblastos humanos. Los fibroblastos humanos con o sin mutación fueron tratados o no con 0,5 % de extractos de cúpula de bellota madura (CMA) o extractos de cúpula de bellota verde (CVA) solos o en combinación con 100 μ M de paraquat (PQ), durante 24 h. La muerte celular se midió mediante la incorporación de yoduro de propidio. Las células (10.000 eventos por condición) se analizaron con el citómetro Beckman Coulter FC-500. *Representa diferencias significativas entre los grupos celulares estudiados (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,0001$).

En la **Figura 41**, mostramos que el porcentaje de muerte celular en presencia de ambos cascabellos, disminuyó tanto en los fibroblastos control como en los fibroblastos que presentaban una de las mutaciones LRRK2, sin embargo solo el descenso con el tratamiento de CMA en fibroblastos R1441G fue significativo.

Por otro lado, las células fueron tratadas con paraquat (PQ), tras este tratamiento, el porcentaje de muerte celular aumentó significativamente, sin embargo, cuando las células fueron tratadas con CMA y CVA en combinación, con el insecticida PQ, el porcentaje de muerte celular descendió

significativamente tanto en fibroblastos controles como en fibroblastos con la mutación R1441G.

5.6 Actividad locomotora y vida media (*Drosophila Melanogaster*)

Posteriormente, y para corroborar los resultados obtenidos (**Figura 42**) se realizó, un estudio en tres modelos de *Drosophila melanogaster* (Dm), con o sin la mutación LRRK2 en el que analizamos la vida media y la actividad locomotora.

Para ello, se propone a un grupo colaborador (grupo de Adolfo López de Munáin, en País Vasco) la realización de un estudio "in vivo" con tres modelos de (Dm) uno de ellos, será un modelo sano, o control mientras que de los otros dos, uno presentará la mutación G2019S LRRK2 y otro la mutación R1441C LRRK2. Actualmente se sabe que a las 3 y 4 semanas de vida, las moscas pueden desarrollar un déficit locomotor detectable significativo. Por ello, se utilizan estas semanas para llevar a cabo dicho estudio.

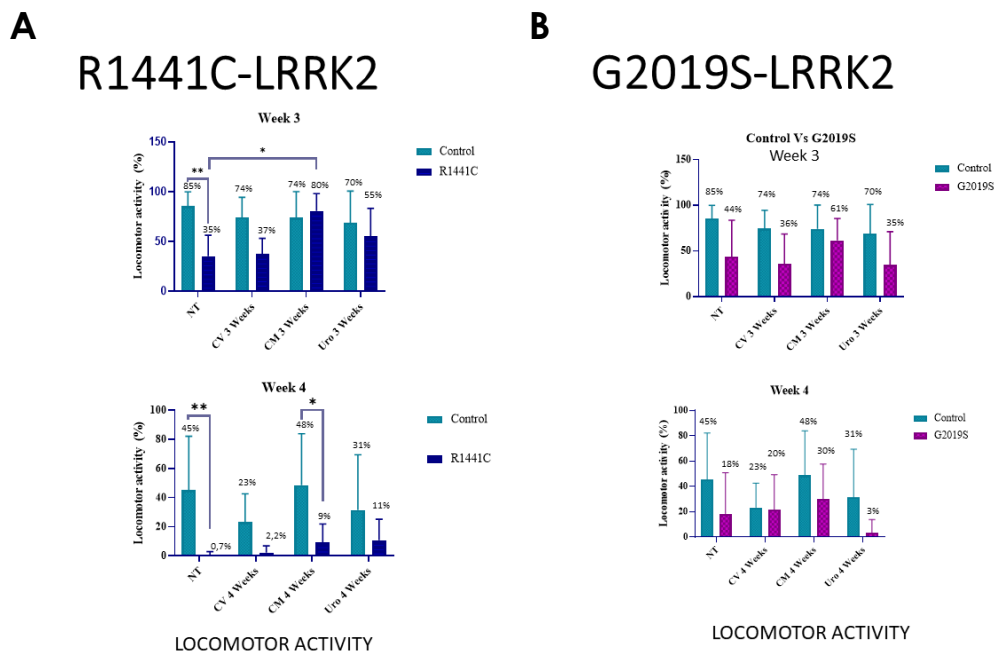


Figura 42. Determinación de la actividad locomotora en modelos de Parkinson. Tanto al modelo de *Drosophila melanogaster* que presentaba la mutación G2019S como aquel que presentaba la mutación R1441C, se le analizó su actividad locomotora a las 3 y/o 4 semanas de vida en presencia o no de los extractos de cascabello maduro (CMA) y verde (CVA) o de urolitina. Posteriormente el modelo fue procesado según el protocolo descrito en materiales y métodos. (A). Muestra los resultados analizados a las 3 semanas de la actividad locomotora de todas las condiciones. (B). Muestra los resultados analizados a las 4 semanas de la actividad locomotora de todas las

condiciones. * Representa diferencias significativas entre los grupos de *Drosophila melanogaster* estudiados (**, $p < 0,05$; ***, $p < 0,01$)

En la **Figura 42** observamos como basalmente (NT), tanto a las 3 como a las 4 semanas de experimento, la actividad locomotora en presencia de ambas mutaciones disminuye con respecto a su control WT, siendo la disminución con la mutación R1441C significativa.

Por otro lado, en cuanto a los tratamientos: Mientras el tratamiento con CVA no parece ser capaz de revertir este déficit, el de CMA es capaz de revertir el déficit locomotor en el modelo R1441C. En el tratamiento de urolitina A se observa una tendencia a mejorar la actividad locomotora aunque no es significativa

En cuanto al modelo G2019S, tanto CMA como la urolitina A, presentan una tendencia a mejorar la actividad locomotora aunque como he comentado, no de forma significativa.

A

R1441C-LRRK2

Vida media

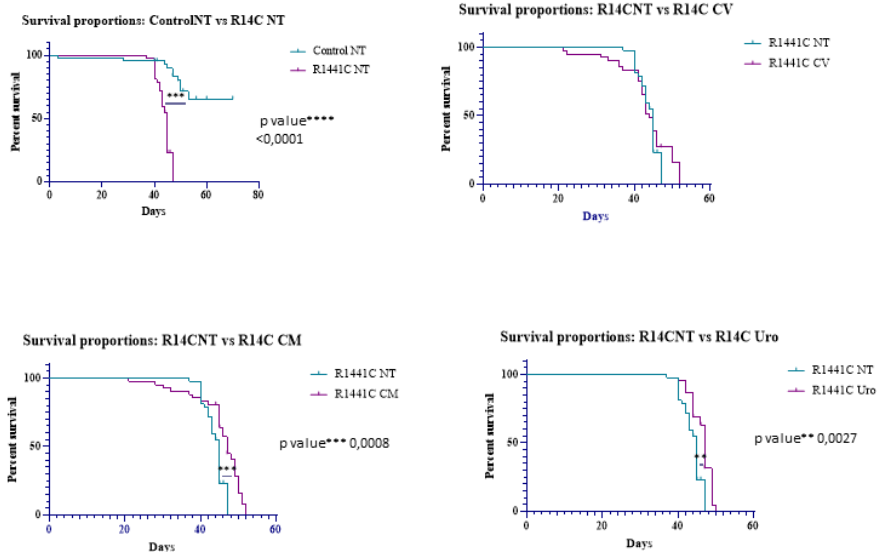


Figura 43. Determinación de la vida media en un modelo de Parkinson. El modelo de *Drosophila melanogaster* en presencia o no de la mutación R1441C se mantuvo en condiciones basales (NT) o se trató con los extractos de cascabello verde (CVA) y maduro (CMA, además de con Urolitina A. (A). Muestra los resultados de vida media del modelo R1441C respecto a un control WT. * Representa diferencias significativas entre los grupos de *Drosophila melanogaster* estudiados (**, $p < 0,05$; ***, $p < 0,01$)

En la **Figura 43**, podemos observar que el modelo R1441C presenta una reducción muy significativa de la vida media y por consecuencia una reducción en la esperanza de vida del modelo con respecto al control WT. Además tanto el CMA como la urolitina son capaces de revertir significativamente este déficit.

Por su parte, el tratamiento con CVA no parece ejercer un impacto destacable en este modelo.

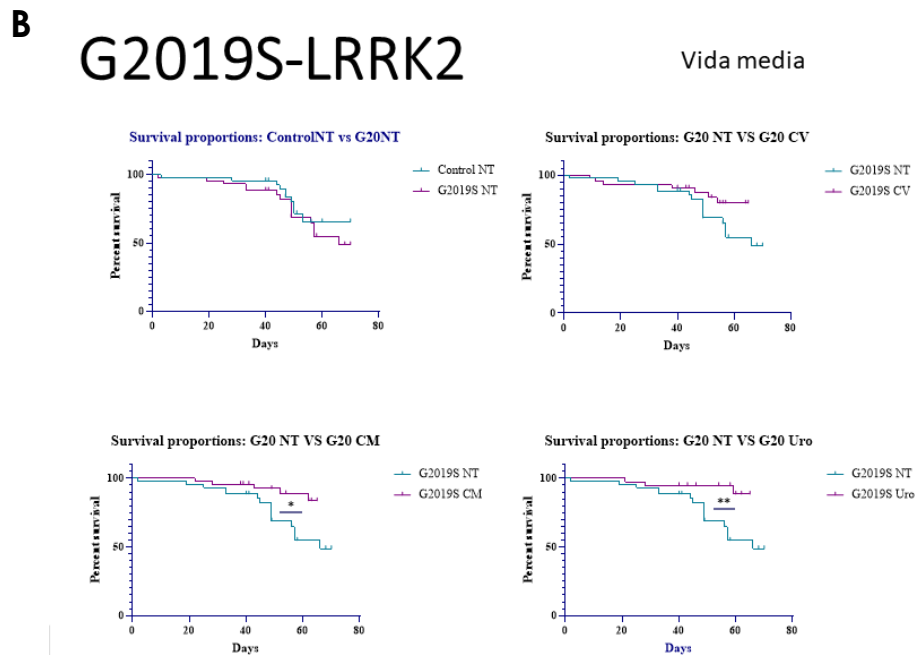


Figura 44. Determinación de la vida media en un modelo de Parkinson. El modelo de *Drosophila melanogaster* en presencia o no de la mutación G2019S se mantuvo en condiciones basales (NT) o se trató con los extractos de cascabello verde (CVA) y maduro (CMA, además de con urolitina A. (A). Muestra los resultados de vida media del modelo R1441C respecto a un control WT. * Representa diferencias significativas entre los grupos de *Drosophila melanogaster* estudiados (**, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$)

En cuanto al ensayo de la vida media en presencia de la mutación G2019S (**Figura 44**), no observamos una disminución significativa de forma basal de la vida media respecto al control. Sin embargo, sí parece que tanto el cascabello maduro como la urolitina A respecto a su control, aumentan la esperanza de vida de estas moscas.

Discusión

Las enfermedades neurodegenerativas, representan un grupo de trastornos crónicos que afectan principalmente al SN, entre estas se encuentra la EP. Algunos estudios han escrito que entre los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de estas enfermedades destacan la alteración de la degradación y reciclaje celular (Lizama & Chu, 2021; Lu et al., 2020). Además según Lu et al., 2020 y Simon et al., 2020, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la agregación de proteínas, la autofagia alterada y la neuroinflamación, son los principales factores predisponentes de la EP. En este contexto, los compuestos naturales ricos en polifenoles son objeto de un creciente interés, pues éstos poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras (García-Villalba et al., 2023) que pueden modular la actividad de la macroautofagia y la mitofagia, aumentando la eliminación de proteínas agregadas y mitocondrias disfuncionales (Chahar et al., 2011), y secundariamente, mejorando el estrés oxidativo y la inflamación, asociados a este tipo de patologías.

Nuestros resultados comprobaron que los extractos de cúpula de bellota, al igual que la propia bellota *Quercus ilex* (Cantos et al., 2003) poseen una alta concentración en compuestos fenólicos, como los elagitaninos (W. Huang et al., 2008) y actividades antioxidantes (**Tabla 22**), siendo esta concentración superior en el extracto de mayor estado de maduración (CMA) (**Fig. 1**), y no resultando tóxicos para las células en ningún caso (**Fig. 2**).

En este trabajo hemos podido demostrar que los extractos de cascabello de bellota, independientemente de su estado de maduración, son capaces de inducir autofagia, tanto en modelos celulares (**Fig. 6,7,8 y 9**) como en un modelo murino (**Fig. 10 y 11**) demostrando que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). Además ambos inducen la degradación selectiva de las mitocondrias (mitofagia) en un contexto de enfermedad, como en presencia de mutaciones patogénicas de LRRK2, implicadas en la EP (**Fig. 20, 21 y 22**). En este sentido se ha demostrado su capacidad de proteger a las mitocondrias del estrés oxidativo frente a pesticidas como la rotenona (**Fig. 33**), mejorando la calidad de estas. Por otra parte hay que reseñar que CMA ha demostrado tener la capacidad de aumentar la síntesis de "novo" de mitocondrias, generando el aumento de la biogénesis de este organelo (**Fig. 35, 36, 38 y 39**). Además en

nuestro trabajo observamos una protección frente a la viabilidad celular de fibroblastos portadores de mutaciones de LRKK2 expuestos al pesticida PQ tras el tratamiento con los extractos (**Fig. 41**), así como a una mejora, tanto de la capacidad locomotora, como del aumento de vida media en un modelo de *Drosophila* portador de estas mismas mutaciones relacionadas con la EP. (**Fig. 42, 43 y 44**).

La deficiencia de autofagia y/o la disfunción de la autofagia debido a la reducción de la función lisosomal en las neuronas contribuye a la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas, en este contexto los extractos de cascabello han demostrado ser capaces de aumentar la masa lisosomal *in vitro*, (**Fig. 14**), asimismo sugieren un aumento de la degradación de proteínas de vida media (**Fig. 13.B**). Además con relación a la caracterización de la autofagia, los resultados obtenidos con ambos extractos de cascabello señalan una inducción del mecanismo de autofagia (**Fig. 3, 4 y 5**), del mismo modo que lo hacen otros polifenoles entre los que se encuentran el resveratrol, la quercitina o la gallocatequina, (Rafatian et al., 2012; Yamamoto et al., 2010); (Tan et al., 2019).

En este trabajo la inducción de la autofagia se ha evidenciado por la presencia de vacuolas de autofagia observadas mediante MET (**Fig. 13.A**), o el aumento de los niveles de los genes de autofagia (**Fig. 3, 4 y 5**), entre otros. Además el tratamiento con CMA, señala el aumento de la acumulación de estructuras LC3 positivas colocalizadas con p62 tras el bloqueo de la autofagia con Baf.A1 (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.12), hecho que confirma la posible implicación de este extracto como responsable de la estimulación de esta vía degradativa (Lin et al., 2014; Pankiv et al., 2007). Sin embargo nuestros hallazgos aun no son suficientes para señalar el mecanismo por el que nuestros extractos son capaces de inducir autofagia, aunque, en este sentido hemos visto que la vía de ATG5 es clave para la formación de la isoforma II de LC3 (**Fig. 15 y 16**), al igual que ocurre con otros polifenoles como el resveratrol (Mauthe et al., 2011). El resveratrol sigue siendo muy estudiado actualmente pues, aunque la vía exacta sigue siendo desconocida (Kung et al., 2021b) algunos estudios creen que sigue una vía independiente de BECLIN1 (Mauthe et al., 2011), tal y como sugieren nuestros resultados (no mostrados) y que además modula los procesos celulares mediante la activación de sensores/efectores metabólicos clave, incluida AMPK, la SIRT1 y PGC-1 α) (Kou & Chen, 2017b). En

este sentido parece que en el mecanismo de activación de la autofagia mediada por los extractos podría estar involucrada la proteína AMPk (**Fig. 19**), sin embargo nuestros resultados señalan que el silenciamiento de TSC2 (regulador negativo de la vía mTOR) no es suficiente para inhibir el mecanismo de autofagia (**Fig. 17 y 18**), por lo que sugerimos que existen otros mecanismos mediante los cuales los extractos modulan este proceso degradativo.

Actualmente la disfunción mitocondrial se relaciona con un aumento del estrés oxidativo o de la agregación de proteínas mal plegadas, como la alfa-sinucleína, presente en la EP (Peng et al., 2016).

Asimismo sabemos que para el mantenimiento de una función mitocondrial adecuada se necesita una correcta dinámica mitocondrial, y que para ello se necesita una regulación estricta de la biogénesis y la eliminación de las mitocondrias (mitofagosoma). En base a esto, durante este trabajo nos hemos centrado en estudiar el efecto que nuestros extractos, pueden tener sobre la dinámica mitocondrial, tanto en modelos sanos como en modelos de EP. En este sentido nuestros resultados señalan, del mismo modo que lo hace la granada (Tan et al., 2019), nuestros extractos tienen la capacidad de activar la mitofagia, hallazgo que observamos tras un estudio de colocalización entre LAMP1 y TOMM20 (**Fig. 20**), o la formación de mitofagosomas (**Fig. 36**) y que además corroboramos en un estudio con células mitoQc, que como hemos comentado permiten hacer un seguimiento de la mitofagia al distinguir las mitocondrias citosólicas de las mitocondrias entregadas a los lisosomas ácidos, mediante el reporter mitoQc con la etiqueta *mCherry-GFP* en tándem localizada en la membrana externa mitocondrial, de tal manera que cuando las mitocondrias se dirigen a los lisosomas (mitofagia), pierden la señal GFP, y aumenta la señal *mCherry*, solo en rojo. (**Fig. 22**). No obstante el mecanismo por el que activan la mitofagia aún no está claro. Actualmente la vía más importante que regula la mitofagia es la vía PINK1/PARKIN (Lazarou et al., 2015). En este sentido nuestros resultados señalan un aumento de PINK1 en la mitocondria tanto con CMA como con CVA (**Fig. 25**). Del mismo modo ocurre en los estudios realizados con extractos de granada en los que también se observa este aumento (Tan et al., 2019). Sin embargo, este resultado no se corrobora de forma basal con un aumento de los niveles mitocondriales de la proteína p-Ubser65 (**Fig. 26**), que como sabemos se fosforila por PINK1 cuando esta se acumula en la mitocondria, con la

intención de reclutar y activar parcialmente a PARKINA y dar lugar a la mitofagia (Masaldan et al., 2022), en definitiva la activación de PARKINA esta mediada por la activación previa de la p-Ubser65. Sin embargo, observamos que tras un daño previo con CCCP si se aprecia ese aumento de los niveles de la ubiquitina fosforilada (datos no mostrados). Por otra parte nuestros datos sugieren que el tratamiento con CVA, aumento de los niveles de la proteína BNIP/NIX en la mitocondria (**Fig. 32**). BNIP3/NIX es un receptor de ubiquitina que se localiza en la membrana externa de las mitocondrias. En estado activado, NIX interactúa con la proteína LC3, y ayuda a reclutar y anclar las mitocondrias dañadas a los autofagosomas (Palikaras et al., 2018; Springer et al., 2021a). Algunos estudios sugieren que NIX es una proteína responsable de facilitar la eliminación mitocondrial, en los casos en los que la vía PINK/PARKIN no responden, por lo tanto, es responsable de restaurar la función mitocondrial normal a pesar de la falta de la vía PINK1/PARKIN (Masaldan et al., 2022), este hallazgo podría explicar una posible vía del mecanismo de la mitofagia inducida por CVA.

Además de la inducción de autofagia observada tras el tratamiento con CMA, este extracto indujo un aumento de la síntesis de "novo" de mitocondrias, correlacionado con un aumento de la masa de este organelo (**Fig. 35**) y de un aumento de los niveles de la proteína PGC1 α (**Fig. 40**), regulador de las funciones mitocondriales y del metabolismo oxidativo que se incrementa también tras el tratamiento con resveratrol (Peng et al., 2016). Asimismo se produce una mejora en la fragmentación mitocondrial que se produce tras la acción del desacoplante CCCP (**Fig. 34**). Estos hallazgos se han encontrado con otros extractos naturales, como los procedentes de la granada (Tan et al., 2019).

Dado que las mitocondrias son fuente del 90 % del ROS celular y la formación y calidad del ADNmt va disminuyendo con la edad (Keogh & Chinnery, 2015), algunos estudios han sugerido que las mutaciones del ADNmt pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la EP (Martín-Jiménez et al., 2020), por ello analizamos el efecto de nuestros extractos tanto sobre el ADNmt como sobre TFAM (factor de transcripción necesario para el mantenimiento de la integridad del ADNmt). Además analizamos los niveles de la proteína LONP1, que según He et al., 2022 es clave para conservar la calidad mitocondrial. En base a estos datos nuestros resultados señalan que CMA aumenta tanto el ADNmt como TFAM (**Fig. 38 y 39**), además promueve un aumento de los niveles de LONP1 después

de 4 h de tratamiento (**Fig. 30**), sin embargo los resultados con CVA sugieren pocos cambios a nivel de biogénesis mitocondrial (**Fig. 31, 38 y 39**). En este sentido estos hallazgos unidos a un aumento de la función mitocondrial tanto en CMA donde se observa un aumento de la respiración basal, la respiración máxima o la producción de ATP, y de proton leak tanto en fibroblastos humanos como en fibroblastos con la mutación G2019S (**Fig. 37**), y en CVA donde se aprecia una mejora de la capacidad respiratoria y la respiración máxima, además de un aumento del proton leak. Estos hallazgos señalan que ambos extractos podrían mejorar la capacidad funcional mitocondrial, en fibroblastos portadores de la mutación G2019S, del mismo modo que otros polifenoles contenidos en frutas como la fresa (Giampieri et al., 2014), mejoran la función mitocondrial y por tanto previenen el desarrollo de múltiples enfermedades, donde está comprometida la función de este organelo, sin embargo son necesarios más estudios para dilucidar la vía de acción de ambos extractos.

Un factor importante en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas como sabemos es la acumulación de ROS y la producción del estrés oxidativo. En este sentido los extractos de cascabello han demostrado un efecto protector frente al estrés mitocondrial inducido por el pesticida rotenona (**Fig. 33. A, B y C**) del mismo modo que el resveratrol, que es capaz no solo de reducir la expresión génica de este, sino también de neutralizarlo mediante la formación de proteínas antioxidantes (Kung et al., 2021). Otros polifenoles como la catequina o la quercitina también demostraron ser capaces de disminuir las ROS y el aliviar daño oxidativo ocasionado (Mercer et al., 2005; Pietta, 2000), estos además demostraron aumentar la viabilidad celular en células SH-SY5Y, frente a la muerte inducida por MPP+, del mismo modo que lo hacen CMA y CVA frente a la exposición del pesticida paraquat (**Fig. 42**). Estos datos sugieren que las capacidades neuroprotectoras de ambos extractos, pueden atenuar la muerte de las neuronas dopaminérgicas (neuronas bajo estrés oxidativo) en la EP.

Considerando que nuestros resultados señalan que los extractos de cascabello inducen en mayor o menor medida la activación de la autofagia "in vivo" (**Fig. 10 y 11**), y que además los resultados "in vitro" confirman su influencia sobre la dinámica mitocondrial, se realizó un estudio en un modelo de *Drosophila melanogaster* portador de las mutaciones patogénicas G2019S y R1441G expuestos a los extractos para comprobar su efecto sobre la función locomotora y la vida

media de estas, comparados con las moscas sin mutaciones en paralelo a los efectos observados con urolitina A.

La urolitina A, ha sido descrita como un metabolito secundario generado tras la digestión de los elagitaninos, polifenoles presentes en muchas plantas y frutas como las nueces, las bellotas o la granada. Ryu et al., 2016, realizaron un estudio que describe la capacidad de la urolitina A para aumentar la movilidad y la esperanza de vida en *c. elegans*. En este sentido los hallazgos encontrados en nuestro trabajo señalan que CMA es capaz de aumentar la actividad locomotora en moscas portadoras de las mutaciones R1441G y G2019S, incluso por encima del tratamiento con urolitina A (**Fig. 42**).

En definitiva, aunque es remarcable señalar que existen diferencias entre los extractos de bellota en diferentes estados de maduración, en la presente tesis doctoral se ha demostrado la capacidad de estos para inducir mecanismos como la autofagia y/o mitofagia, mejorando la calidad mitocondrial, aumentando la biogénesis de este organelo y protegiéndolo frente al estrés causado en presencia de tóxicos, como el PQ o la rotenona. Además de la protección frente a la viabilidad celular o el aumento de la vida media y la mejora de la función locomotora en modelos de enfermedad, como ante la presencia de mutaciones patogénicas de la EP, en combinación o no de pesticidas. Por tanto estos hallazgos nos hacen pensar en la posibilidad de utilizar estos extractos como posible diana terapéutica frente a este tipo de enfermedades. No obstante un estudio más exhaustivo sería necesario para poder explicar los mecanismos. a través de los cuales se inducen estos procesos.

Conclusión

En base a los objetivos planteados las conclusiones que podemos obtener de esta tesis son las siguientes:

1. - Los extractos de cascabello de bellota verde y madura poseen una alta concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, siendo ambas propiedades superior en el extracto de mayor estado de maduración.

2. - Los extractos de cascabello de bellota, independientemente de su estado de maduración, han demostrado la capacidad de inducir autofagia y mitofagia tanto en modelos "in vitro" como en modelos "in vivo". Asimismo estos extractos han demostrado la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.

3. - Los extractos de cascabello protegen de la muerte celular, observada en fibroblastos con una de las dos mutaciones LRRK2 (R1441G y G2019S), en presencia o no de paraquat. Además ambos extractos consiguieron disminuir el estrés mitocondrial basalmente y tras la inducción de estrés mitocondrial en presencia de rotenona. Por otra parte demostraron una mejora de la capacidad funcional mitocondrial.

4. - Los modelos de *Drosophila melanogaster* portadores de las de las mutaciones G2019S y R1441G de la proteína LRRK2, aumentaron la actividad locomotora y la vida media respecto a la ausencia de mutación, tras el tratamiento con el extracto de cascabello maduro, mientras el extracto de cascabello verde no presenta datos destacables.

Bibliografía

- Abdel-Rahman, E. A., Hosseiny, S., Aaliya, A., Adel, M., Yasseen, B., Al-Okda, A., Radwan, Y., Saber, S. H., Elkholy, N., Elhanafy, E., Walker, E. E., Zuniga-Hertz, J. P., Patel, H. H., Griffiths, H. R., & Ali, S. S. (2021). Sleep/wake calcium dynamics, respiratory function, and ROS production in cardiac mitochondria. *Journal of Advanced Research*, 31, 35. <https://doi.org/10.1016/J.JARE.2021.01.006>
- Ali, S., & McStay, G. P. (2018). Regulation of mitochondrial dynamics by proteolytic processing and protein turnover. *Antioxidants*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX7010015>
- Anand, R., Langer, T., & James Baker, M. (2012). *Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis* ☆. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.025>
- Bainor, A., Chang, L., McQuade, T. J., Webb, B., & Gestwicki, J. E. (2011). Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical Biochemistry*, 410(2), 310–312. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2010.11.015>
- Ban, T., Kohno, H., Ishihara, T., & Ishihara, N. (2018). Relationship between OPA1 and cardiolipin in mitochondrial inner-membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(9), 951–957. <https://doi.org/10.1016/J.BBA-BIO.2018.05.016>
- Cantos, E., Espín, J. C., López-Bote, C., De la Hoz, L. D., Ordóñez, J. A., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6248–6255. <https://doi.org/10.1021/JF030216V>
- Chahar, M. K., Sharma, N., Dobhal, M. P., & Joshi, Y. C. (2011). Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*, 5(9), 1. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.79093>
- Chaudhry, N., Sica, M., Surabhi, S., Hernandez, D. S., Mesquita, A., Selimovic, A., Riaz, A., Lescat, L., Bai, H., MacIntosh, G. C., & Jenny, A. (2022). Lamp1 mediates lipid transport, but is dispensable for autophagy in *Drosophila*. *Autophagy*, 18(10), 2443. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2038999>
- Chodari, L., Aytemir, M. D., Vahedi, P., Alipour, M., Vahed, S. Z., Khatibi, S. M. H., Ahmadian, E., Ardalan, M., & Eftekhari, A. (2021). Targeting Mitochondrial

Biogenesis with Polyphenol Compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/4946711>

Clifford, M. N., & Scalbert, A. (n.d.). Review *Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7)

Cortés-Martín, A., Selma, M. V., Tomás-Barberán, F. A., González-Sarrías, A., & Espín, J. C. (2020). Where to Look into the Puzzle of Polyphenols and Health? The Postbiotics and Gut Microbiota Associated with Human Metabotypes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64(9), 1900952. <https://doi.org/10.1002/MNFR.201900952>

Di Meo, F., Valentino, A., Petillo, O., Peluso, G., Filosa, S., & Crispi, S. (2020). Bioactive Polyphenols and Neuromodulation: Molecular Mechanisms in Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS21072564>

Doblado, L., Lueck, C., Rey, C., Samhan-arias, A. K., Prieto, I., Stacchiotti, A., & Monsalve, M. (2021). Mitophagy in Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3903. <https://doi.org/10.3390/IJMS22083903>

Ebner, M., Sinkovics, B., Szczygiel, M., Ribeiro, D. W., & Yudushkin, I. (2017). Localization of mTORC2 activity inside cells. *The Journal of Cell Biology*, 216(2), 343. <https://doi.org/10.1083/JCB.201610060>

Feng, J., Qiu, S., Zhou, S., Tan, Y., Bai, Y., Cao, H., Guo, J., & Su, Z. (2022). mTOR: A Potential New Target in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/IJMS23169196>

García-Muñoz, C., & Vaillant, F. (2014). Metabolic Fate of Ellagitannins: Implications for Health, and Research Perspectives for Innovative Functional Foods. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10408398.2011.644643>, 54(12), 1584–1598. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.644643>

García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F. A., Iglesias-Aguirre, C. E., Giménez-Bastida, J. A., González-Sarrías, A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2023). Ellagitannins, urolithins, and neuroprotection: Human evidence and the possible link to the gut microbiota. *Molecular Aspects of Medicine*, 89, 101109. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2022.101109>

Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparini, M., González-Paramàs, A. M., Santos-Buelga, C., Quiles, J. L., Bompadre, S., Mezzetti, B., & Battino, M. (2014). Polyphenol-Rich Strawberry Extract Protects Human Dermal Fibroblasts against Hydrogen Peroxide Oxidative

- Damage and Improves Mitochondrial Functionality. *Molecules*, 19(6), 7798. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES19067798>
- Gibellini, L., De Gaetano, A., Mandrioli, M., Van Tongeren, E., Bortolotti, C. A., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2020). The biology of Lonp1: More than a mitochondrial protease. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 354, 1–61. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2020.02.005>
- Giorgi, C., Marchi, S., Simoes, I. C. M., Ren, Z., Morciano, G., Perrone, M., Patalas-Krawczyk, P., Borchard, S., Jędrak, P., Pierzynowska, K., Szymański, J., Wang, D. Q., Portincasa, P., Węgrzyn, G., Zischka, H., Dobrzym, P., Bonora, M., Duszynski, J., Rimessi, A., ... Wieckowski, M. R. (2018). Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 340, 209. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2018.05.006>
- Goldman, A., & Speicher, D. W. (n.d.). *UNIT 10.7 Electrophotting from Polyacrylamide Gels*. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1007s82>
- Green, A., Hossain, T., & Eckmann, D. M. (2022). Mitochondrial dynamics involves molecular and mechanical events in motility, fusion and fission. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.1010232>
- Heckmann, B. L., Yang, X., Zhang, X., & Liu, J. (2013). The autophagic inhibitor 3-methyladenine potently stimulates PKA-dependent lipolysis in adipocytes. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), 163. <https://doi.org/10.1111/J.1476-5381.2012.02110.X>
- Huang, W., Niu, H., Li, Z., He, Y., Gong, W., & Gong, G. (2008). Optimization of ellagic acid production from ellagitannins by co-culture and correlation between its yield and activities of relevant enzymes. *Bioresource Technology*, 99(4), 769–775. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.01.032>
- Huang, Y., Liu, X., Feng, Y., Nie, X., Liu, Q., Du, X., Wu, Y., Liu, T., & Zhu, X. (2022). Rotenone, an environmental toxin, causes abnormal methylation of the mouse brain organoid's genome and ferroptosis. *International Journal of Medical Sciences*, 19(7), 1184–1197. <https://doi.org/10.7150/IJMS.74569>
- Hurley, J. H., & Young, L. N. (2017). Mechanisms of autophagy initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 225–244. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIO-CHEM-061516-044820>

- Jiang, P., & Mizushima, N. (2015). LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods*, *75*, 13–18. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2014.11.021>
- Kazlauskaite, A., Kelly, V., Johnson, C., Baillie, C., Hastie, C. J., Peggie, M., Macartney, T., Woodroof, H. I., Alessi, D. R., Pedrioli, P. G. A., & Muqit, M. M. K. (2014). Phosphorylation of Parkin at Serine65 is essential for activation: elaboration of a Miro1 substrate-based assay of Parkin E3 ligase activity. *Open Biology*, *4*(3). <https://doi.org/10.1098/RSOB.130213>
- Keogh, M. J., & Chinnery, P. F. (2015). Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1847*(11), 1401–1411. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2015.05.015>
- Key, J., Kohli, A., Bárcena, C., López-Otín, C., Heidler, J., Wittig, I., & Auburger, G. (2019). Global Proteome of LonP1+/- Mouse Embryonal Fibroblasts Reveals Impact on Respiratory Chain, but No Interdependence between Era1 and Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS20184523>
- Kharat, P., Sarkar, P., Mouliganesh, S., Tiwary, V., Priya, V. B. R., Sree, N. Y., Annapoorna, H. V., Saikia, D. K., Mahanta, K., & Thirumurugan, K. (2020). Ellagic acid prolongs the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *GeroScience*, *42*(1), 271. <https://doi.org/10.1007/S11357-019-00135-6>
- Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) 1. *Autophagy*, *17*(1), 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- Kluss, J. H., Mamais, A., & Cookson, M. R. (2019). LRRK2 links genetic and sporadic Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, *47*(2), 651–661. <https://doi.org/10.1042/BST20180462>
- Kolahdouzan, M., & Hamadeh, M. J. (2017). The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *23*(4), 272. <https://doi.org/10.1111/CNS.12684>
- Kou, X., & Chen, N. (2017a). Resveratrol as a Natural Autophagy Regulator for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Nutrients*, *9*(9). <https://doi.org/10.3390/NU9090927>

- Kou, X., & Chen, N. (2017b). Resveratrol as a Natural Autophagy Regulator for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/NU9090927>
- Kozhukhar, N., & Alexeyev, M. F. (2022). TFAM's Contributions to mtDNA Replication and OXPHOS Biogenesis Are Genetically Separable. *Cells*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/CELLS11233754/S1>
- Kulkarni, A., Chen, J., & Maday, S. (2018). Neuronal autophagy and intercellular regulation of homeostasis in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2018.02.008>
- Kung, H. C., Lin, K. J., Kung, C. Te, & Lin, T. K. (2021a). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol in Parkinson's Disease. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9080918>
- Kung, H. C., Lin, K. J., Kung, C. Te, & Lin, T. K. (2021b). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol in Parkinson's Disease. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9080918>
- Kung, H. C., Lin, K. J., Kung, C. Te, & Lin, T. K. (2021c). Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Neuroprotection of Polyphenols with Respect to Resveratrol in Parkinson's Disease. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9080918>
- Laker, R. C., Xu, P., Ryall, K. A., Sujkowski, A., Kenwood, B. M., Chain, K. H., Zhang, M., Royal, M. A., Hoehn, K. L., Driscoll, M., Adler, P. N., Wessells, R. J., Saucerman, J. J., & Yan, Z. (2014). A Novel MitoTimer Reporter Gene for Mitochondrial Content, Structure, Stress, and Damage in Vivo *. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530527>
- Lazarou, M., Sliter, D. A., Kane, L. A., Sarraf, S. A., Wang, C., Burman, J. L., Sideris, D. P., Fogel, A. I., & Youle, R. J. (2015). The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565), 309. <https://doi.org/10.1038/NATURE14893>
- Li, J., Kim, S. G., & Blenis, J. (2014). Rapamycin: one drug, many effects. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.001>
- Li, J., Wuliji, O., Li, W., Jiang, Z. G., & Ghanbari, H. A. (2013). Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(12), 24438. <https://doi.org/10.3390/IJMS141224438>

- Li, W., & Zhang, L. (2019). Regulation of ATG and Autophagy Initiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1206, 41–65. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_2
- Lin, T. K., Chen, S. Der, Chuang, Y. C., Lin, H. Y., Huang, C. R., Chuang, J. H., Wang, P. W., Huang, S. T., Tiao, M. M., Chen, J. B., & Liou, C. W. (2014). Resveratrol Partially Prevents Rotenone-Induced Neurotoxicity in Dopaminergic SH-SY5Y Cells through Induction of Heme Oxygenase-1 Dependent Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 1625. <https://doi.org/10.3390/IJMS15011625>
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(4), 183. <https://doi.org/10.1038/S41580-019-0199-Y>
- Lizama, B. N., & Chu, C. T. (2021). Neuronal Autophagy and Mitophagy in Parkinson's Disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 82, 100972. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2021.100972>
- Lu, J., Wu, M., & Yue, Z. (2020). Autophagy and parkinson's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1207, 21–51. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4272-5_2/FIGURES/1
- Martens, S., & Fracchiolla, D. (2020). Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discovery*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.1038/S41421-020-0155-1>
- Martín-Jiménez, R., Lurette, O., & Hebert-Chatelain, E. (2020). Damage in Mitochondrial DNA Associated with Parkinson's Disease. *DNA and Cell Biology*, 39(8), 1421–1430. <https://doi.org/10.1089/DNA.2020.5398>
- Masaldan, S., Callegari, S., & Dewson, G. (2022). Therapeutic targeting of mitophagy in Parkinson's disease. *Biochemical Society Transactions*, 50(2), 783. <https://doi.org/10.1042/BST20211107>
- Matsumoto, H., Haniu, H., & Komori, N. (2019). Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 101–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10
- Mauthe, M., Jacob, A., Freiberger, S., Hentschel, K., Stierhof, Y. D., Codogno, P., & Proikas-Cezanne, T. (2011). Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy*, 7(12), 1448. <https://doi.org/10.4161/AUTO.7.12.17802>
- McWilliams, T. G., Prescott, A. R., Montava-Garriga, L., Ball, G., Singh, F., Barini, E., Muqit, M. M. K., Brooks, S. P., & Ganley, I. G. (2018). Basal Mitophagy Occurs

- Independently of PINK1 in Mouse Tissues of High Metabolic Demand. *Cell Metabolism*, 27(2), 439-449.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.12.008>
- Mercer, L. D., Kelly, B. L., Horne, M. K., & Beart, P. M. (2005). Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochemical Pharmacology*, 69(2), 339–345. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2004.09.018>
- Millichap, L. E., Damiani, E., Tiano, L., & Hargreaves, I. P. (2021). Targetable pathways for alleviating mitochondrial dysfunction in neurodegeneration of metabolic and non-metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/IJMS222111444/S1>
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M. E., & Tavernarakis, N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 398. <https://doi.org/10.1038/CDD.2014.204>
- Nunnari, J., & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*, 148(6), 1145. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.02.035>
- Pai, S. K. (2023). Role of mitochondria in α -synuclein mediated neuronal toxicity. *Aging Brain*, 3, 100069. <https://doi.org/10.1016/j.nbas.2023.100069>
- Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2018). Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nature Cell Biology*, 20(9), 1013–1022. <https://doi.org/10.1038/S41556-018-0176-2>
- Pankiv, S., Clausen, T. H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J. A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., & Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24131–24145. <https://doi.org/10.1074/JBC.M702824200>
- Peng, K., Tao, Y., Zhang, J., Wang, J., Ye, F., Dan, G., Zhao, Y., Cai, Y., Zhao, J., Wu, Q., Zou, Z., Cao, J., & Sai, Y. (2016). Resveratrol Regulates Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion to Attenuate Rotenone-Induced Neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6705621>
- Pickles, S., Vigié, P., & Youle, R. J. (2018). Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current Biology*, 28(4), R170–R185. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2018.01.004>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/NP9904509>

- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *276*(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.276.5321.2045>
- Radad, K., Al-Shraim, M., Al-Emam, A., Wang, F., Kranner, B., Rausch, W. D., & Moldzio, R. (2019). Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. *Folia Neuropathologica*, *57*(4), 317–326. <https://doi.org/10.5114/FN.2019.89857>
- Rafatian, G., Khodaghali, F., Farimani, M. M., Abraki, S. B., & Gardaneh, M. (2012). Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H₂O₂. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *371*(1–2), 9–22. <https://doi.org/10.1007/S11010-012-1416-6>
- Ren, J., & Zhang, Y. (2018). Targeting Autophagy in Aging and Aging-Related Cardiovascular Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences*, *39*(12), 1064–1076. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2018.10.005>
- Robinson, J. P. (2022). Flow cytometry: past and future. *BioTechniques*, *72*(4), 159–169. <https://doi.org/10.2144/BTN-2022-0005>
- Rodríguez-Arribas, M., Yakhine-Diop, S. M. S., Pedro, J. M. B. S., Gómez-Suaga, P., Gómez-Sánchez, R., Martínez-Chacón, G., Fuentes, J. M., González-Polo, R. A., & Niso-Santano, M. (2017). Mitochondria-Associated Membranes (MAMs): Overview and Its Role in Parkinson's Disease. *Molecular Neurobiology*, *54*(8), 6287–6303. <https://doi.org/10.1007/S12035-016-0140-8>
- Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-Dit-Félix, A. A., Williams, E. G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., Aebischer, P., Sandi, C., Rinsch, C., & Auwerx, J. (2016). Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine*, *22*(8), 879–888. <https://doi.org/10.1038/NM.4132>
- Schaser, A. J., Osterberg, V. R., Dent, S. E., Stackhouse, T. L., Wakeham, C. M., Boutros, S. W., Weston, L. J., Owen, N., Weissman, T. A., Luna, E., Raber, J., Luk, K. C., McCullough, A. K., Woltjer, R. L., & Unni, V. K. (2019). Alpha-synuclein is a DNA binding protein that modulates DNA repair with implications for Lewy body disorders. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-47227-Z>

- Schepici, G., Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2020). Caffeine: An Overview of Its Beneficial Effects in Experimental Models and Clinical Trials of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–26. <https://doi.org/10.3390/IJMS21134766>
- Seglen, P. O., Luhr, M., Mills, I. G., Sætre, F., Szalai, P., & Engedal, N. (2015). Macroautophagic cargo sequestration assays. *Methods*, 75, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.021>
- Sekyere, J. O., & Amoako, D. G. (2017). Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) reverses resistance to colistin, but not to Carbapenems and tigecycline in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 228. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00228/FULL>
- Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. *Clinics in Geriatric Medicine*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.CGER.2019.08.002>
- Springer, M. Z., Poole, L. P., Drake, L. E., Bock-Hughes, A., Boland, M. L., Smith, A. G., Hart, J., Chourasia, A. H., Liu, I., Bozek, G., & Macleod, K. F. (2021a). BNIP3-dependent mitophagy promotes cytosolic localization of LC3B and metabolic homeostasis in the liver. *Autophagy*, 17(11), 3530. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1877469>
- Springer, M. Z., Poole, L. P., Drake, L. E., Bock-Hughes, A., Boland, M. L., Smith, A. G., Hart, J., Chourasia, A. H., Liu, I., Bozek, G., & Macleod, K. F. (2021b). BNIP3-dependent mitophagy promotes cytosolic localization of LC3B and metabolic homeostasis in the liver. *Autophagy*, 17(11), 3530. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1877469>
- Supino, R. (1995). MTT assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 43, 137–149. <https://doi.org/10.1385/0-89603-282-5:137/COVER>
- Tan, S., Yu, C. Y., Sim, Z. W., Low, Z. S., Lee, B., See, F., Min, N., Gautam, A., Chu, J. J. H., Ng, K. W., & Wong, E. (2019). Pomegranate activates TFEB to promote autophagy-lysosomal fitness and mitophagy. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-37400-1>
- Tanner, C. M., Kame, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G. S., Kasten, M., Chade, A. R., Comyns, K., Richards, M. B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H. H., Cambi, F., Umbach, D. M., Blair, A., Sandler, D. P., & Langston, J. W. (2011). Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), 866. <https://doi.org/10.1289/EHP.1002839>

- Tornero, D., Ceña, V., & Jordán, J. (2002). La mitocondria como diana farmacológica en los procesos neurodegenerativos. *Offarm*, 21(11), 98–102. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-la-mitocondria-como-diana-farmacologica-13041301>
- Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 124(8), 901–905. <https://doi.org/10.1007/S00702-017-1686-Y/METRICS>
- Usmani, A., Shavarebi, F., & Hiniker, A. (2021a). The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Molecular and Cellular Biology*, 41(5). <https://doi.org/10.1128/MCB.00660-20>
- Usmani, A., Shavarebi, F., & Hiniker, A. (2021b). The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's Disease. *Molecular and Cellular Biology*, 41(5). <https://doi.org/10.1128/MCB.00660-20>
- Vaquer-Alicea, J., & Diamond, M. I. (2019). *Propagation of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516>
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-1)
- Vocelle, D., Chan, C., & Patrick Walton, S. (n.d.). *Endocytosis Controls siRNA Efficiency: Implications for siRNA Delivery Vehicle Design and Cell-Specific Targeting*. <https://doi.org/10.1089/nat.2019.0804>
- Walker, J. M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 5–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:5>
- Wang, C., Liu, H., & Feng, X. (2022). The Impact of Sodium Dodecyl Sulfate and 2-Mercaptoethanol on Antibody and Antigen Binding. *Laboratory Medicine*, 53(3), 307–313. <https://doi.org/10.1093/LABMED/LMAB081>
- Wang, T. Sen, Coppens, I., Saorin, A., Brady, N. R., & Hamacher-Brady, A. (2020). Endolysosomal Targeting of Mitochondria is Integral to BAX-mediated Mitochondrial Permeabilization During Apoptosis Signaling. *Developmental Cell*, 53(6), 627. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2020.05.014>

- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., Lavoie, M. J., & Schwarz, T. L. (2011). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*, 147(4), 893–906. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.018>
- Yamamoto, M., Suzuki, S. O., & Himeno, M. (2010). Resveratrol-induced autophagy in human U373 glioma cells. *Oncology Letters*, 1(3), 489–493. https://doi.org/10.3892/OL_00000086
- Zeng, C., & Chen, M. (2022). Progress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: SIRT Family Regulates Mitochondrial Biogenesis. *Biomolecules*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/BIOM12081079>
- Zhang, D., He, Y., Wang, J., Liuying Wu, |, Liu, B., Cai, S., Li, Y., Yan, W., Yang, Z., & Qu, J. (2022). *Mitochondrial structural variations in the process of mitophagy*. <https://doi.org/10.1002/jbio.202200006>
- Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. Bin. (2019). Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2019.4188>
- Zhu, J., Wang, K. Z. Q., & Chu, C. T. (2013). After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy*, 9(11), 1663–1676. <https://doi.org/10.4161/AUTO.24135>
- Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Shulman, G. I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 15983–15987. <https://doi.org/10.1073/PNAS.252625599>