



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Potencial efecto neuroprotector de los agonistas LXR en la activación de autofagia de células gliales y neuronales sometidas a privación de glucosa y oxígeno

Mónica Alexandra Vargas Moreno

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Bogotá, Colombia
2022

Potencial efecto neuroprotector de los agonistas LXR en la activación de autofagia de células gliales y neuronales sometidas a privación de glucosa y oxígeno.

Mónica Alexandra Vargas Moreno

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Maestría en Neurociencias

Director:

Gonzalo Arboleda MD, MSc, PhD

Línea de Investigación:

Neurofisiología celular

Grupo de Investigación:

Muerte Celular

Dedicatoria

A las mujeres fuertes de mi vida, mis madres (a mi tía que también ha sido como una madre) que me enseñaron del amor incondicional y a través de sus historias han abierto el camino a mis pasos, a mis hermanas que me muestran cada día que una persona si puede cambiar el mundo, a mis primas que refuerzan día a día la idea de que unidas somos más fuertes y a mis amigas que con sus luchas me han servido de inspiración.

“Our histories cling to us. We are shaped by where we come from. “

Chimamanda ngozi adichie

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Mónica Alexandra Vargas Moreno

Nombre

Fecha 02/12/2022

Agradecimientos

Agradezco inicialmente a la Universidad Nacional de Colombia que me acogió desde muy temprano en la vida y ha sido el lugar donde han nacido sueños que poco a poco se han hecho realidad.

Al Instituto de genética y al grupo de investigación de Muerte Celular por prestar todo el apoyo para la realización de este trabajo.

A mi tutor y maestro Gonzalo Huberto Arboleda quien, con sus enseñanzas y valiosa ayuda me guio durante todo este camino.

Agradezco a Angie Bustos, Jonathan Muñoz y Jennifer Caicedo por sus enseñanzas desde el primer día hasta el último, porque sé con seguridad que ese apoyo que me brindaron trascenderá el tiempo.

A Juan Guillermo, Ana Milena y Juan Diego (q.e.p.d) por la música, por las risas, por el teatro, por los largos días, por ser apoyo en todos los momentos, sin ellos esta experiencia no habría sido la misma.

A Magda por estar siempre pendiente de cada proceso, de cada fecha límite, de cada entrega.

A mi familia por acompañarme siempre y hacerme saber que no hay sueño imposible, a mi mamá que con su amor me hizo todo más fácil, su comida, sus atenciones, sus palabras de entusiasmo llegaron siempre para alentar mis pasos.

A Javier que llenó de café y amor esos días difíciles y me recordó el objetivo cuando lo perdía de vista.

A mis amigos que cedieron con paciencia espacios para compartir y estuvieron pendientes de cada resultado y se alegraban conmigo por cada logro.

Resumen

Potencial efecto neuroprotector de los agonistas LXR en la activación de autofagia de células gliales y neuronales sometidas a privación de glucosa y oxígeno

La enfermedad cerebrovascular es una de las causas más relevantes de morbimortalidad en el mundo. Por ello es de gran importancia el entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos de esta enfermedad, que permitan encontrar blancos terapéuticos para mejorar la supervivencia neuronal que prosigue a la lesión isquémica.

Clásicamente se hablaba de 2 tipos de muerte celular relacionadas con este tipo de lesión: necrosis y apoptosis; sin embargo, recientemente se ha encontrado una gran variedad morfológica de tipos adicionales de muerte celular, entre estas, la asociada a autofagia ha tomado gran importancia en la última década.

Existe evidencia reciente del efecto neuroprotector de los agonistas de receptores X del hígado (LXR: por sus siglas en inglés, Liver X receptors) en escenarios de isquemia cerebral y de su capacidad de modular la activación de la autofagia. Se ha descrito también el papel que cumplen las células gliales en el daño neuronal que prosigue a la lesión isquémica. Debido a esto, se planteó como objetivo general analizar el efecto de agonistas LXR en la activación de procesos de autofagia en células gliales y neuronales expuestas a privación de glucosa y oxígeno como un posible blanco terapéutico para modular la respuesta celular deletérea post isquemia.

Se desarrolló un modelo in vitro de isquemia celular con líneas celulares y cultivo primario de neuronas y células gliales de corteza de ratón expuestas a privación de glucosa y oxígeno pretratadas con un extracto de plantas colombianas con actividad agonista LXR, *Zanthoxylum caribaeum*. Encontrando que el pretratamiento con las fracciones en estudio ofrece protección ante la privación combinada de glucosa y oxígeno en líneas celulares y células gliales de cultivo primario y en estas últimas podría activar vías de autofagia evidenciado en el aumento de los niveles de LC3II.

Palabras clave: Autofagia, LXR, Isquemia cerebral, LC3-II, Neuroprotección

Abstract

Potential neuroprotective effect of LXR agonists on autophagy activation on glial and neuronal cells subjected to glucose and oxygen deprivation

Cerebrovascular disease is one of the most relevant causes of morbimortality in the world. Therefore, the understanding of the physio pathological disease mechanisms that will allow the acquisition of therapeutic targets to improve neuronal survival after an ischemic lesion is of the utmost importance.

Traditionally, two types of cell death were associated with this kind of lesion: necrosis and apoptosis, however as of late a great variety of morphological types of cellular death has been found, among those, the one associated with autophagy has gained great importance in the last decade.

There is recent evidence of the neuroprotective effect of the Liver X receptor (LXR) agonists in scenarios of cerebral ischemia and their ability to modulate autophagy activation. The role of glial cells in neuronal damage after an ischemic injury has also been described.

Due to this, the analyzing the effect of the LXR agonists on the activation of the autophagy processes on glial and neuronal cells exposed to glucose and oxygen deprivation as a possible therapeutic target to modulate the deleterious post ischemic cell response was proposed as a primary objective.

An in vitro model of cellular ischemia was developed, using cell lines, neuron primary cultures, as well as glial cortex cells obtained from mice, all of which were exposed to glucose and oxygen deprivation and pretreated with and extract obtained from Colombian plants with an LXR agonist activity, *Zanthoxylum caribaeum*. We found that pretreatment with the studied fractions confers protection against the combined deprivation of glucose and oxygen in cell lines and in primary culture glial cells, and in the latter, might activate autophagy pathways, as demonstrated by an increase in LC3II levels.

Keywords: autophagy, LXR, brain ischemia, LC3-II, neuroprotection

Contenido

	Pág.
1 Definición y planteamiento del problema	19
2 Objetivos	23
2.1 Objetivo General	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 Marco Teórico	24
3.1 Autofagia descripción general	24
3.1 Mecanismo molecular de la autofagia	25
3.2 Autofagia en la lesión neuronal por isquemia	29
3.2.1 Rol dual de la autofagia en la lesión por Isquemia.	31
3.2.2 LC3; marcador de autofagia en Isquemia.	32
3.3 Receptores Nucleares LXR en isquemia	34
3.4 Activación de la autofagia por agonistas LXR.....	36
4 Materiales y Métodos	38
4.1 Modelo experimental	38
4.2 Uso de Animales	39
4.3 Estandarización del protocolo de privación de glucosa y oxígeno	39
4.3.1 Diseño cámara de Hipoxia de bajo costo	39
4.3.2 Protocolo de privación de glucosa y oxígeno	40
4.4 Cultivo Celular	41
4.5 Grupos experimentales	41
4.6 Pruebas de viabilidad Celular	42
4.6.1 MTT	42
4.6.2 LDH	42
4.7 Western Blot.....	43
4.8 Análisis Estadístico	44
5 Resultados	45
5.1 El modelo de privación de glucosa y oxígeno con el uso de la cámara de hipoxia de bajo costo, induce muerte celular en relación con el tiempo de exposición.	45
5.2 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones genera protección frente a la privación de glucosa y oxígeno de forma significativa tanto en células SHSY5Y como en UMG87	48
5.3 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones genera protección frente a PGO en células gliales.....	49

5.4	Las células gliales y neuronales de cultivo primario de corteza de ratón muestran diferencias en los niveles basales de LC3 I-II y tras la privación de glucosa.	51
5.5	La PGO aumenta los niveles de LC3 II en células gliales y neuronales de cultivo primario de forma significativa con respecto al basal.....	54
5.6	El pretratamiento de 24 horas con las fracciones podría activar la autofagia en células gliales, pero no en células neuronales de cultivo primario de corteza de ratón.	56
5.7	El pretratamiento de 24 horas con las fracciones no genera cambios significativos en la fosforilación de AKT	59
6	Discusión de resultados.....	62
7	Conclusiones generales y modelo propuesto	67
7.1	Conclusiones Generales	67
7.2	Modelo Propuesto.....	68
8	Referencias	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Pág.

Figura 1.1 Esquema general del mecanismo molecular de La Autofagia en mamíferos	27
Figura 3.5.1 Ensayo de actividad Luciferasa de compuestos extraídos de la planta colombiana <i>Zanthoxylum Caribeum</i> .	37
Figura 4.1 Cámara de Hipoxia.	40
Figura 4.2. Montaje de Cámara de Hipoxia en Incubación con platos de cultivo.	40
Figura 5.1.1 Cambios morfológicos celulares tras la exposición a PGO	45
Figura 5.1.2. La viabilidad celular relativa disminuye a medida que aumenta el tiempo de exposición a PGO.	47
Figura 5.2. El pretratamiento de 24 horas con el agonista LXR y las fracciones ZR2A y EP06 genera protección frente a la privación de glucosa y Oxígeno.	49
Figura 5.3.1 Cambios Morfológicos tras la exposición a PGO en Neuronas y células gliales.	50
Figura 5.3.2 El pretratamiento con el agonista LXR y las fracciones ZR2A y EP06 disminuyen de forma significativa la liberación de LDH tras la exposición a PGO en células gliales.	51
Fig 5.4.1 Cambios en los niveles de expresión de LC3B y la relación LC3BII/LC3BI con respecto a tiempo de privación de glucosa en fibroblastos.	52
Figura 5.4.2 Niveles de expresión relativa de LC3I-II basales y con privación de glucosa de neuronas y células gliales de cultivo primario.	54
Figura 5.5 Niveles de expresión relativa de LC3I-II basales y tras privación de glucosa en y privación combinada de glucosa y oxígeno de neuronas y células gliales de cultivo primario.	55
Figura 5.6.1 El pretratamiento con la fracción ZR2A y con el agonista sintético LXR aumenta los niveles de LC3BII en células gliales	57
Figura 5.6.2 Los niveles de LC3BII no cambian en las neuronas tratadas con los tratamientos en estudio	58
Figura 5.7.1 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones no genera cambios significativos en la fosforilación de AKT en neuronas.	60
Figura 5.7.2 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones no genera cambios significativos en la fosforilación de AKT en células gliales.	61
Figura 7.2.1 Modelo propuesto de mecanismo de acción de los agonistas LXR en células gliales y neuronales expuestas a PGO.	69
Figura 7.2.2 Sistema de Conjugación LC3. Adaptado de Maruyama, T. (2017):	71

Figura 7.2.3 Activación vía clásica de autofagia en isquemia. Modificado de Qin, C. (2022). 72

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Grupos experimentales e intervención.....	41

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ACM	Arteria Cerebral Media
ACV	Accidente cerebrovascular
AKT	Proteína Kinasa A
AMPK	AMP-activated protein kinasenase
ANOVA	Análisis de varianza
Atg	Proteína asociada a la autofagia
ATP	Adenosin Trifosfato
CMA	Autofagia mediada por Chaperonas
DALYs	Disability-Adjusted Life-Years
DANE	Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Fig.	Figura
FIP200	Focal adhesion kinasa family interacting protein
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HIF	Factor inducible de Hipoxia
LAMP-2	Proteína de membrana 2 asociada al lisosoma
LC3	Proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDH	Lactato deshidrogenasa
LXR	Receptor x del Hígado

mTOR	Mammalian target of rapamycin
pAKT	Proteina Kinasa A fosforilada
PAS	Pagophoro assembly Site
PGO	Privación de glucosa y oxígeno
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
rt-PA	Activador tisular de Plasminogeno
SITAC	Sistema de información territorial de Accidente cerebrovascular
ULK	unc 51 Like autophagy activating Kinasa

1 Definición y planteamiento del problema

Aunque se ha demostrado una tendencia global en la disminución de las muertes asociadas al accidente cerebrovascular en el mundo (Lakhan et al, 2009; Guzik et al 2017), la incidencia y la carga de morbilidad de esta enfermedad aún representan un problema de salud pública (Thrift et al, 2017).

Para el 2019, se calculó la cifra de hasta 110 millones de sobrevivientes de accidente cerebrovascular en el mundo, representando un incremento de casi 80% con respecto a 1990, durante ese mismo año la incidencia global sobrepasó los 12 millones de personas con un aumento del 76% con respecto a 1990. Se reportaron además 6.55 millones de muertes representando el 11.59% de las muertes por todas las causas y 143 millones de años de vida ajustados por discapacidad DALYs (Disability-Adjusted Life-Years, por sus siglas en inglés) (Roth, G. A. 2020), (Feigin et al, 2017).

Según el análisis sistemático realizado por el neurological disorders collaborator group en el período comprendido entre 2014 y 2016 los desórdenes neurológicos representaron la causa más frecuente de DALYs (Disability-Adjusted Life-Years, por sus siglas en inglés) con un 10.2% del total, y la segunda causa más frecuente de muerte, con un 16.8%, superados únicamente por las enfermedades cardiovasculares. La enfermedad cerebrovascular por su parte representó el 47.3% los DALYs y un 67.3% de las muertes atribuidas a los desórdenes neurológicos (Feigin et al, 2017). (Yanez, N. 2020)

El Estudio de la carga mundial de enfermedades del 2017 también mostró que existe un incremento significativo en la contribución proporcional del ACV en los DALYs y las muertes en los países en desarrollo, esta tendencia explicada en parte por la brecha existente en las acciones de prevención y tratamiento comparado con los países desarrollados. (Yanez, N. 2020)

La situación en Colombia no es menos preocupante, Según el reporte de Estadísticas Vitales del DANE el número total de casos de ACV isquémico en Colombia en mayores de 18 años, reportados entre los años 2011 y 2015, fue de 75.905 y el número de

muerres por ACV en Colombia fue de 32.557 de los cuales el 16,81 % corresponden a accidentes de tipo isquémico.

Por lo tanto, la comprensión de la naturaleza de los cambios celulares que prosiguen a la lesión isquémica es esencial para poder elegir objetivos terapéuticos efectivos.

Aproximadamente el 67% de los accidentes cerebrovasculares son secundarios a obstrucción trombótica o embólica de un vaso cerebral, comprometiendo así el flujo sanguíneo tisular. (Krishnamurthi, R. V., 2020) Hasta ahora el único tratamiento médico efectivo para mejorar la sobrevivencia de estos pacientes es la administración endovenosa del activador recombinante del plasminógeno tisular (rt-PA, por sus siglas en inglés) sin embargo se estableció como ventana terapéutica segura 4.5 horas a partir del inicio de los síntomas por el riesgo de transformación hemorrágica del infarto cerebral. (Xiong, Y., 2019) La limitación temporal dificulta el acceso a esta terapia, por lo que en el mundo solo alrededor del 5% de los pacientes con infartos cerebrales acceden a este tratamiento (Faysel, M. A., 2019); en Latinoamérica tanto por limitaciones sociales como económicas, las tasas de trombolisis pueden ser tan bajas como el 1% (Avezum, Á., 2007).

En Colombia se han hecho reportes aislados por ciudades, pero no se tiene un consolidado de la información que pueda brindar una idea de la efectividad de la terapia en la población hospitalaria. En Bogotá entre los años de 2011 a 2015, según el Sistema de Información Territorial en Accidente Cerebrovascular (SITAC), se presentaron 13.855 casos de ACV, con 324 personas que recibieron rt-PA para una tasa de trombolisis del 2,3% (Duque, A. A., 2019).

Esto nos deja una gran cantidad de pacientes sin alternativas terapéuticas que presentarán secuelas neurológicas a diferentes niveles, con impacto negativo en los niveles de calidad de vida y aumentando los costos en intervenciones en salud, por lo que la búsqueda de una terapia neuroprotectora efectiva ha sido tema de interés de múltiples investigaciones. Uno de los objetivos terapéuticos más recientes es la modulación de vías de autofagia.

La autofagia es un proceso catabólico, altamente conservado y controlado destinado a la regulación de energía en estados de déficit extremo en un intento de supervivencia celular, y que depende de una red de proteínas que participan a diferentes niveles, lo que hace de este un proceso de múltiples pasos susceptible a la regulación y medición externa (Chu C.T, 2006). En la última década se ha reconocido la autofagia como un

proceso que ocurre durante la lesión cerebral aguda por isquemia (Xu, M. et al, 2011) (Smith, C. M et al, 2011).

Aunque la autofagia es un proceso catabólico pro-supervivencia, también se ha asociado a procesos de muerte celular independiente de caspasas, y en particular, el rol que desempeña en este tipo de lesión neuronal aún es muy debatido. Diversos estudios muestran un claro efecto protector mientras otros evidencian efectos deletéreos (Smith et al, 2011).

Es claro que la autofagia tiene un papel crucial en el sistema nervioso central. La interrupción de la autofagia durante el desarrollo del cerebro resulta en disfunción global del desarrollo. Ratones mutados para proteínas específicas de autofagia (Atg5 y 7) no sobreviven al primer día después del nacimiento (Komatsu et al. 2005).

Recientemente, se ha demostrado activación de vías de autofagia por agonistas de receptores LXR en procesos inflamatorios inducidos por lipopolisacáridos en cardiomiocitos (Liu, P 2014) y en células neoplásicas (Poirot, Marc, 2018) (Segala, Gregory 2017). Además, los agonistas LXR tienen efecto neuroprotector en modelos de isquemia neuronal (Morales, 2008).

Las células gliales son el tipo celular más abundante en el sistema nervioso central con importantes funciones como soporte estructural, formación de la barrera hematoencefálica, mantenimiento del ambiente extracelular, regulación del flujo cerebral, estabilización de las comunicaciones, síntesis de neurotransmisores y defensa del estrés oxidativo. (Xu, S., Lu, J 2020.) Minutos después del inicio de la lesión isquémica, las células en el núcleo isquémico mueren y liberan factores asociados al daño, entre estos ATP, que favorece la activación de las células gliales para desencadenar una respuesta inflamatoria que inicialmente funciona como mecanismo protector para mantener la homeostasis y prevenir la entrada de invasores, (Xiong, X, 2016) sin embargo la activación exagerada de esta respuesta puede contribuir en ampliar el daño isquémico. Es así como las células gliales y la modulación de su actividad inflamatoria se han planteado también como un blanco terapéutico.

El presente trabajo tiene como finalidad evaluar la actividad neuroprotectora de agonistas LXR en un modelo neuronal de privación de glucosa y oxígeno y la participación de la autofagia en este contexto. Se espera que el agonista LXR mejore la supervivencia neuronal por medio de la activación de vías de autofagia, y de ser así, sería el primer estudio en demostrar esta relación en un modelo in-vitro de ACV.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar el efecto de los agonistas LXR en células gliales y neuronales sometidas a privación de glucosa y oxígeno en la activación de la autofagia.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la autofagia inducida por privación de glucosa y oxígeno en cultivos primarios de glía y neuronas
- Evaluar el efecto neuroprotector de los agonistas LXR: GW3965 y dos moléculas con actividad LXR (ZR2A y EP06) extraídas de la planta colombiana *Zanthoxylum caribaeum* en células gliales y neuronales sometidas a privación de glucosa y oxígeno.
- Determinar la contribución de la autofagia en el potencial efecto neuroprotector de los agonistas LXR (GW396, ZR2A y EP06) en un modelo células gliales neuronales de privación de glucosa y oxígeno.

3 Marco Teórico

3.1 Autofagia descripción general

El término autofagia deriva del griego auto - uno mismo; phagos – comer; y fue acuñado por el científico Christian de Duve en la década de 1950; (Glick, D et al, 2010), asociado a su trabajo sobre la caracterización de los lisosomas, lo que le mereció el premio Nobel de Medicina en 1972. El mecanismo molecular del proceso ha sido estudiado desde entonces y en 1993 Yoshinori Ohsumi describió los genes relacionados con la autofagia en levaduras tipo *Saccharomyces cerevisiae*, denominándose genes Atg en levaduras o ATG en mamíferos. Por este trabajo recibió el premio Nobel de medicina en 2016 (Harnett, M. 2017).

La autofagia es definida como un proceso catabólico conservado en todos los organismos eucariotas, como parte de la adaptación celular ante fallas energéticas (Saha, S. 2018); incluye mecanismos para la degradación y reciclaje de macromoléculas que sirven para proveer energía en condiciones adversas. Es así como la función primordial de la autofagia es proteger a la célula contra la privación de nutrientes y estrés relacionados (Bento, C. 2016).

Sin embargo, el estudio de la autofagia ha ganado importancia en la última década, porque se ha demostrado que juega un rol importante en muchos procesos fisiológicos y

patológicos (Glick, D et al, 2010). Niveles basales de autofagia bajo condiciones energéticas normales, ayudan a mantener la homeostasis celular regulando el recambio citoplasmático de proteínas y organelos para mantener el crecimiento y el desarrollo celular. Recientemente se ha encontrado que la autofagia tiene un papel crucial en la inmunidad innata facilitando la unión de antígenos al complejo mayor de histocompatibilidad para luego ser reconocidos por linfocitos T CD4+ (Saha, S. 2018).

La autofagia también es estimulada por diversas condiciones patológicas como cáncer, desórdenes lisosomales, entre otros; adicionalmente la activación de la autofagia ha sido descrita como potencial protector contra varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington, promoviendo la degradación de agregados proteicos intracitoplasmáticos patológicos (Bento, C. 2016).

Se han identificado 3 formas de autofagia: microautofagia, macroautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La microautofagia es la degradación del contenido celular directamente a través de la invaginación de la membrana lisosomal; la autofagia mediada por chaperonas (CMA por sus siglas en inglés, Chaperone mediated autophagy) requiere una secuencia KFERQ en las proteínas que irán a degradación para ser reconocidas por HSC70, una proteína chaperona que las lleva posteriormente al lisosoma para su degradación donde son reconocidas por un receptor de membrana llamado LAMP-2A que ayuda en la internalización de la proteína; y la macroautofagia (mencionada en este escrito como autofagia), involucra la formación de una estructura membranosa denominada autofagosoma que luego se fusiona con el lisosoma liberando su contenido al lumen de este para su degradación. La macroautofagia ocurre mediante una serie de eventos moleculares que han sido caracterizados previamente (Ravanan, P. 2017)

3.1 Mecanismo molecular de la autofagia

La degradación de componentes intracelulares por el lisosoma puede ser selectiva en un proceso conocido como autofagia mediada por chaperonas, o no selectiva durante la deficiencia energética celular que requiere degradación de componentes citoplasmáticos más grandes.(Kaushik, S. 2018) ambos procesos son desencadenados por diferentes señales, sin embargo, convergen en una vía que inicia la remodelación para formar el autofagosoma, la inducción de la autofagia se desencadena con el reclutamiento de

proteínas ATGs a la localización específica en la célula llamada PAS (Pagophore assembly site, por sus siglas en inglés). (Dikic, I. 2018)

Aunque es un proceso conservado entre eucariotas se han identificado diferencias importantes en la arquitectura de la autofagia entre levaduras y mamíferos. En este escrito se expondrá el proceso que se lleva a cabo en mamíferos.

El primer precursor identificable de la autofagia es la estructura de doble membrana en forma de copa conocida como fagóforo que posteriormente se elonga y fusiona formando el autofagosoma; el proceso finaliza con la unión al lisosoma y degradación de su contenido. (Bento, C. 2016).

La formación del autofagosoma sigue los siguientes pasos: Iniciación, elongación y nucleación.

Por medio de las propiedades del fruto, según el espesor del endocarpio, se hace una clasificación de la palma de aceite en tres tipos: Dura, Ternera y Pisifera, que se ilustran en la Iniciación: Como se mencionó previamente, requiere una estructura conocida como fagóforo. Esta doble membrana puede originarse de diferentes estructuras intracelulares, entre estos el retículo endoplasmático, la mitocondria, aparato de Golgi, endosomas reciclados e incluso de la membrana plasmática (Yu, Li. 2018).

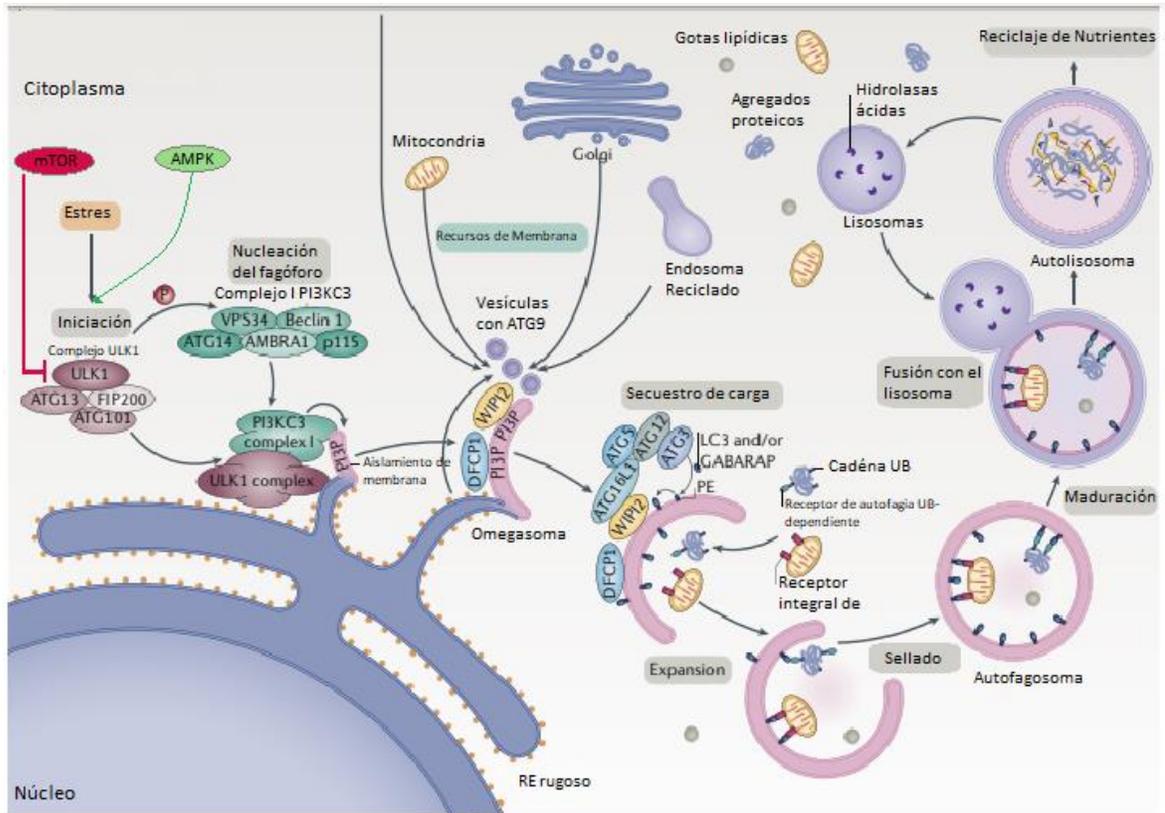


Figura 1.1 Esquema general del mecanismo molecular de La Autofagia en mamíferos

Adaptado de Dikic I, Elazar Z (2018). Se muestran los 4 pasos principales en la vía autofágica. Las señales que inician el proceso de autofagia son de diversa índole como hipoxia, disminución de nutrientes, estrés endoplásmico, o agregados proteicos. El inicio común a estos es el reclutamiento de diferentes proteínas ATG a una localización celular específica llamada PAS, (Phagofore assembly site, por sus siglas en inglés) y la activación del complejo ULK1 que mediante fosforilación en diferentes dominios proteicos activa el complejo PI3KC3 aumentando así la producción de PI3P en una estructura característica del retículo endoplasmático conocida como Omegasoma

La membrana que da inicio al fagoforo y a la extensión del mismo proviene de diferentes fuentes dentro de la célula, organelos con membrana como la mitocondria, vacuolas, lisosomas, aparato de Golgi e inclusive la membrana celular.

PI3P recluta WIPI y a DFCP1 al omegasoma interactuando con sus dominios PI3P, WIPI2 se une directamente a ATG16L1 y recluta el complejo ATG12-ATG5- ATG16L1 que incrementa la conjugación mediada por ATG3 de las proteínas de la familia de las ATG8 al phosphatidylethanolamine (PE) presente en la membrana del omegasoma. Formando así la forma lipidada unida a membrana de estas proteínas, las proteínas ATG8 lipidadas atraen más componentes de la maquinaria autofágica con dominios de interacción específicos y también son requeridos para la elongación y el cierre de la membrana del fagóforo, las proteínas ATG8 lipidadas atraen más componentes de la maquinaria autofágica con dominios de interacción específicos, Y también son requeridos para la elongación y el cierre de la membrana del fagóforo.

El proceso continúa con la formación del complejo tetramérico ULK1, ATG13, ATG101 y FIP200 que en muchos casos se lleva a cabo de una forma mTORC1 dependiente. Bajo condiciones normales mTORC1 se encuentra unido al lisosoma por la proteína Rag GTPasa donde es activado por Rheb mediante su fosforilación. mTORC1 activado fosforila ULK1 y Atg13 a través de RAPTOR para inactivar ULK1 e inhibir la autofagia, pero en condiciones de disminución de nutrientes, se inhibe mTORC1 (dada la indisponibilidad de aminoácidos, factores de crecimiento, oxígeno y ATP) y su asociación con el lisosoma se altera. En este momento ULK1 se disocia de mTORC1 (Ravanan, P. 2017; Wong, P. 2015).

Sin embargo, este proceso solo no es suficiente para la iniciación de la autofagia, se requiere activación directa por AMPK, que también inhibe mTORC1 por fosforilación de Rheb y RAPTOR. Atg 13 y FIP200 interactúan con ULK1 en su región C terminal. Posteriormente Atg101 se une a ULK1 a través del extremo N-terminal de Atg13, que recluta a la membrana de iniciación las proteínas DCFP1/ZFYV1 y wipi 1 (proteínas de unión a PI3P). Esto permite la formación de la estructura en forma de copa llamado fagoforo (Susuki, S. 2017; Ha, J. 2015)

Nucleación: El paso de nucleación es principalmente mediado por el complejo VPS34 y Beclin-1, cuyo reclutamiento al sitio de inicio del fagoforo es favorecido por ULK1 activo. Este complejo actúa como una kinasa de fosfoinositoles de clase III cuyo sustrato es el Fosfoinositol (PI) el cual es fosforilado en la posición D3 generando PI3P (fosfoinositol 3 fosfato), creando una plataforma para la unión del resto de la maquinaria autofágica, lo que permite la deformación de la membrana que va de una forma cónica a una membrana con curvatura positiva la cual es importante para la maduración del fagoforo. PI3P también recluta proteínas de la familia WIPI que a su vez reclutan proteínas con función ubiquitinadoras (Bento, C. 2016).

Elongación: Es llevado a cabo por dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. El primero es el complejo Atg 5-Atg12, que tiene otros miembros como Atg7, Atg10 y Atg16L1 formando un complejo multimérico que aumentan la curvatura al fagoforo que es esencial para la lipidación de LC3 promoviendo el segundo sistema de ubiquitinación: LC3B-PE. Este sistema abarca las proteínas Atg4B (Proteína de cistina), Atg7 y ATG 3, el cual sella el fagoforo para formar una estructura de doble membrana llamado autofagosoma. La proteína LC3B-II es reclutada por Atg 5 y Atg12 a la membrana interna y externa del autofagosoma, y permanece asociada hasta la fusión con el lisosoma. Posterior a la unión al lisosoma, LC3B-II de la membrana externa se disocia y el asociado a la membrana interna se degrada (Ravanan, P. 2017; Bento, C. 2016).

Formación del autofagolisosoma: El autofagosoma madura mediante la eliminación de la mayoría de las proteínas ATG de la maquinaria autofágica usadas en los procesos corriente arriba (Dikic, I. 2018), posteriormente se une a endosomas tempranos y tardíos y finalmente se lleva a cabo la fusión con el lisosoma para formar el autofagolisosoma. Este proceso es regulado por proteínas de fusión como PLEKHM1 a través del complejo HOPS y el complejo LC3/GABARAP. HOPS media la fusión interactuando con las proteínas

SNARE del autofagosoma (Itakura, E. 2012). Los microtúbulos facilitan también el proceso de fusión junto con otras proteínas como MFN2, Presenilinas, myosin VI y TOM1 (Yu, 2018).

3.2 Autofagia en la lesión neuronal por isquemia

Los primeros estudios sobre muerte celular en isquemia demostraron que las neuronas en el centro de la isquemia tienden a experimentar necrosis, mientras que las neuronas en la penumbra (región circundante) mueren por apoptosis (Broughton, B. R 2009) Sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés en ampliar el espectro ya que algunos experimentos in vivo indican que tanto la apoptosis como la autofagia y otros tipos de muerte celular se activan en la penumbra isquémica (Deng, Y; 2016; Sekerdag, E. 2018). Desde los primeros estudios moleculares sobre la isquemia cerebral, la penumbra se ha mostrado como un objetivo terapéutico interesante porque tanto la apoptosis como la autofagia que ocurren en esta área parecieran ser reversibles y susceptibles a intervención (Kikuchi, K. 2012; Morales, 2008)

El papel que desempeña la autofagia en el accidente cerebrovascular ha sido estudiado en modelos animales y celulares, pero los resultados han sido inconclusos e incluso contradictorios. Los primeros estudios que relacionan la autofagia con modelos de isquemia cerebral aguda datan de alrededor del 2005. Zhu et al. (2005) en un modelo de oclusión de arteria cerebral media en ratones, demostró mayores niveles de la proteína de cadena ligera asociada a microtúbulos 3-II (LC3-II por sus siglas en inglés, light chain 3II), como marcador de autofagia, comparado con los controles. Posteriormente otros autores corroboraron estos hallazgos (Carlioni et al, 2008) (Rami et al, 2008)

Varios estudios han demostrado que las neuronas positivas para autofagia y también positivas para apoptosis se encuentran en las capas superficiales de la corteza incluso desde la primera hora posterior al accidente cerebrovascular, con un pico máximo a las 24 horas. Sin embargo, en las siguientes 48-72 horas hay un cambio en los procesos de muerte celular: disminuye en principio la autofagia y posteriormente la apoptosis, llegando a que finalmente las neuronas mueran por necrosis en la misma área del infarto (Balduini

et al, 2012). Al ser este un proceso que sucede en cuestión de días, adquiere una gran importancia como blanco terapéutico

Deng YH et al (2017), estudiaron la relación entre autofagia y apoptosis en la región de penumbra a diferentes horas en un modelo murino de lesión isquémica permanente encontrando que, comparado con el control, LC3-II aumentó considerablemente sus niveles de expresión en la penumbra isquémica desde la primera hora posterior a la lesión, y estos niveles fueron aumentando progresivamente hasta la hora 5 después de lo cual descienden rápidamente.

De la misma forma la caspasa 3, como marcador de apoptosis, fue ampliamente detectada a la primera hora en el área de penumbra, mostrando un comportamiento similar que la proteína LC3-II. Sin embargo, los niveles de caspasa-3 activa se presentaban elevados hasta las 72 horas y más altos que los niveles de LC3-II en todos los tiempos de medición. (Deng YH et al 2017)

Estos hallazgos sugieren que hay una coactivación de los dos tipos de mecanismos (apoptosis y autofagia), mostrando un posible papel protector de la autofagia en la penumbra isquémica como una primera respuesta a la falla energética, pero con un descenso considerable hacia las 48 horas del evento. Sin embargo, mucho antes, hacia las 24 horas, la mayor parte de las neuronas ya han escogido morir por apoptosis, lo que supone que un incremento en los procesos de autofagia en etapas tempranas de la lesión isquémica podría representar una estrategia neuroprotectora que mejoraría los desenlaces clínicos por disminución de la muerte neuronal.

Previamente, Tian et al (2010), demostraron in vivo la presencia de autofagia en un modelo de isquemia cerebral transitoria mediante estudio de inmunofluorescencia, que mostró aumento de la señal desde el primer día posterior a la lesión isquémica la cual fue descendiendo gradualmente, desapareciendo por completo al día 6, y estos hallazgos fueron marcadamente superiores en el área de penumbra con respecto al core isquémico.

En cuanto a estudios in vitro, Liu et al (2018) encontraron que el flujo autofágico aumenta en cultivos de neuronas y astrocitos en diferentes momentos bajo la exposición a privación de glucosa y oxígeno; y demostraron que un aumento en la activación de la autofagia en astrocitos protege a la neurona sometida a esta clase de estrés.

3.2.1 Rol dual de la autofagia en la lesión por Isquemia.

Como se mencionó anteriormente, aún no es del todo claro el rol de la autofagia en la lesión neuronal por isquemia, ya que los resultados son contradictorios, en gran medida por fallas metodológicas que no permiten llegar a conclusiones certeras al respecto (Chen, Wet al, 2014).

En un intento por mejorar dichas fallas metodológicas, Buckley et al (2014), realizaron un ensayo de inhibición y activación de autofagia en el mismo modelo de isquemia cerebral. Inicialmente demostraron que el cerebro tiene niveles basales de autofagia más altos que otros tejidos, esto debido a que encontraron mayores niveles de LC3II y su precursor LC3I. Esto sugiere que el cerebro tiene tanto la capacidad para la iniciación de un proceso autofágico más activo en respuesta al estrés como capacidad mejorada para apoyar la autofagia en el estrés agudo, posiblemente debido a la alta demanda metabólica del cerebro y la falta de almacenamiento de nutrientes, que hace que el cerebro y las neuronas en particular, sean más vulnerables a la lesión isquémica (Buckley et al, 2014).

Se podría decir que en principio la autofagia es un mecanismo protector en la lesión isquémica. Dicha hipótesis es demostrada al encontrar que al tratar las neuronas bajo el estrés isquémico con rapamicina y cloroquina, activador e inhibidor de la autofagia respectivamente, el aumento en los niveles de autofagia demostró un rol protector al disminuir el tamaño del infarto y el déficit neurológico.

En contraparte Gao et al (2012) describen la autofagia como un proceso deletéreo en un modelo de isquemia cerebral con post-acondicionamiento, en el cual el modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media (ACM) se asocia a oclusión transitoria e intermitente de la arteria Carótida. Esta oclusión transitoria, genera un proceso de reperusión que también se ha estudiado ampliamente en los diferentes modelos de isquemia cerebral, por las alteraciones neuronales que se desencadenan (Zhao et al, 2006), suponiendo un reto adicional en el entendimiento de esta patología y su relación con la autofagia. Este post-acondicionamiento sería capaz de mejorar los desenlaces en estos modelos de isquemia cerebral (Zhao et al, 2006).

Gao et al (2012) demostraron altos niveles de activación de autofagia en la penumbra isquémica con un comportamiento en el tiempo parecido al encontrado por Buckley et al (2014). Sin embargo, en contraparte, encontraron que la activación de la autofagia con la

Rapamicina, con relación a la reperfusión intermitente, mostraba disminución en los efectos benéficos ya conocidos de este tipo de post-acondicionamiento, incrementando el tamaño del infarto y del edema cerebral, sin cambio significativo en los animales controles. Estos hallazgos sugieren que durante la reperfusión post isquémica se llevan a cabo otros procesos moleculares que difieren al menos en el rol protector de la autofagia mostrando una relación dependiente con el flujo sanguíneo y en consecuencia con la carga energética de la neurona.

Por este tipo de estudios continúa siendo controversial el papel de la autofagia en la isquemia cerebral; no es claro si se trata de un proceso benéfico o deletéreo. Sin embargo, parece claro que hay muchos factores que pueden influir en estos desenlaces. Esto demuestra que aún nos falta mucho por comprender no sólo de la relación isquemia cerebral y autofagia, sino también de los mecanismos moleculares subsecuentes a la enfermedad cerebrovascular per-se.

3.2.2 LC3; marcador de autofagia en Isquemia.

Como se mencionó anteriormente, - LC3 es uno de los marcadores de autofagia más usados en la literatura. Esta proteína es un ortólogo en mamíferos de la familia de Atg8 de levaduras, que cumple un papel importante en la elongación del autofagosoma y la fusión con el lisosoma, además de tener un rol significativo durante la xenofagia en vías de defensa (Nguyen et al, 2016)

La producción de LC3 –II resulta de un proceso de múltiples pasos. Existen dos isoformas diferentes: un precursor citosólico, LC3-I; y otro unido a membrana que es conjugado con fosfolípidos, LC3-II. La cantidad del LC3-II se correlaciona directamente con el grado de formación de los autogafosomas (Kabeya et al, 2000). Sin embargo, no necesariamente los niveles de LC3-II estiman la actividad autofágica, porque la inhibición de la degradación del autofagosoma también aumenta en gran medida los niveles de LC3-II. Además, LC3-II puede localizarse ectópicamente en estructuras no autofagosómicas que no se fusionan en el lisosoma, por lo cual es esencial determinar cuánto LC3-II se degrada de una manera dependiente de los lisosomas durante un cierto período de tiempo, lo que se conoce como flujo autofágico (Yoshii, et al, 2017).

Con el fin de determinar la degradación dependiente de lisosomas, Yoshii et al; (2017) recomiendan el uso de inhibidores de enzimas lisosomales tales como E64d y pepstatina A. La diferencia en la cantidad de LC3-II entre muestras con y sin estos inhibidores de lisosomas representa de forma más estricta el nivel de flujo autofágico. Esto último es importante a tener en cuenta durante la valoración de los estudios que determinan autofagia.

El desarrollo de biomarcadores en enfermedad cerebrovascular ha logrado gran importancia en la investigación tanto preclínica como clínica, ya que representan un avance importante en la evaluación diagnóstica y pronóstica del inicio y progresión del accidente cerebrovascular. Además, son también importantes en procesos de patogénesis y como predictores de recuperación. (Smith, B. 2012). Muchas potenciales moléculas biomarcadoras aún están bajo investigación, con resultados prometedores (Gandolfi et al, 2017).

La investigación de los mecanismos moleculares asociados a la autofagia relacionada con isquemia cerebral tiene potencial de ser utilizados como marcadores pronósticos en la práctica clínica. En este aspecto, Li, H. Et al; (2015) estudiaron la relación entre LC3-II en líquido cefalorraquídeo (LCR) y suero de pacientes con accidente cerebro vascular isquémico, y la severidad del déficit neurológico y otros desenlaces clínicos. Ellos inicialmente encontraron que existe autofagia en la isquemia cerebral en humanos y esto se correlacionó con un aumento significativo de los niveles tanto séricos como en LCR de los marcadores de autofagia Beclin 1 y LC3-II, respecto a los controles. Además, los niveles de LCR de estas proteínas se correlacionaron de forma proporcional con el volumen del infarto y el déficit neurológico.

Adicionalmente encontraron que los pacientes con mayores niveles de estos marcadores de autofagia tenían mejor pronóstico a tres meses, es decir menor déficit neurológico, sugiriendo un papel protector de la autofagia en este grupo de pacientes. (Li, H. Et al;2015).

En la búsqueda bibliográfica para la realización de este escrito no se encontró el mecanismo por el cual estos marcadores de autofagia pueden ser medidos en LCR lo que supone una limitante para su uso. Adicionalmente, los autores relatan ciertas limitaciones en su estudio, entre estas la difícil detección de LC3-II y Beclin 1 en LCR de los pacientes

que sirvieron como controles y los riesgos que conllevan la extracción de LCR que no permitió estudiar la cinética de estos marcadores en los casos. Sin embargo, estos resultados abren muchas puertas para continuar con la investigación experimental y clínica.

3.3 Receptores Nucleares LXR en isquemia

Los LXR son factores de transcripción ligando dependientes pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares que se activan formando heterodímeros con el receptor α de retinoide (RXR). Se conocen dos isoformas; LXR α que se expresa predominantemente en hígado, riñón, intestino y macrófagos, y LXR β que se expresa en todos los tejidos (Zelcer 2006).

Estos receptores son activados por metabolitos derivados del colesterol modulando la expresión génica al unirse a elementos de respuesta a LXR (LXREs) en los promotores de los genes relacionados principalmente con el metabolismo del colesterol (ABCA1-ABCG1, ABCG4) entre otros (Lewis, 2005). Los LXR también se ha encontrado que inhiben la transcripción de promotores de ciertos genes (citoquinas proinflamatorias como COX-2 IL 6 IL1B Y MMPs) que no contienen elementos sensibles a LXR (LXREs), fenómeno conocido como transrepresión (Zelcer 2006).

Esta capacidad de regular genes anti-inflamatorios ha hecho que se aumente el uso de agonistas LXR en diferentes escenarios pro-inflamatorios como la isquemia cerebral aguda. Morales Et al (2008) fueron los primeros en reportar un efecto neuroprotector de agonistas LXR en relación con procesos de isquemia. En un ensayo de oclusión permanente de la arteria cerebral media en ratas adultas, evaluaron la capacidad neuroprotectora de dos agonistas LXR (GW3965 y TO901317), y encontraron que, aunque existen expresión basal de LXR α y LXR β en cerebros de murinos sanos, la expresión de LXR α aumenta tras la exposición a isquemia sugiriendo un rol específico del receptor en esta patología. Encontraron además que la inyección intraperitoneal del agonista 10 minutos o 1 hora después de la oclusión arterial mejoraba todos los desenlaces relacionados con la isquemia cerebral, incluyendo disminución del tamaño del infarto y del déficit neurológico. Adicionalmente reportaron disminución en la expresión de mediadores proinflamatorios como COX-2 iNOS y MMP-9 como se había descrito

anteriormente en la literatura, esto a través de la regulación del factor de transcripción NFκB.

Resultados similares han sido descritos por otros investigadores. Sironi et al (2008) encontraron en un modelo focal de isquemia cerebral, disminución del tamaño del infarto y del compromiso neurológico tras el tratamiento con agonista LXR incluso hasta 2 horas después de la oclusión arterial, sugiriendo una ventana terapéutica útil en el escenario clínico. Cheng et al (2010) utilizaron el agonista LXR GW3965 y encontraron que proporciona protección contra muerte celular en neuronas de región CA1 de hipocampo tras isquemia cerebral, además de reducción de expresión de genes pro-inflamatorios COX-2, al disminuir la activación de NFκB. Además, reveló mejoría en los desenlaces cognitivos en un modelo de isquemia global.

Morales et al (2008) ya había demostrado que en ratas con ausencia de expresión de LXRα y β, el daño por isquemia tras oclusión aguda de la arteria cerebral media era mayor que en ratas silvestres, indicando un efecto neuroprotector de la expresión basal de LXR. Además, Zhang et al (2015) en un estudio poblacional de polimorfismos de LXRα encontraron asociación entre variaciones genéticas en el gen LXRα y la incidencia y severidad de ACV en una población de china como un factor de riesgo independiente a edad, sexo y niveles séricos de glucosa y colesterol.

En estudios ulteriores se ha demostrado el efecto neuroprotector por activación de agonista LXR, al incrementar la expresión de proteínas sinápticas, promoviendo el crecimiento axonal y la remodelación vascular, además de la inducción de plasticidad después del ACV (Chen, 2010. Cui, 2013.). Se ha encontrado también efecto neuroprotector en modelos in vitro de ACV hemorrágico por modulación de las vías de citotoxicidad (Wu, 2016).

Dados los hallazgos de la última década, los agonistas sintéticos LXR se muestran como una terapia prometedora en el escenario de isquemia cerebral tanto aguda como crónica (Sun 2018), y tal vez también en hemorragia cerebral. Se ha demostrado además que estos agonistas atraviesan la membrana hematoencefálica, y que puede actuar en ventanas terapéuticas aceptables para uso en el escenario clínico.

3.4 Activación de la autofagia por agonistas LXR

Como se mencionó previamente, la activación de la autofagia parece tener un rol neuroprotector en el escenario de isquemia cerebral aguda, y se ha demostrado que los agonistas LXR son capaces de activar procesos de autofagia como se describe a continuación.

Liu et al (2013), exploraron si el rol de LXR en una lesión inflamatoria del miocardio estaba relacionado con la inducción de la autofagia. En corazones de ratones neonatos bajo estrés inducido por lipopolisacáridos, como modelo de inflamación cardíaca, se realizó pretratamiento con el agonista LXR TO901317 de forma intraperitoneal y se demostró aumento significativo de la formación de autofagosomas con respecto al grupo control, posiblemente por inactivación de la vía AKT/mTOR.

Por otra parte, Segala y colaboradores (2017) demostraron que la Dendrogenina A (DDA) un agonista parcial LXR presenta una actividad anti tumorigénica potente en células de melanoma al estimular la expresión de los factores proautofágicos Nur77, NOR1 y LC3-II bajo el control de LXR β

Haque et al (2021) evaluaron el efecto del stigmasterol, un fitoesterol con actividad agonista LXR en un modelo *invitro* de hipoxia Re-oxigenación con células hipocámpales de cultivo primario de ratón, encontrando que el pretratamiento con el stigmasterol incrementa significativamente la expresión de los niveles de LC3 IIB en comparación con las células expuestas a la hipoxia re-oxigenación sin tratamiento y a aquellas en normoxia con mejoría de la supervivencia neural. Demostraron además incremento en los niveles de PINK1 sugiriendo neuroprotección mediada por activación de mitofagia.

Aunque actualmente la evidencia que relaciona el incremento en la autofagia por agonistas LXR no es muy robusta, los resultados son prometedores y ponen a este tipo de moléculas en la mira como objetivos terapéuticos a estudiar en diferentes patologías.

3.5 Agonistas naturales de LXR

Las moléculas fitoterapéuticas han ganado gran atención en los últimos años por su potencial efecto neuroprotector en diversas enfermedades como Alzheimer y Parkinson y porque son productos naturales ampliamente distribuidos que además cuentan con diferentes propiedades farmacológicas como su efecto antioxidante, antiinflamatorio, anti tumorogénico entre otros. (Long H, 2021). También se ha comprobado su efecto en modelos de isquemia cerebral (Ding C, 2018) (Wu, Y, 2021) y de hecho ya se ha logrado correlacionar muchos de estos con activación de vías de autofagia (Ahsan, A, 2021) (Haque, M. N, 2021).

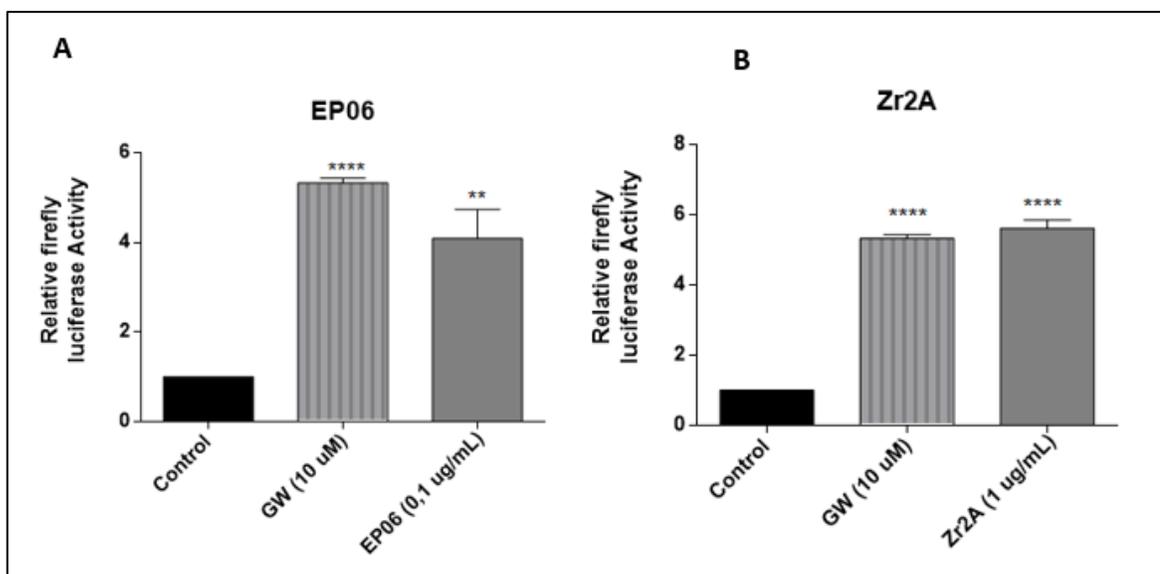


Figura 3.5.1 Ensayo de actividad Luciferasa de compuestos extraídos de la planta colombiana *Zanthoxylum Caribeum*. Comparación de la actividad Luciferasa con respecto a un control sin actividad LXR y al agonista sintético GW3975. A. Actividad Luciferasa de EP06 significativamente mayor con respecto al control negativo indicando que el compuesto activa receptores LXR. B. Actividad Luciferasa de Zr2A significativamente mayor al control negativo con niveles cercanos al compuesto sintético indicando que el compuesto activa receptores LXR.

El grupo de investigación de muerte celular de la Universidad Nacional se ha enfocado en la búsqueda de compuestos con actividad neuroprotectora extraídos de diferentes plantas colombianas, entre estas plantas del género *Zanthoxylum* que cuenta con un amplio reporte de usos medicinales y de compuestos con potencial para el tratamiento de múltiples padecimientos y que además está ampliamente distribuida en el continente americano.

En esta ocasión se utilizarán 2 compuestos extraídos de la planta *Zanthoxylum Caribeum* (EP06 y ZR2A) en los cuales se comprobó actividad LXR mediante ensayos de Luciferasa (Fig. 3.5.1) y se utilizó la concentración que mostró al menos el 80% de viabilidad celular por MTT. (Caicedo, J;2021. Datos no publicados).

4 Materiales y Métodos

4.1 Modelo experimental

La complejidad de la lesión cerebral isquémica es difícilmente bien modelada por un sistema in vitro dado que solo se cuenta con células aisladas o piezas de tejido cerebral en ausencia de vasos sanguíneos y flujo vascular, limitando el estudio de la unidad neurovascular además de la infiltración de células inflamatorias periféricas. Sin embargo, los modelos in vitro permiten la investigación de mecanismos moleculares y bioquímicos específicos como puntos de control en vías de muerte celular, autofagia y apoptosis bajo condiciones de deficiencia energética al igual que en la isquemia cerebral (Holloway, P. M.,2016) (Sommer C. J.2017). Estos modelos representan una alternativa a los modelos in vivo dado que son menos complicados y requieren menos animales para producir datos confiables (Tasca, C. I., 2015)

El modelo in vitro más frecuente de isquemia cerebral es la privación combinada de glucosa y oxígeno. Típicamente los cultivos celulares son expuestos a privación de glucosa y oxígeno por 1 a 24 horas, sin embargo 1 hora de privación de glucosa y oxígeno es suficiente para inducir muerte neuronal en un sistema in vitro. (Holloway, P. M.,2016)

El uso de cultivos primarios de neuronas y células gliales han mostrado beneficios importantes para entender su rol específico en la fisiopatología del accidente

cerebrovascular por lo tanto son un importante componente de la investigación preclínica en esta área, por supuesto en combinación con experimentos in vivo (Sommer, 2017).

Por lo anterior se planteó como modelo de este proyecto de investigación, privación combinada de glucosa y oxígeno en líneas celulares con fenotipo de neuronas y células gliales y cultivo primario de neuronas y células gliales de corteza de ratón, gracias a la información fundamental y significativa con respecto al mecanismo molecular de las lesiones inducidas por isquemia principalmente en corazón, cerebro (Ryou M, 2018)

4.2 Uso de Animales

El uso de animales y todos los procedimientos relacionados fue revisado y aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia, de acuerdo a las normativas nacionales e internacionales pertinentes: Capítulo VI de la LEY 84 DE 1989 y el Título V de la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud; al igual que los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (National Research Council, 1996)

4.3 Estandarización del protocolo de privación de glucosa y oxígeno

4.3.1 Diseño cámara de Hipoxia de bajo costo

Se creó una cámara de hipoxia de bajo costo basado en diseños similares reportados en la literatura (Wright W, 2006,) a partir de bolsas de polipropileno con cierre tipo ziploc conectada a dos dispositivos reguladores del flujo que permitían la entrada y salida de mezcla de gases (N₂ 95% CO₂ 5%).

Para evitar el riesgo de contaminación por la manipulación repetida de los materiales y asegurar el sello hermético, se utilizó una maquina selladora de impulso manual sobre las entradas de los reguladores de flujo y estos fueron retirados antes de poner la cámara con los respectivos platos de cultivo en la incubadora de uso habitual.



Figura 4.1 Cámara de Hipoxia. Se muestra prototipo de cámara de hipoxia de bajo costo a partir de bolsas de polipropileno con cierre tipo ziploc conectada a dos dispositivos reguladores del flujo para la entrada y salida de mezcla de gases (N2 95% C02 5%)



Figura 4.2. Montaje de Cámara de Hipoxia en Incubación con platos de cultivo: Se muestra montaje para privación de oxígeno, los platos de cultivo están en el interior de la cámara con la mezcla de gases hasta el 80% de su capacidad, y esta se lleva a incubadora bajo condiciones usuales de cultivos celulares por el tiempo de hipoxia determinado.

4.3.2 Protocolo de privación de glucosa y oxígeno

Con líneas de neuroblastoma humano SH-SY5Y y glioblastoma Humano UMG87 se realizaron pruebas de viabilidad celular bajo exposición a privación de glucosa y oxígeno en diferentes tiempos y se determinó el tiempo en el cual ocurría del 40 al 50% de

muerte celular en ausencia de tratamiento, dado que si el porcentaje de muerte celular es muy alto los efectos del agente neuroprotector pueden ser difíciles de medir in vitro (Ryou M, 2018).

El protocolo de privación de glucosa y oxígeno se adaptó de Tasca y colaboradores (2015) Se describe en el Anexo A

4.4 Cultivo Celular

Se llevaron a cabo experimentos de viabilidad celular con las líneas celulares de neuroblastoma SHSY5Y y glioblastoma UMG87, para control de autofagia se usaron fibroblastos humanos y para caracterización de autofagia en escenario de privación de glucosa y oxígeno se usó cultivo primario de células neuronales y gliales de corteza de ratón.

Tanto los medios de cultivo como los procedimientos específicos de siembra y crecimiento están descritos en el anexo b.

4.5 Grupos experimentales

Tabla 1. Grupos experimentales e intervención

Grupo	Intervención
Control	Células de cultivo primario o de línea a una confluencia esperada del 70-80% con cambio de medio según protocolo.
Control de autofagia	Células de cultivo primario o de línea a una confluencia esperada del 70-80% expuestas a privación de glucosa en condiciones de normoxia
Celulas tratamiento PGO	sin más Células de cultivo primario o de línea a una confluencia esperada del 70-80% sometidas a PGO sin pretratamientos
Tratamientos PGO	más Células de cultivo primario o de línea a una confluencia esperada del 70-80% pretratadas con agonista LXR (GW3975) o con las

fracciones ZR2A y EP06 24 horas antes de la PGO

Control	con	Células de cultivo primario a una confluencia esperada del 70-
tratamiento sin		80% sin privación de glucosa ni oxígeno tratadas con agonista
OGD		LXR y con extractos durante 24 horas

4.6 Pruebas de viabilidad Celular

4.6.1 MTT

Para evaluar el efecto de los tratamientos (Agonistas LXR y privación de glucosa y oxígeno) las células se sembraron en placas de 96 pozos. Una vez finalizados los tratamientos, el medio de cultivo fue aspirado y las células se incubaron con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich). El MTT es un compuesto soluble de color amarillo que al reducirse por la actividad metabólica de las células se transforma en un compuesto de color violeta insoluble en agua. Para cuantificar, se disuelve en un disolvente orgánico como el dimetilsulfóxido (DMSO) y se mide su absorbancia. El MTT se disolvió en DMEM-F12 y DMEM según el tipo celular, a una concentración de 0,5 mg/ml. Después de 3 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich) a cada pozo. La absorbancia se midió a 595 nm de longitud de onda en un lector de placas Multiskan (Thermo Fisher)

4.6.2 LDH

Este ensayo se realiza según las especificaciones del fabricante del kit CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay. El kit utiliza una reacción enzimática acoplada a la actividad de la LDH. La reacción de la diaforasa permite la reducción de una sal de tetrazolio a formazán rojo que se mide colorimétricamente a 490 nm.

Luego de transcurridos los tiempos de incubación respectivos para cada experimento, se toman 50 μ l de medio de cultivo y se transfirieren a una caja de 96 pozos.

Se adicionan 20 μ l del reactivo CytoTox 96 y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente protegido de la luz.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detiene adicionando 50 μ l de una solución de ácido acético 1 M. Posteriormente se lee en el espectrofotómetro a 490 nm.

4.7 Western Blot

Una vez realizados los tratamientos, las células serán lisadas en 200 μ l de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; ditioneitol 100 mM; inhibidores de proteasas y fosfatasas; y azul de bromofenol). Las muestras fueron centrifugadas 2 veces por 15 minutos y sonicadas durante 5 minutos

Para el análisis de expresión de proteínas, una fracción de 30 μ g de proteína de cada muestra se separarán en un gel de SDS-PAGE al diferentes concentraciones de acuerdo al peso molecular de las proteínas bajo condiciones reductoras: las muestras se disuelven en buffer Laemmli y se desnaturalizan a 95°C durante 10 min.

La electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se llevará a cabo en una cámara de electroforesis con buffer de corrido, posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) después de lo cual la membrana se bloquea en buffer de por 1 h. A continuación, la membrana se incuba con los anticuerpos primarios diluidos en buffer de bloqueo, durante la noche a 4°C.

Al siguiente día, la membrana se lava con TTBS 3 veces por 5 min y se incuba con los anticuerpos secundarios diluidos en buffer de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente.

Luego, la membrana se lava con TTBS 3 veces por 5 min y se detectará la presencia de las proteínas por quimioluminiscencia.

Las condiciones de electroforesis y transferencia específicas para cada proteína aislada se detallan en el anexo c.

4.8 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados en el programa GraphPad Prism 8.0.1, se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk, La significación estadística de las diferencias en los datos con criterios de normalidad se determinó mediante prueba t de Student no pareada y ANOVA de 2 vías con un análisis post hoc mediante prueba de Dunnett, los datos que no cumplieron normalidad se analizaron con la prueba Kruskal Wallis y el análisis pos hoc se hizo con la prueba de Dunn. Las pruebas usadas se especifican en el pie de cada una de las figuras junto con la descripción de la significancia estadística, en general un asterisco (*) identifica valores de P ajustados entre 0,01 y 0,05, dos asteriscos (**) identifican valores de P ajustados entre 0,01 y 0,001.

5 Resultados

5.1 El modelo de privación de glucosa y oxígeno con el uso de la cámara de hipoxia de bajo costo, induce muerte celular en relación con el tiempo de exposición.

Se expusieron las líneas celulares UGM87 y SHSY5Y privación de glucosa y oxígeno (PGO) encontrando a la visualización directa por microscopia de luz cambios morfológicos celulares correspondientes a procesos de muerte celular como contracción y edema celular, bullas celulares, pérdida de la integridad de la membrana celular e inclusiones Citoplasmáticas (Cummings, 2012) Fig 5.1.1

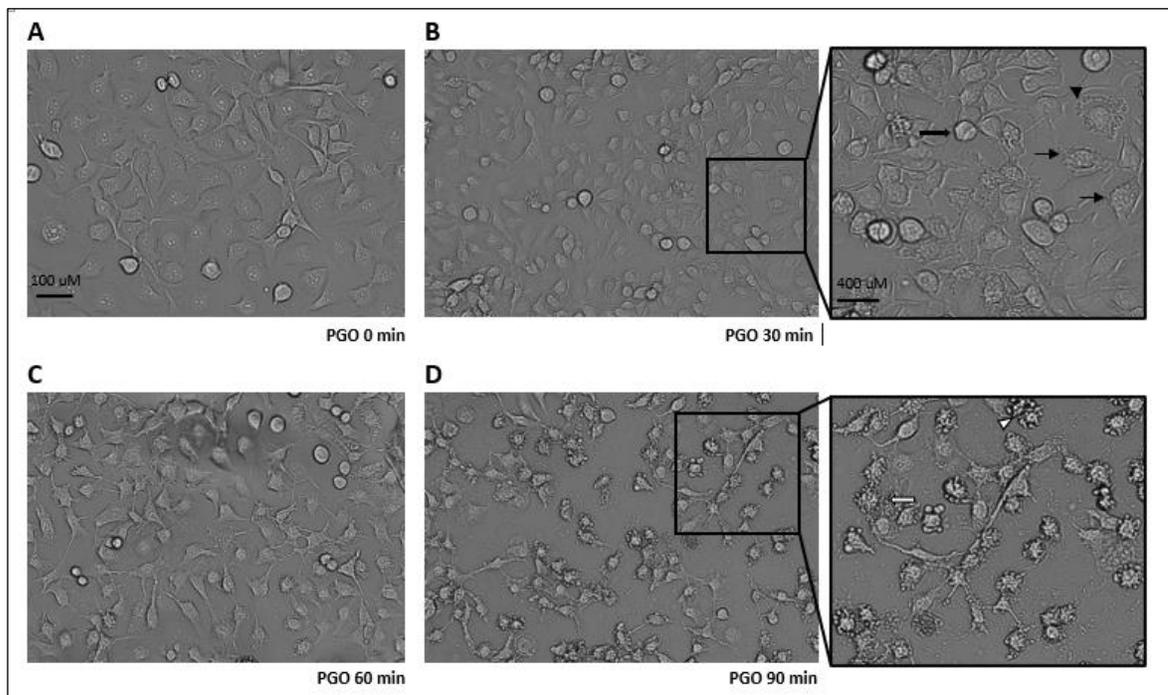


Figura 5.1.1 Cambios morfológicos celulares tras la exposición a PGO visualización directa por microscopia de luz cambios morfológicos celulares correspondientes a procesos de muerte celular. **(A)**. Células SHSY5Y no diferenciadas en condiciones normales de crecimiento. **(B)** Células SHSY5Y sometidas a 30 minutos de PGO que muestran los primeros cambios morfológicos correspondientes a procesos de muerte. Ampliación de la imagen, punta de flecha negra: Bullas celulares, Flechas negras a la derecha; Células edematizadas con inclusiones citoplasmáticas. Flecha a la izquierda; Células redondeadas que han perdido sus prolongaciones. **(C)** Células SHSY5Y sometidas a 60 minutos de PGO, los cambios celulares de muerte son evidentes en más células. **(D)** Células SHSY5Y sometidas a PGO por 90 Min. La mayoría de las células muestran cambios morfológicos, Ampliación: Punta de flecha Blanca: Células con pérdida total de la morfología ruptura de la membrana celular. Flecha Blanca: Contracción del citoplasma celular.

HIF-1 es un complejo dimérico que tiene un papel importante en la respuesta a bajas concentraciones intracelulares de oxígeno sirviendo como factor de transcripción de múltiples genes involucrados en vías de supervivencia, angiogénesis y proliferación. Comprende dos subunidades: HIF-1 α que se encuentra en el citoplasma y la subunidad HIF1-b en el núcleo; en condiciones de hipoxia, la subunidad α se estabiliza y es trasladada al núcleo para servir de factor de transcripción (Ziello, j. 2007) (Qin, C. 2022). Se quiso aislar la subunidad alfa para comprobar su activación tras incubar las células en la cámara de hipoxia de bajo costo, sin embargo su obtención mediante western blot es difícil y costosa a la vez que se requieren de una variedad de costosos inhibidores de proteasas y/o congelación rápida en nitrógeno líquido para estabilizar HIF-1 α durante la preparación de la muestra (Srinivasan, S. 2011) y por los medios estándar de extracción y electroforesis no fue posible visualizarla y cuantificarla.

Por lo tanto, se procedió a determinar el tiempo de PGO al cuál las células presentaban al menos un 50% de supervivencia para realizar los ensayos con tratamientos. Se incubó las células con Medio sin glucosa (HBSS + Pen/strep 1%) durante 0, 30, 60 y 90 minutos (para la línea SHSY5Y) y 0, 60, 120 Y 240 minutos, (para la línea UGM87) en cámara de hipoxia, posterior a esto se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular indirecta (Actividad mitocondrial con MTT) de acuerdo con indicaciones del fabricante. (Fig 5.1.2) Este ensayo se realizó de forma independiente 3 veces.

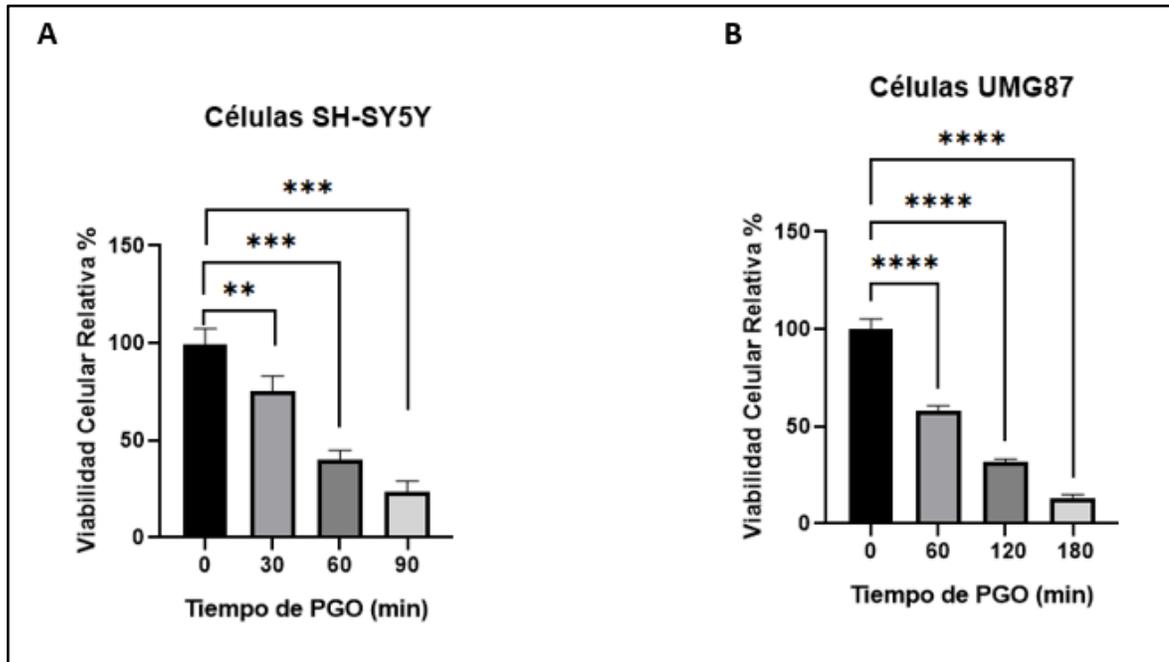


Figura 5.1.2. La viabilidad celular relativa disminuye a medida que aumenta el tiempo de exposición a PGO. (A) Ensayo de viabilidad indirecta (Actividad mitocondrial con MTT) en células SHSY5Y expuestas a 0, 30, 60 y 90 minutos de PGO con disminución progresiva de la viabilidad celular con significancia estadística frente al control (0 min). **(B)** Ensayo de viabilidad indirecta (Actividad Mitocondria con MTT) en células UMG87 expuestas a 0, 60, 120 y 180 min de PGO mostrando disminución progresiva de la viabilidad celular con significancia estadística frente al control (0 min). Los datos representan medias de tres experimentos independientes. Se realizó Anova de una vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Los ensayos mostraron que la actividad mitocondrial disminuye a medida que aumenta el tiempo de privación combinada de glucosa y oxígeno. Para la línea SHSY5Y a los 30 minutos se observó una viabilidad celular relativa superior al 75% y a los 60 minutos alrededor del 40%, y a los 90 minutos del 25%, asumiendo un patrón lineal inverso, daría como resultado un tiempo aproximado de 45 min, el cual se toma de base para realizar los ensayos ulteriores. (Fig 5.1.2. A)

Para la línea UMG87 Los ensayos mostraron de forma congruente que la actividad mitocondrial disminuye a medida que aumenta el tiempo de privación combinada de glucosa y oxígeno, teniendo un porcentaje ligeramente superior al 50% a los 60 min de PGO, se toma este tiempo como base para los otros experimentos (Fig 5.2. B).

Con respecto a lo reportado en la literatura, el modelo de PGO propuesto es más lesivo dado que requiere mucho menos tiempo para reducir la viabilidad celular que los usados por otros investigadores. (Ryou, M. 2018) (Chiang, M.2022) (Jia, Z, 2017).

5.2 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones genera protección frente a la privación de glucosa y oxígeno de forma significativa tanto en células SHSY5Y como en UMG87

Para verificar si los extractos con acción agonista LXR (ZR2A, EPO6) ofrecen protección frente a la exposición a PGO; tras comprobar adecuada adherencia y confluencia, se retiró completamente el medio de crecimiento y se puso medio nuevo con los tratamientos ZR2A (1ug/ml) y EPO6 (0.1ug/ml), además se usó como control positivo de activación de LXR el compuesto GW a concentración de 2 ug/ml. Las células se incubaron en condiciones usuales por las siguientes 24 horas. Después de esto se expusieron las células a PGO durante 0 y 45 minutos (Línea SHSY5Y) y 0 y 60 minutos (Línea UMG87), posterior a esto se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular indirecta (Actividad mitocondrial con MTT) de acuerdo con indicaciones del fabricante.

Tras 24 horas de tratamiento con los extractos se evidenció recuperación de la actividad metabólica celular como medida indirecta de viabilidad de manera significativa para ambos extractos en comparación con las células no tratadas en ambas líneas celulares demostrando un efecto protector ante la lesión combinada de privación de glucosa y oxígeno, Sin embargo, el efecto fue más notorio en la línea celular UMG87, al ser células metabólicamente diferentes se puede entender las diferencias en las respuestas al tratamiento, teniendo en cuenta además que las células de morfología neuronal son más susceptibles a la lesión combinada de hipoxia y glucosa (Fig 5.2)

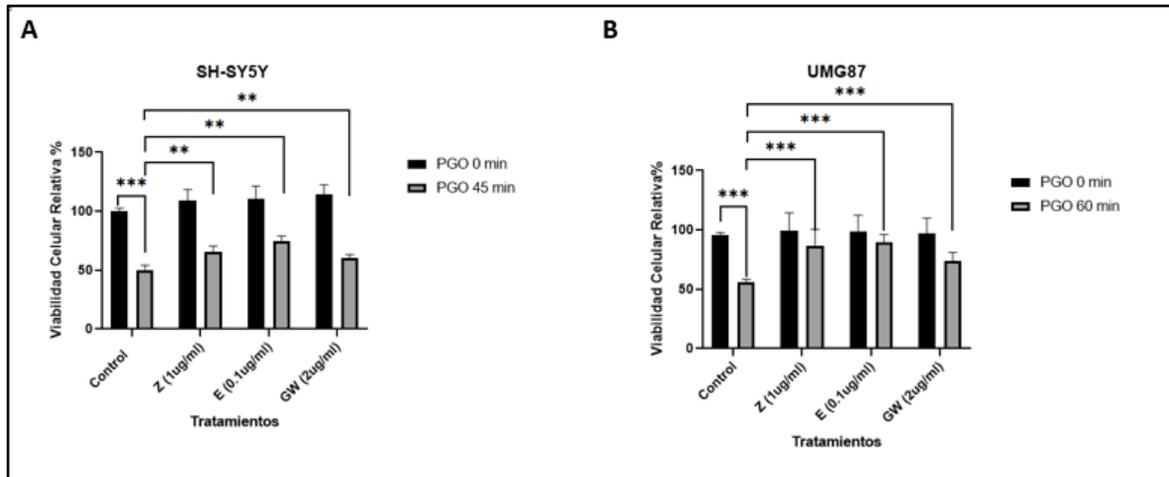


Figura 5.2. El pretratamiento de 24 horas con el agonista LXR y las fracciones ZR2A y EP06 genera protección frente a la privación de glucosa y Oxígeno. (A) En células SHSY5Y expuestas a 45 min de PGO se puede ver que tras la lesión se pierde aproximadamente el 50% de viabilidad celular (Protección mitocondrial) la cual se recupera en las células pretratadas con el agonista LXR y las fracciones ZR2A y EP06. **(B)** En Células UMG87 se puede ver el mismo comportamiento, sin embargo, la respuesta es más robusta. Los datos representan medias de tres experimentos independientes. Se realizó Anova de dos vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

5.3 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones genera protección frente a PGO en células gliales

Una vez estandarizado el protocolo de privación de glucosa y oxígeno con los resultados preliminares obtenidos de líneas celulares, Se realizó cultivo primario de células neuronales y gliales de corteza de ratón. Entre el día 11 y 15 in vitro las células se expusieron a PGO durante 60, 90 y 120 min para glía y 30, 45 y 60 min para neuronas. Por limitación en células y reactivos se determinó por observación directa en microscopio de luz que el tiempo al cual se realizarían los ensayos para verificar protección ante PGO era 60 min para glía y 45 min para Neuronas. (Fig 5.3.1)

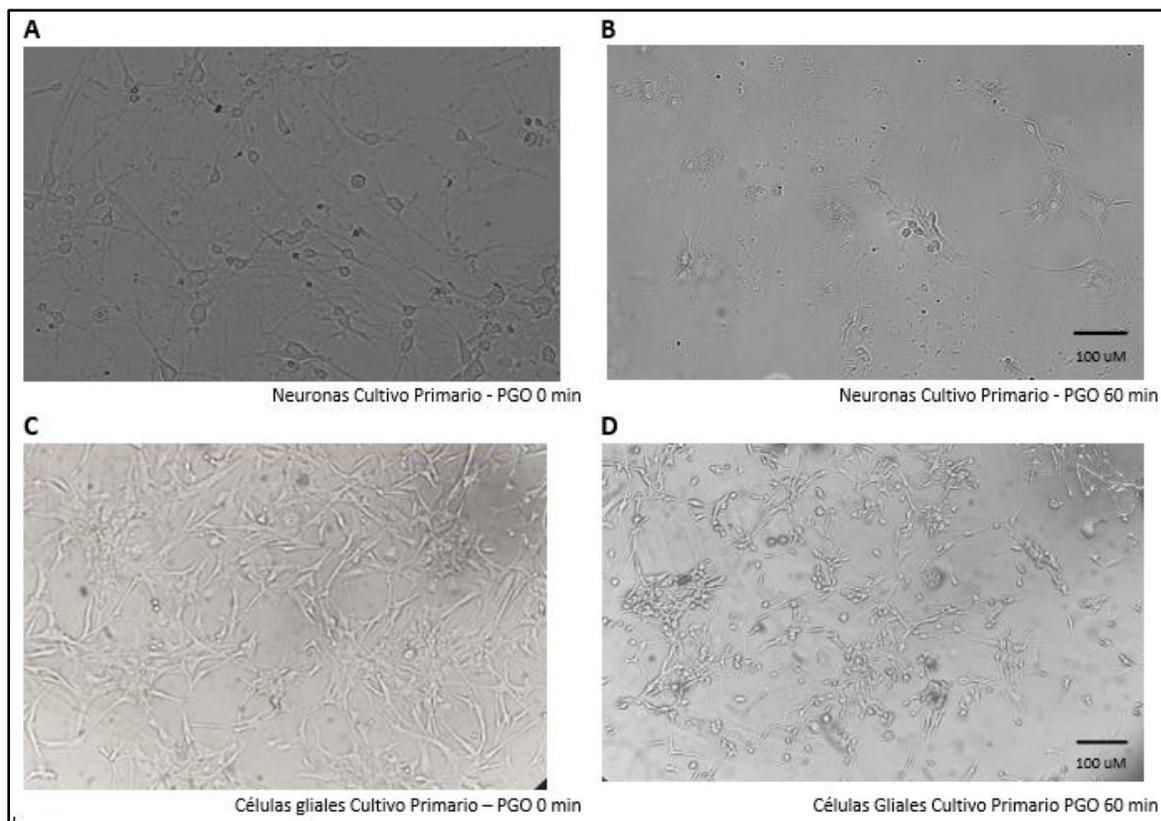


Figura 5.3.1 Cambios Morfológicos tras la exposición a PGO en Neuronas y células gliales. Microfotografías de neuronas y células gliales de cultivo primario en condiciones basales y expuestas a PGO. **(A)** Neuronas de corteza de cultivo primario de Raton al día 9 in vitro. Se observa un cultivo maduro con una amplia población de neuronas interconectadas entre sí. **(B)** Neuronas de corteza de cultivo primario de Raton al día 9 in vitro expuestas a 60 min de PGO, se observa disminución en la cantidad total de neuronas, pérdida de las prolongaciones, aumento del tamaño celular y numerosos detritos celulares. **(C)** Células gliales de corteza de ratón al día 14 in vitro. Células maduras en confluencia aproximada del 80%. **(D)** Células gliales expuestas a 60 min de PGO con disminución de la población celular, pérdida de las interconexiones y disminución del tamaño celular.

El tratamiento con las fracciones (ZR2A Y EPO6) y el agonista sintético GW se hizo en las mismas condiciones y con las mismas concentraciones que en líneas celulares. En este caso se llevó a cabo ensayo de viabilidad por liberación de LDH.

Las células gliales no mostraron cambios significativos en la viabilidad celular respecto al control con los tratamientos al tiempo 0 de PGO (Fig 5.3.2-A) sin embargo, tras la exposición a PGO por 60 min se presentó incremento en la liberación de LDH hasta poco más del 40%, que disminuye de forma significativa en las células pretratadas tanto con las fracciones en estudio como con el agonista sintético de LXR, demostrando un efecto protector ante la lesión combinada de privación de glucosa y oxígeno. (Fig 5.3.2-B)

Este ensayo no se pudo realizar en Neuronas dado que las células no lograron la adherencia y confluencia necesarias para el mismo.

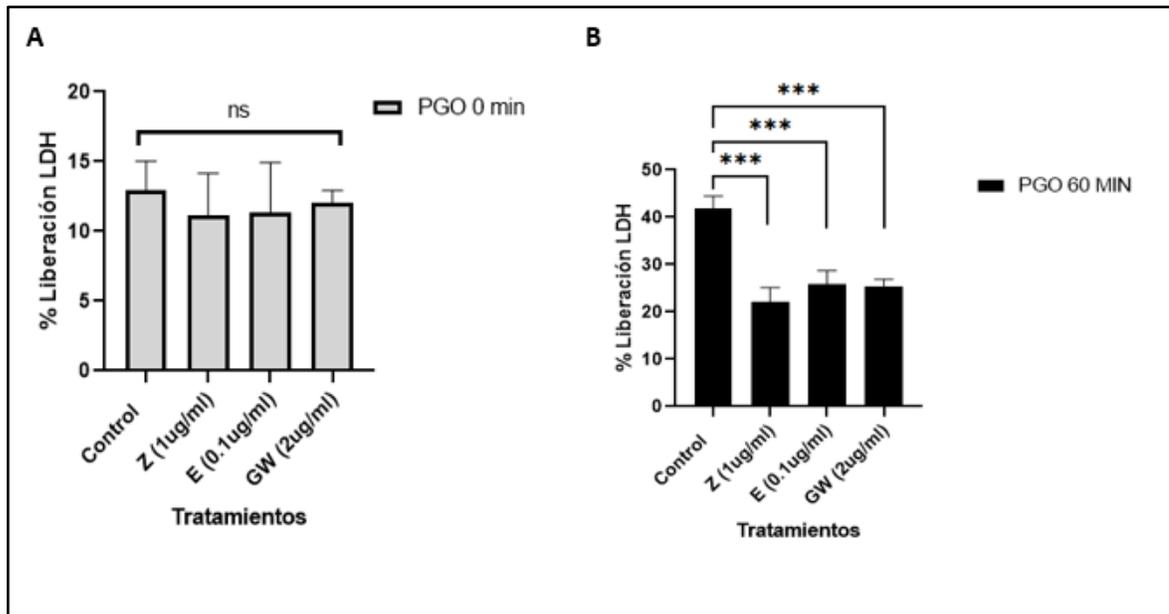


Figura 5.3.2 El pretratamiento con el agonista LXR y las fracciones ZR2A y EP06 disminuyen de forma significativa la liberación de LDH tras la exposición a PGO en células gliales. Ensayo de viabilidad celular por liberación de LDH (% del control de muerte) (A) Las células gliales tratadas durante 24 horas con las fracciones en estudio y el agonista LXR no mostraron cambios significativos en la liberación de LDH con respecto a las células no tratadas. (B) Tras la exposición a PGO de 60 min la liberación de LDH es de aproximadamente el 40% que disminuye de forma significativa en las células pretratadas. Se realizó Anova de dos vía y para comparaciones múltiples se aplicó la prueba de contrastes T de Dunnett * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$, ns no significativo.

5.4 Las células gliales y neuronales de cultivo primario de corteza de ratón muestran diferencias en los niveles basales de LC3 I-II y tras la privación de glucosa.

Un método común para monitorizar la autofagia es la medición de la conversión de LC3I a LC3II y los niveles relativos de LC3II mediante western blot, sin embargo, puede ser difícil la obtención mediante este método por diferentes razones, entre ellas que esta proteína puede ser inestable y degradada rápidamente incluso en la presencia de inhibidores de proteasas. En algunas células además la expresión de LC3-I es abundante y la intensidad de la banda puede dificultar la detección de LC3-II, por lo cual se requieren condiciones específicas para lograr la diferenciación de la forma lipídica de la no lipídica (Gómez, 2015).

Para estandarizar los métodos de extracción, electroforesis, transferencia y visualización de la proteína se realizaron diferentes ensayos que incluyeron diferentes líneas celulares.

Inicialmente se realizaron pruebas con la línea celular U87MG sin embargo no se encontraron bandas diferenciadas de LC3-I y LC3-II, ni se encontraron cambios con respecto al control de Autofagia (Resultados no mostrados). Según lo reportado en la literatura las líneas celulares de cáncer presentan cambios en las vías de autofagia de forma basal (Koukourakis, M, 2015) lo que haría más difícil la visualización de cambios inducidos por las fracciones en estudio, por lo cual se continuó el proceso de estandarización con células con actividad metabólica normal (Fibroblastos de biopsia de pacientes jóvenes)

Para este propósito se realizó una curva de privación de glucosa durante 60, 90 y 120 min con los Fibroblastos. El protocolo de western blot para el aislamiento específico de esta proteína se muestra en el anexo 3. Se observa una tendencia de aumento progresivo de los niveles relativos de LC3II a los 60 y 90 minutos que cae de forma significativa a los 120 min, en posible relación con degradación lisosomal (Fig 5.4.1-B) al contrario, la relación LC3II/LC3I va aumentando progresivamente con el tiempo alcanzando el máximo a los 120 minutos (Fig 5.4.1-C), demostrando las fluctuaciones que presenta la proteína en relación con el tiempo.

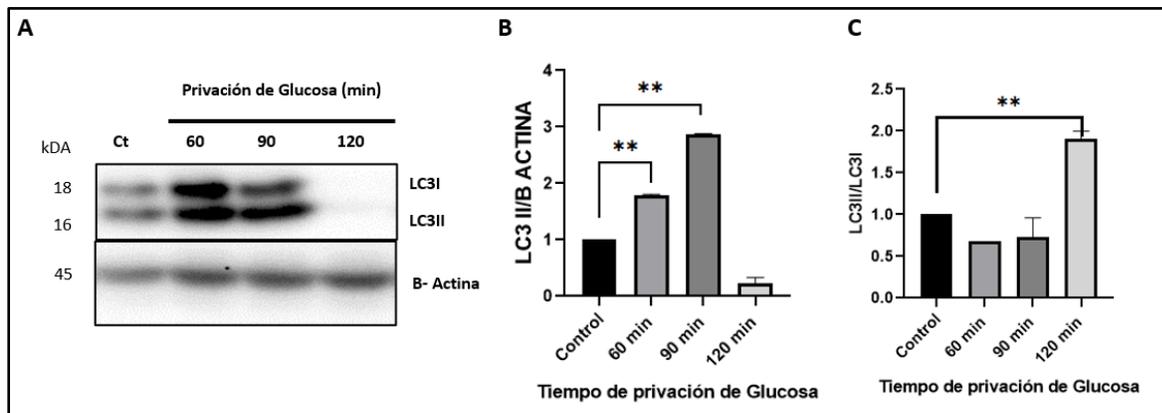


Fig 5.4.1 Cambios en los niveles de expresión de LC3B y la relación LC3BII/LC3BI con respecto a tiempo de privación de glucosa en fibroblastos. Fibroblastos humanos se expusieron a diferentes tiempos de privación de glucosa en normoxia. **(A)** Western blot representativo de LC3 II(16kDA) y LC3I (18kDA) y β -actina (45kDA) de fibroblastos expuestos a 60, 90 y 120 min de privación de glucosa. **(B)** Expresión relativa de LC3II con aumento significativo a los 60 y 90 min y evidencia de disminución a los 120 min. **(C)** Relación LC3 II/LC3I tras la privación de glucosa mostró cambios significativos a los 120 min, aunque los niveles totales de LC3II son evidentemente menores este resultado da cuenta de que en este tiempo la mayoría de isoforma detectada es la lipídada posiblemente en relación con procesos de autofagia tardíos. Se realizaron pruebas T pareadas comparando cada grupo con el control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Se escogió como control positivo de todos los grupos experimentales, células de cultivo primario expuestas a privación de glucosa en condiciones de normoxia, dado que los inhibidores de MTOR como la Rapamicina o la privación de aminoácidos pueden ser usados como controles positivos para inducción autofagia, sin embargo, la Rapamicina puede fallar en activar la autofagia en cultivos primarios de neuronas a pesar de su potente estimulación en algunas líneas celulares de cáncer, tampoco es buena inductora de autofagia en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, y se ha descrito que la privación de glucosa puede ser mucho más eficiente para inducir la autofagia que la Rapamicina o la privación de aminoácidos en cultivos de neuronas. (Klionsky, D. J. et al, 2021)

Basado en la información anterior se realizó privación de glucosa en condiciones de normoxia a las células gliales y neuronales de cultivo primario durante el mismo tiempo que serían expuestas a PGO, 60 min para células gliales y 45 min para Neuronas.

En ambos grupos celulares se observaron diferencias de los niveles de LC3II en las células expuestas a privación de glucosa con respecto al Basal, llamativamente los niveles basales de LC3 II en las células gliales son poco perceptibles en comparación con los niveles basales de las Neuronas (Fig 5.4.2-A). Este hallazgo difiere con el reportado previamente por Liu X y colaboradores (Liu X, 2017) quienes encontraron que bajo condiciones normales el flujo automático permanece en bajos niveles en las neuronas mientras que en astrocitos se observan niveles altos.

Sin embargo, no se encontraron estudios adicionales que compararan el flujo autofágico basal diferenciado entre glía y neuronas.

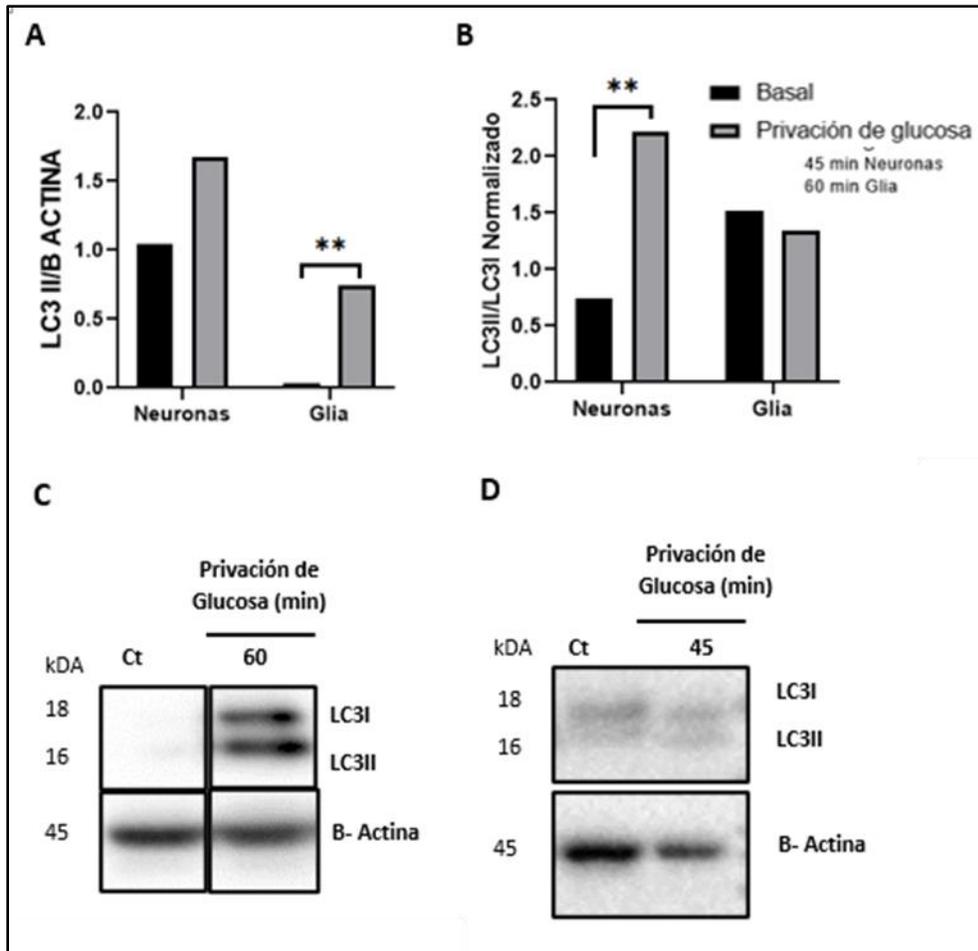


Figura 5.4.2 Niveles de expresión relativa de LC3I-II basales y con privación de glucosa de neuronas y células gliales de cultivo primario. (A) Expresión Relativa de LC3II en Neuronas y glia en condiciones basales y bajo privación de glucosa por 45 y 60 min respectivamente, en células gliales se observa un aumento significativo tras la privación de glucosa. (B) La Relación LC3II/LC3I en neuronas presenta un aumento significativo con respecto al basal sin cambios significativos en células gliales. (C Y D) *Western blot* representativo de LC3 II (16kDA) y LC3I (18kDA) y β -actina de Células gliales (C) y Neuronas (D) de cultivo primario de corteza de ratón expuestos a 60 y 45 min de privación de glucosa. Se realizaron pruebas T pareadas comparando con el basal de cada grupo celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$,

5.5 La PGO aumenta los niveles de LC3 II en células gliales y neuronales de cultivo primario de forma significativa con respecto al basal.

Para conocer las Fluctuaciones en los niveles de LC3I-II secundarios a la exposición a PGO, se llevó a cabo con células gliales y neuronales de cultivo primario a los días 14 y 10 in vitro respectivamente. El procedimiento de PGO y western blot para aislamiento y

cuantificación de la proteína se realizó de acuerdo con los protocolos descritos en los anexos A y C.

Los resultados indicaron que tanto para las neuronas como para las células gliales la exposición a PGO aumenta de forma significativa los niveles relativos de LC3-II respecto a condiciones basales (Fig 5.5-A). Adicionalmente, en el caso de las neuronas, la relación LC3II/LC3I también aumenta de forma significativa sin embargo para las células gliales no existe una diferencia estadísticamente significativa (Fig 5.8-B). Si se comparan las células expuestas a privación de glucosa en normoxia con las expuestas a PGO, en estas últimas se puede ver un ligero aumento de los niveles de LC3II, sin embargo, tampoco se encontraron diferencias significativas.

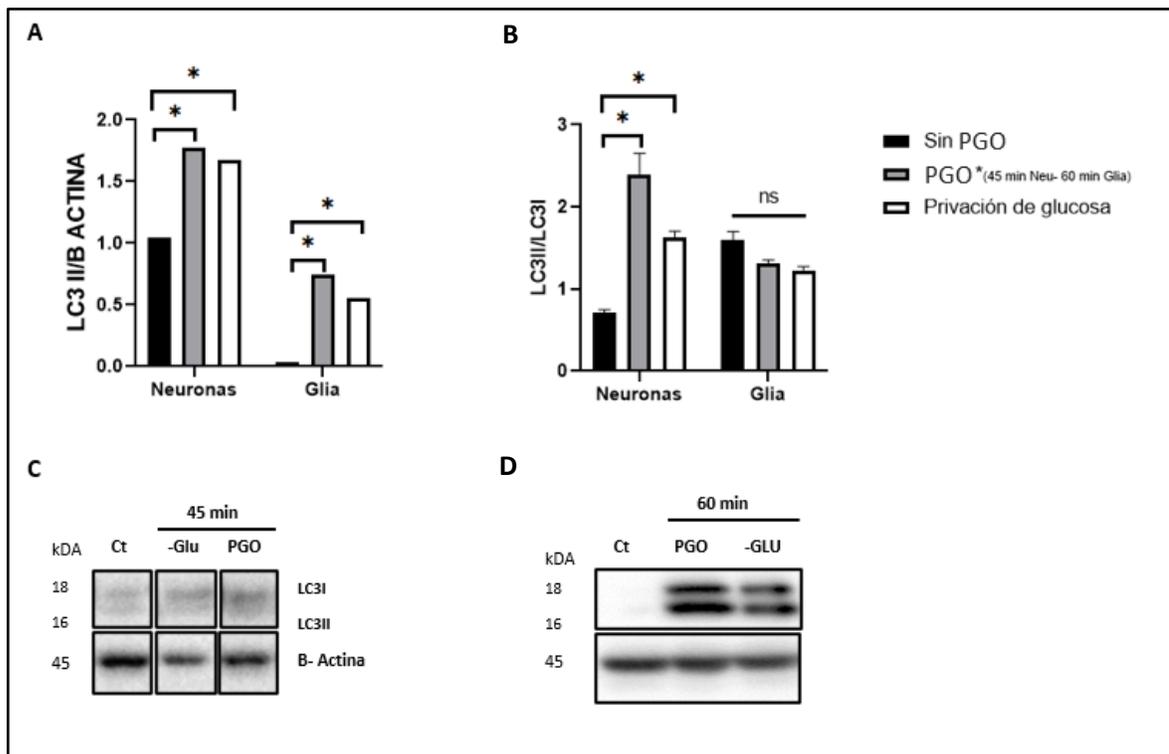


Figura 5.5 Niveles de expresión relativa de LC3-II basales y tras privación de glucosa en y privación combinada de glucosa y oxígeno de neuronas y células gliales de cultivo primario. (A) Expresión Relativa de LC3II en Neuronas y glía en condiciones basales, bajo privación de glucosa y PGO por 45 y 60 min respectivamente, en células gliales se observa un aumento significativo tras la PGO. **(B)** La Relación LC3II/LC3I en neuronas presenta un aumento significativo con respecto al basal sin cambios significativos en células gliales. **(C Y D)** Western blot representativo de LC3 II (16kDa) y LC3I (18kDa) y β -actina de Células gliales **(C)** y Neuronas **(D)** de cultivo primario de corteza de ratón expuestas a 60 y 45 min de PGO. Se realizaron pruebas T pareadas comparando con el basal de cada grupo celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$,

Estos resultados se correlacionan con los descritos previamente por otros autores que reportaron aumento en los niveles de autofagia posterior a la lesión por isquemia en modelos in vivo (Wen, Y. D. 2008) (Deng, Y. H, 2016) y en otros modelos de privación

combinada de glucosa y oxígeno in vitro (Qin, A. P., 2010) (Kasprowska, D., 2017), (Zhao, H.,2022)

5.6 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones podría activar la autofagia en células gliales, pero no en células neuronales de cultivo primario de corteza de ratón.

Los niveles de autofagia basal de la célula en estudio deben identificarse ya que, si los tratamientos se agregan después de un tiempo en el que la autofagia basal ya es alta, los efectos de este pueden quedar enmascarados por la autofagia basal de la célula y se pueden sacar conclusiones erróneas. Para evitar esta situación, 24 horas previas a la exposición a PGO se hizo cambio de medio y se dejó incubando en condiciones usuales por 2 horas con el fin de reducir y equilibrar los niveles de autofagia basal, posterior a lo cual se agregaron los tratamientos a las dosis ya conocidas junto con el agonista sintético de LXR; 24 horas después, las células tratadas se dividieron en dos grupos uno de los cuales se sometería a privación combinada de glucosa y oxígeno por 45 min para neuronas y 60 minutos para células gliales. El esquema de los grupos experimentales se muestra en la Tabla 1. A continuación, se hizo extracción de proteína para llevar a cabo Western Blot según protocolo estandarizado para detección de LC3B.

Los resultados tanto de los niveles basales como posterior a la exposición a PGO mostraron diferencias en cada grupo celular por lo cual se expondrán por separado.

Las células gliales mostraron aumento significativo de los niveles relativos de LC3II en condiciones basales para la fracción ZR2A y para GW, aunque para la fracción EPO6 también mostro aumento este no fue significativo. Tras la exposición a PGO las células tratadas tanto con la fracción Z como con el agonista GW presentan aumento significativo en los niveles de LC3II en comparación con las no tratadas (Fig 5.6.1-A). En cuanto a la relación LC3II-LC3I se vio un comportamiento similar al observado con los niveles relativos de LC3II, es decir, aumento en condiciones basales con el tratamiento de ZR2A Y GW significativo

esta vez sólo para la fracción Z con una tendencia al aumento posterior a la exposición combinada de glucosa y oxígeno sin embargo no fue significativa para ningún tratamiento (Fig 5.6.1-B).

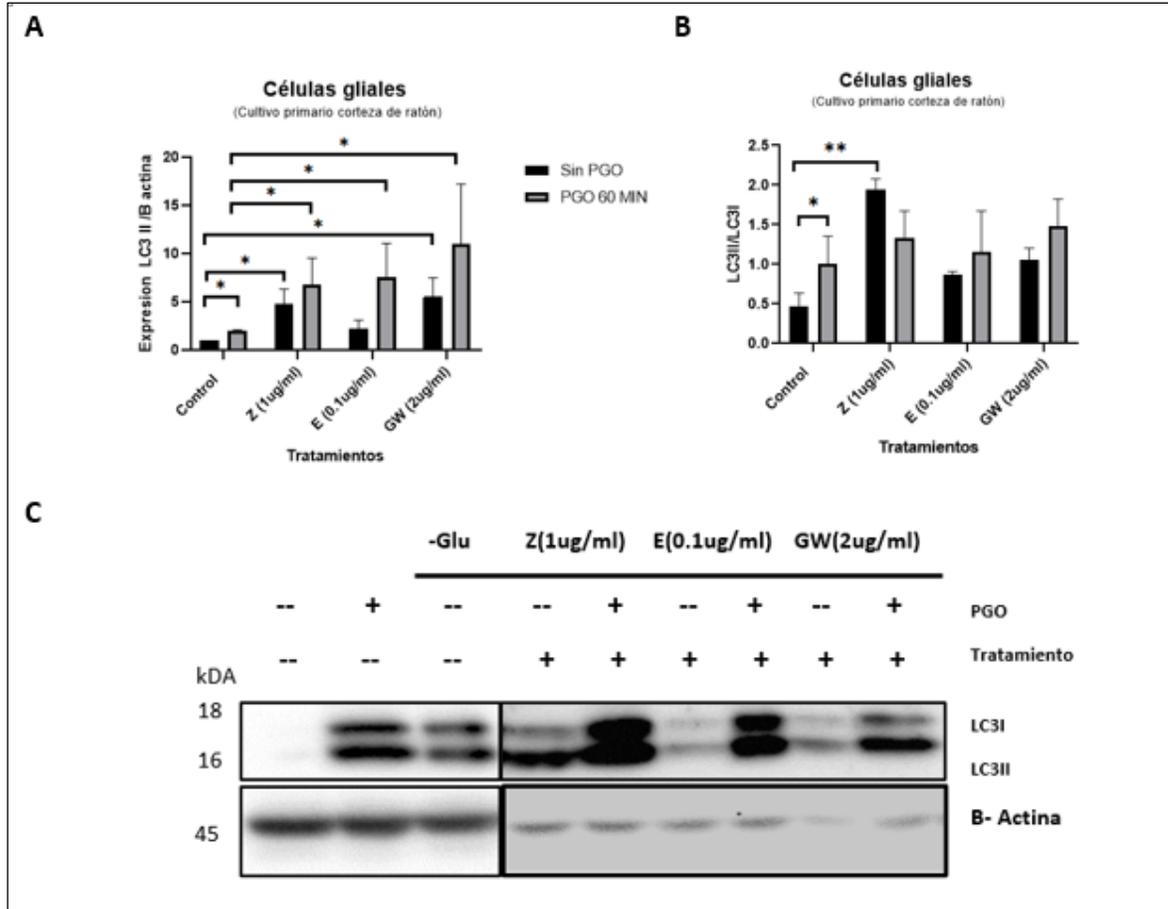


Figura 5.6.1 El pretratamiento con la fracción ZR2A y con el agonista sintético LXR aumenta los niveles de LC3BII

en células gliales. (A) Expresión Relativa de LC3II en células gliales pretratadas con GW, ZR2A Y EP06 en condiciones basales y expuestas a PGO por 60 min, se observa aumento significativo en las células pretratadas con ZR2A y GW en condiciones basales y tras la exposición a PGO fue significativo para los 3 tratamientos. (B) La Relación LC3II/LC3I en glía presenta aumento significativo con respecto al basal en células tratadas con ZR2A sin cambios significativos con los otros tratamientos. (C) *Western blot* representativo de LC3 II(16kDA) y LC3I (18kDA) y β -actina de Células gliales de cultivo primario de corteza de ratón expuestos a 60 min de PGO. Se realizaron pruebas T pareadas comparando cada grupo celular con el control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$,

Con respecto a las neuronas las células tratadas en condiciones basales muestran una tendencia al aumento en los niveles relativos de LC3II con EP06 y con GW sin embargo no es estadísticamente significativa, la tendencia parece mantenerse con las células expuestas a PGO, aunque tampoco es significativo. Por otro lado, la relación LC3II/LC3I no muestra cambios en las células tratadas bajo condiciones normales de glucosa y

oxígeno ni en comparación con las células tratadas sometidas a privación combinada de glucosa y oxígeno (Figura 5.6.2)

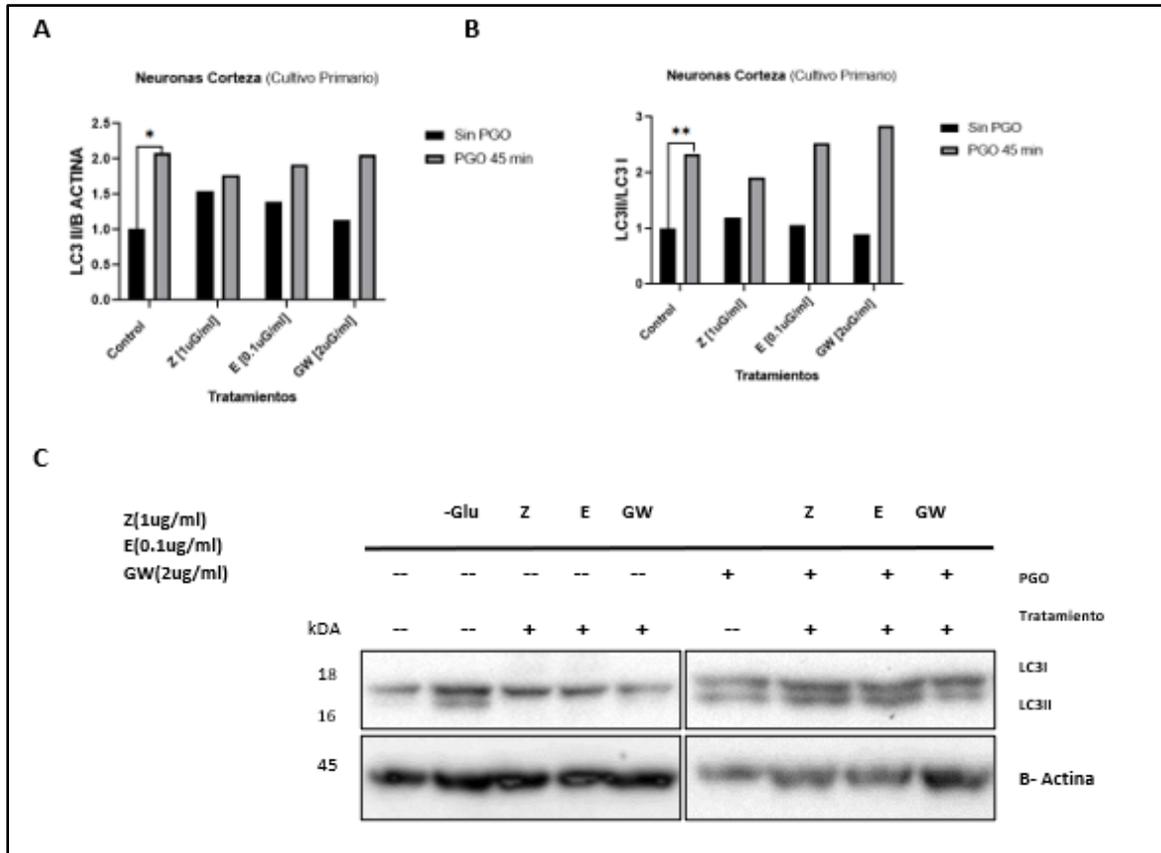


Figura 5.6.2 Los niveles de LC3BII no cambian en las neuronas tratadas con los tratamientos en estudio. (A)

Expresión Relativa de LC3II en neuronas pretratadas con GW, ZR2A Y EP06 en condiciones basales y expuestas a PGO por 45 min, No se observan cambios significativos en las células pretratadas en condiciones basales ni tras la exposición a PGO. (B) La RelaciónLC3III/LC3I en neuronas no presenta cambios significativos con respecto al basal en células tratadas. (C) Western blot representativo de LC3 II(16kDA) y LC3I (18kDA) y β-actina en neuronas de cultivo primario de corteza de ratón expuestas a 45 min de PGO. Se realizaron pruebas T pareadas comparando cada grupo celular con el control. * p<0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001

Una vez más los resultados confirman que la respuesta a la activación de vías de autofagia en neuronas y en células gliales es diferente ante la exposición a PGO y el pretratamiento con el agonista sintético LXR y con las fracciones en estudio. Ya otros autores habían demostrado que ante el mismo estímulo las células gliales y las neuronas podrían responder o no a un tratamiento específico a la hora de activar vías de autofagia. Hu y colaboradores (2016) demostraron que tras la exposición a trombina en un modelo in vitro e in vivo en astrocitos aumenta la

expresión de LC3II y Beclin 1 sin embargo en neuronas los cambios son indetectables.

Como se dijo anteriormente, diversos estudios han demostrado que los agonistas LXR pueden tener un efecto neuroprotector en un escenario de privación de glucosa y oxígeno, sin embargo, hasta ahora no muchos estudios relacionan esta protección con activación de vías de autofagia (Haque, M. N, 2021), y poco se ha explorado su efecto en células gliales, los resultados muestran que la fracción ZR2A y el agonista sintético LXR tienen la capacidad de activar vías de autofagia de forma basal en células gliales y que esta activación podría tener un efecto protector ante la lesión por privación combinada de glucosa y oxígeno.

5.7 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones no genera cambios significativos en la fosforilación de AKT

Para conocer los posibles mecanismos por los cuales los tratamientos modifican los niveles de LC3BII, se quiso explorar proteínas corriente arriba de activación de vías de autofagia, por lo cual, tras realizar el mismo procedimiento de pretratamiento y privación de glucosa y oxígeno, por protocolo estándar de western blot se quiso evaluar las proteínas AKT total, P- AKT y p mTOR.

A pesar de realizar diferentes protocolos sugeridos para la detección de p mTor, no se logró obtención de una banda por western blot que pudiera cuantificarse, por lo cual el análisis de los niveles de expresión de esta proteína no se llevó a cabo.

AKT es considerado el mediador central de la vía de señalización PI3K/Akt que regula diversas actividades celulares pro-supervivencia y se ha comprobado el efecto protector de la activación de esta vía en escenarios de isquemia tanto in vivo (Xian, M, 2021) como in vitro (Jia, Z , 2017)(Wu, Y, 2021), clásicamente por la inhibición cascada abajo de proteínas proapoptóticas

De acuerdo con la evidencia disponible (Ding, C,2018) (Wu, Y.,2021), los niveles de AKT fosforilada disminuyen en escenarios de isquemia. Ante la exposición a PGO en ambos grupos celulares se observa de forma congruente disminución significativa para ambos

grupos celulares. No hay cambios significativos en las células tratadas con respecto a las no tratadas en condiciones basales tanto en neuronas como en células gliales (Fig 5.7.1-2), en neuronas puede verse un ligero aumento en los niveles de p AKT y p AKT/AKT con la fracción EPO6 y con el agonista GW que es apenas perceptible una vez las células se exponen a privación de glucosa y oxígeno, sin embargo, los tratamientos no recuperan la pérdida de fosforilación de AKT producida por la privación de glucosa y oxígeno (Fig 5.7.1).

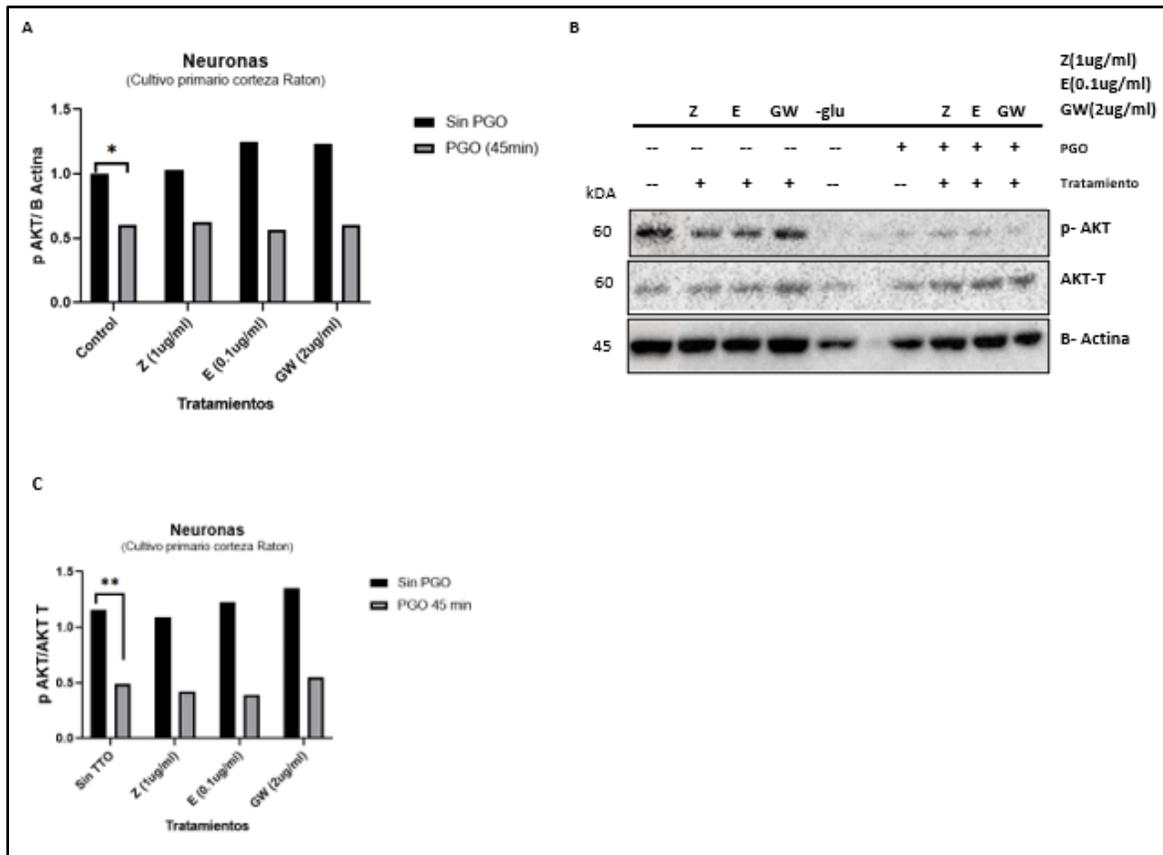


Figura 5.7.1 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones no genera cambios significativos en la fosforilación de AKT en neuronas. (A) Expresión Relativa de AKT en neuronas pretratadas con GW, ZR2A Y EP06 en condiciones basales y expuestas a PGO por 45 min, No se observan cambios significativos en las células pretratadas en condiciones basales ni tras la exposición a PGO. (B) Western blot representativo de AKT T, p AKT (60Kda) y β -actina en neuronas de cultivo primario de corteza de ratón expuestas a 45 min de PGO (C) La Relación p AKT/AKT en neuronas no presenta cambios significativos con respecto al basal en células tratadas. Se realizaron pruebas T pareadas comparando cada grupo celular con el control. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$

Las células gliales tratadas con la fracción EP06 y con el agonista GW también muestran una tendencia no significativa al aumento de los niveles de p AKT con respecto a las

células no tratadas tanto en condiciones basales como tras la exposición a PGO, en cuanto a la relación p AKT/AKT sólo se evidencia cambios posterior a la privación combinada de glucosa y oxígeno sin embargo tampoco es estadísticamente significativo (Fig. 5.7.2)

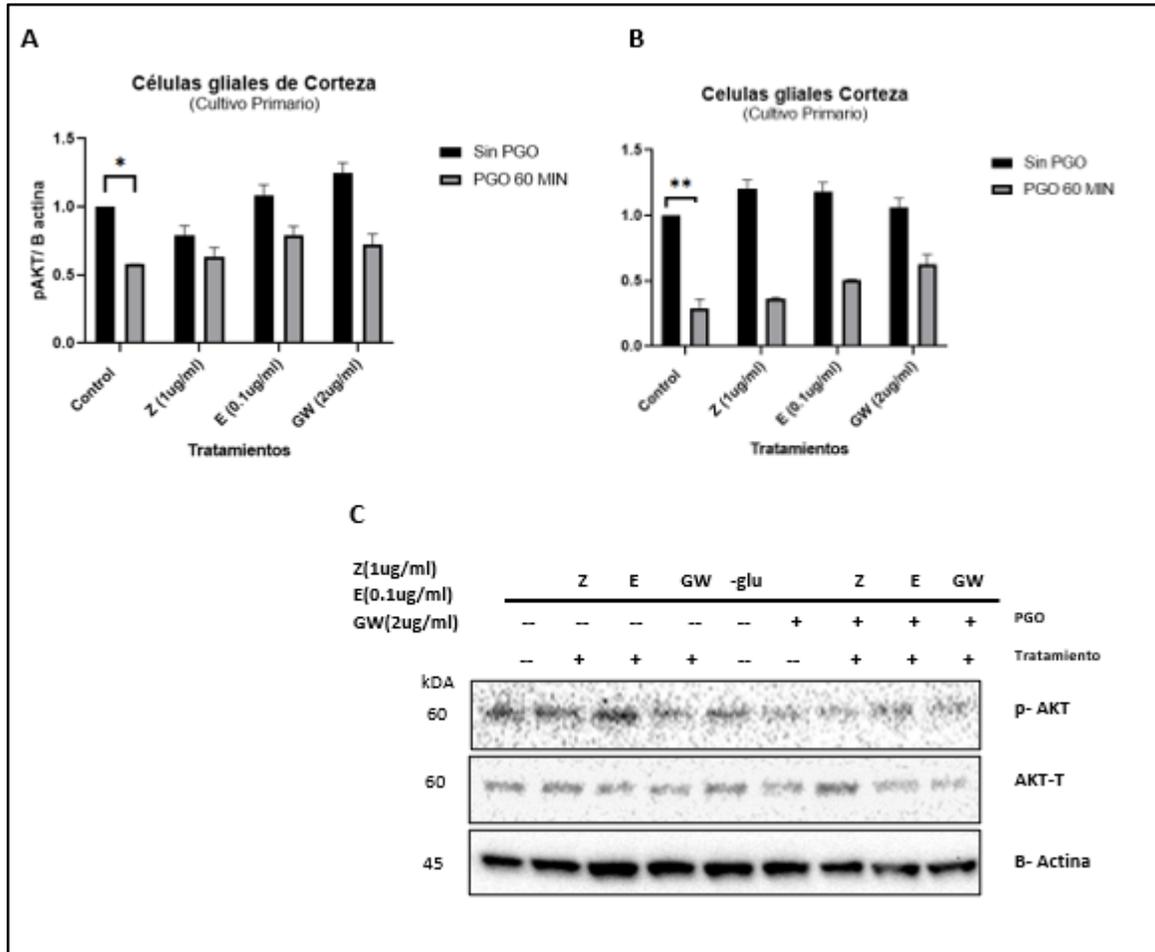


Figura 5.7.2 El pretratamiento de 24 horas con las fracciones no genera cambios significativos en la fosforilación de AKT en células gliales. (A) Expresión Relativa de AKT en neuronas pretratadas con GW, ZR2A Y EP06 en condiciones basales y expuestas a PGO por 60 min, No se observan cambios significativos en las células pretratadas en condiciones basales ni tras la exposición a PGO. (B) La Relación p AKT/AKT en neuronas no presenta cambios significativos con respecto al basal en células tratadas. (C) Western blot representativo de AKT T, p AKT (60Kda) y β-actina en neuronas de cultivo primario de corteza de ratón expuestas a 45 min de PGO Se realizaron pruebas T pareadas comparando cada grupo celular con el control. * p<0,05; ** p<0,01 y *** p<0,001

Se sabe que mTOR es el regulador negativo más importante de la autofagia y además que la vía PI3K/AKT es la vía de modulación más importante de mTOR. La activación de la vía PI3K/AKT/mTOR puede promover la supervivencia neuronal y por activación de mTOR inhibir la autofagia (Zhang, Z, 2018) por eso el interés en estudiar esta vía como

posible reguladora de la protección que confieren los tratamientos tras la exposición a PGO en especial en células gliales.

A la luz de los resultados se puede decir que la protección que confieren los extractos ante un estímulo de privación de glucosa y oxígeno no es mediada por fosforilación de AKT, a la vez que no modifica los niveles de fosforilación de AKT basales ni logra recuperación de estos una vez sometidas PGO. Esto es verdad tanto para células gliales como para neuronas. Conociendo que en células gliales las fracciones tienen la capacidad de activar la autofagia sin que existan cambios corriente arriba de m TOR.

6 Discusión de resultados

La enfermedad cerebrovascular isquémica es una de las primeras causas de morbimortalidad a nivel mundial y las secuelas en los sobrevivientes representan una carga económica grande para los sistemas de salud (Thrift et al, 2017). Hasta ahora, las terapias de reperfusión (trombectomía mecánica o trombólisis medicamentosa) son las únicas que han mostrado resultados eficaces con ciertas desventajas como el riesgo de sangrado, la estrecha ventana terapéutica y el acceso a las mismas (Xiong, Y., 2019). Por lo que diversos investigadores han sumado esfuerzos en dos direcciones, ampliar la ventana terapéutica en la que las terapias de reperfusión pueden ser usadas y terapia neuroprotectora con la intención de reducir la muerte celular y disminuir las secuelas neurológicas, incluso se ha planteado en diferentes estudios clínicos la combinación de ambas (Mulder, I. A, 2021) (Lyden P. D, 2021).

En este trabajo quisimos enfocarnos en la capacidad neuroprotectora de los agonistas LXR por activación de las vías de autofagia en un modelo de privación de glucosa y oxígeno.

La privación combinada de glucosa y oxígeno se ha usado desde hace casi 2 décadas para simular el estado energético que ocurre en las células durante y después la isquemia cerebral (Amado, B, 2022). Hemos planteado previamente las ventajas de este modelo especialmente su baja complejidad, requiere menos animales que los modelos in vivo y permite además estudiar los grupos celulares por separado (Juntunen, M.,2020).

Clásicamente este modelo se lleva a cabo con cámaras de hipoxia similares en diseño a las cámaras de flujo laminar o estructuras cilíndricas con una base abierta y diferentes dispositivos de intercambio de gases que crean el ambiente hipóxico. Estas presentan diversas desventajas, su costo puede ser prohibitivo para algunos laboratorios que también podrían encontrar dificultades para adaptarlas a las necesidades locativas y experimentales del mismo; requieren grandes cantidades de gas para lograr homogenización de este dentro de la cámara, aumentado el costo por experimento. Esto ha motivado a diversos autores a desarrollar dispositivos mas pequeños y económicos que puedan generar resultados comparables con los existentes (Saxena, S, 2020) (Marchus, C. 2021)

El modelo de cámara de hipoxia que desarrollamos para este proyecto se basó en el diseño de Wright W y colaboradores (2006), otros autores en el país han usado previamente diseños similares (Pipicano, 2016) simulando de forma adecuada el ambiente hipóxico. Como se describió, los cambios morfológicos que se pudieron ver en las células comprueban la activación de vías de muerte celular tras la exposición combinada de privación de glucosa y oxígeno y por medio de ensayos de viabilidad celular se pudo comprobar que en líneas celulares produce alteración de la actividad mitocondrial proporcional al tiempo de exposición. Llamativamente en nuestro modelo los tiempos de exposición que mantuvieran al menos el 50% de viabilidad celular fueron menores a los descritos por otros autores, siendo un modelo mucho más lesivo tanto para neuronas como para células gliales. Varios factores pudieron influir en las diferencias, primero la mezcla de gases que usamos es diferente a la usada por otros investigadores ya que no incluye oxígeno libre. El tamaño de la cámara, dado que se logra la homogenización del gas en el medio más rápido y por último el medio de privación de glucosa en este caso fue solución de Hanks (Gibco), en otros casos se ha usado Dmem sin glucosa que contiene diversos aminoácidos que podrían favorecer la supervivencia celular. Por lo anterior se considera que nuestro modelo podría emular mejor las condiciones energéticas del core isquémico con una caída abrupta de

nutrientes y del aporte de oxígeno celular. Para caracterizar mejor este modelo de PGO podrían realizarse ensayos que diferencien los tipos de muerte celular para contextualizar mejor el objetivo terapéutico. Las principales limitaciones del modelo es la falta de monitorización de las concentraciones reales de oxígeno y su fluctuación en el tiempo, monitorización de temperatura que se asume igual a la de la incubadora donde se pone la cámara de hipoxia. Monitorizar estas variables ayudaría a que las condiciones de replicación de cada ensayo sean exactamente las mismas.

Una vez realizada la estandarización del modelo, mediante ensayos de viabilidad celular comprobamos que tanto las fracciones ZR2A y EP06 como el agonista sintético LXR confieren protección en las líneas celulares SHSY5Y y UMG87 cuando fueron tratadas 24 horas antes de exposición a PGO por recuperación de la actividad mitocondrial. En las células gliales se vio un efecto similar con disminución de la liberación de LDH en las células pretratadas sometidas a PGO. Ambos resultados en contexto demuestran que los tratamientos podrían, al menos, cambiar la forma en la que las células están muriendo dado que la liberación de LDH se presenta típicamente tras la ruptura de la membrana celular en un tipo de muerte más parecida a la necrosis la disminución de los niveles de liberación de LDH representaría una de dos, que las células están muriendo menos o que han escogido otro tipo de muerte celular que no lleva a ruptura de la membrana.

Esto es importante en el escenario de la isquemia cerebral dado que se conoce que, si bien, la lesión primaria es lesiva, las lesiones secundarias por activación de vías inflamatorias aumentan la cadena de eventos que empeoran el daño y el pronóstico neurológico en el paciente (Tuo, Q. Z, 2022). Ya otros autores han demostrado que diferentes tipos de muertes celulares se superponen tanto en el core isquémico como en la penumbra, siendo más frecuente la necrosis en el core y la apoptosis en la penumbra y que favorecer los tipos de muerte celular que no implique liberación del contenido citoplasmático mejoran la viabilidad celular a largo plazo y secundario a esto los síntomas neurológicos en ratones (Chapuisat, G., 2010).

Ahora bien, la teoría inicial, es que esta protección se confiere mediante la activación de vías de autofagia, conocida la capacidad que tienen los agonistas LXR en otros tipos celulares para modularla y sabiendo la complejidad de este proceso intracelular que

como ya se describió se activa de forma diferente según el tipo celular y el estímulo al que se somete.

Todas las formas de autofagia fueron activadas bajo condiciones de déficit de nutrientes y se reveló a nivel intracelular el papel regulador negativo de mTOR de la macro autofagia sin embargo el papel que desempeña en otros tipos de autofagia es menos conocido. (Yamamoto, A, 2014)

También se ha descrito la respuesta diferencial ante la deficiencia de nutrientes con una rápida respuesta en órganos como hígado, músculo y corazón pero no así en el cerebro (Mizushima et al. 2004) y otros autores han reportado diferencia en la respuesta incluso entre diversos tipos de células neuronales, por ejemplo en células de Purkinje parecen ser más susceptibles a hiperactivación de las vías de autofagia con un posible efecto neurotóxico (Oliva Trejo, 2020) y por el contrario la inhibición de las vías de autofagia en neuronas dopaminérgicas favorece la degeneración de axones y dendritas promoviendo la acumulación presináptica de α sinucleína. (Friedman, L, 2012)

Teniendo en cuenta lo anterior, se consideró importante determinar en las células en estudio los niveles basales de autofagia y sus cambios con la privación de glucosa y la privación combinada de glucosa y oxígeno para entender cómo podrían responder a los tratamientos. Los procesos de autofagia basal y ante estímulos estresantes se han estudiado menos en células gliales que en neuronas, algunos autores han descrito que estas células responden de forma más robusta al déficit de nutrientes que las neuronas (Yamamoto, A, 2014), Lo cual concuerda con lo que evidenciamos a partir de la cuantificación de LC3II que aumenta significativamente tras la exposición a PGO en ambos tipos celulares, pero es mucho más intensa en la glía.

Sin duda, uno de los hallazgos principales que se encontraron cuando quisimos evaluar qué pasaba con los niveles de LC3 en las células en estudio tras el tratamiento por 24 horas con las fracciones ZR2A y EP06 y el agonista LXR. En neuronas no hubo cambios significativos que permitieran concluir que los tratamientos inducían activación de las vías de autofagia, sin embargo, las células gliales mostraron aumento en los niveles basales tanto de LC3I como de su forma lipídica de LC3II significativos para la fracción ZR2A y el agonista GW tendencia que se mantuvo posterior a la privación de glucosa y oxígeno.

Aunque los resultados son insuficientes para afirmar que ZR2A y GW favorecen la inducción en el flujo autofágico en células gliales, dado que no contamos con cuantificación de proteínas que den cuenta de la unión del autofagosoma con el lisosoma, se puede afirmar que favorecen la activación de la autofagia al menos en estadios tempranos como iniciación o elongación del fagoforo. Este aumento en la autofagia basal de las células gliales y el consecuente aumento posterior a la exposición a PGO podría ofrecer protección de la célula en este escenario específico.

Para conocer los posibles mecanismos por los cuales los tratamientos modifican los niveles de LC3BII, exploramos proteínas corriente arriba de activación de vías de autofagia, encontrando que no hay cambios a nivel basal en los niveles de fosforilación de AKT y como se esperaba, los niveles de fosforilación de AKT disminuyen tras la exposición a privación de glucosa y oxígeno sin embargo, ninguno de los tratamientos es capaz de recuperar esta fosforilación de forma significativa, esto sugiere que en las células gliales pretratadas con la fracción ZR2A y el agonista GW, el principal mecanismo protector ante lesión por privación de glucosa y oxígeno no pareciera depender de activación de la vía PI3/AKT, una vía pro supervivencia, sin embargo apoya la hipótesis de activación de las vías de autofagia de forma temprana a la vez que la de-fosforilación de AKT inactiva mTOR y por consecuencia favorece la activación de la autofagia.

En neuronas sin embargo no logramos encontrar cambios significativos inducidos por los tratamientos ni en los niveles de LC3II ni en los niveles de fosforilación de AKT, lamentablemente tampoco pudimos comprobar si los tratamientos ofrecían un efecto protector dado que los ensayos de viabilidad no pudieron llevarse a cabo en neuronas, pero los resultados en las células SHSY5Y sugieren que en células de morfología neuronal podrían ofrecer protección ante la privación de glucosa y oxígeno posiblemente por activación de vías diferentes. Hacen falta estudios adicionales para caracterizar mejor esta protección.

Liu, X y colaboradores (2018) describieron cómo activar la autofagia en células gliales mejoraba la sobrevivencia de las neuronas en cocultivos sometidos a privación de glucosa y oxígeno, y a la luz de nuestros resultados, se destaca la importancia que tienen las células gliales en todos los procesos de neuroprotección y respuesta ante estrés y por lo tanto es necesario continuar investigando en esta línea.

Si trasladamos nuestros hallazgos al escenario clínico, encontramos varias oportunidades a nivel de investigación traslacional. Aunque aún existe una brecha importante entre la investigación preclínica y clínica, muchos esfuerzos se han dado para disminuirla. Un grupo de trabajo liderado por el centro nacional para el reemplazo, refinamiento y reducción de animales en investigación desarrollaron las guías IMPROVE (Modelos de isquemia: refinamientos de procedimiento de experimentos in vivo) que presenta diferentes recomendaciones procedimentales para mejorar la reproducibilidad de los experimentos y disminuir progresivamente la brecha existente con los estudios clínicos. En ese sentido, el siguiente paso lógico es probar la fracción ZR2A en un modelo in vivo de isquemia cerebral, sin embargo tendría mucho valor, además, caracterizar mejor mediante estudios de metabolómica o proteómica cómo fluctúan las vías de autofagia en pacientes que hayan sufrido ACV isquémico, algunos autores ya han descrito presencia de marcadores de autofagia (LC3B y BECLIN1) en líquido cefalorraquídeo de una muestra pequeña de pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo (Li, H, 2015).

7 Conclusiones generales y modelo propuesto

7.1 Conclusiones Generales

El modelo de privación combinada de glucosa y oxígeno usado es un método costo efectivo para el estudio de la fisiopatología de las lesiones por isquemia en cultivos celulares.

Las fracciones en estudio (ZR2A y EP06 de extractos de la planta *Zanthoxylum caribaeum*) y el agonista sintético GW3965 tienen un efecto protector ante la lesión por

privación de glucosa y oxígeno en líneas celulares SHSY5Y y UMG87 y en células gliales de cultivo primario de corteza de ratón.

Existe un comportamiento diferencial en la autofagia basal entre las neuronas y las células gliales con aparentes mayores niveles basales de autofagia en las células neuronales.

La exposición a privación de glucosa en normoxia y a privación combinada de glucosa y oxígeno cambia los niveles de expresión de LC3II y la relación LC3II/LC3I en posible relación a aumento en los niveles de Autofagia

El pretratamiento con la fracción ZR2A y con el agonista GW aumenta de forma significativa los niveles de LC3II en células gliales en condiciones basales sugiriendo que el tratamiento puede activar vías de autofagia al menos en estadios tempranos. Este aumento en la autofagia basal y el consecuente aumento posterior a la exposición a PGO podría ofrecer protección de la célula en este escenario específico.

En las células gliales pretratadas con la fracción ZR2A y el agonista GW, el principal mecanismo protector ante lesión por privación de glucosa y oxígeno no pareciera depender de activación de la vía PI3/AKT, a la vez que no hay recuperación de los niveles de fosforilación de AKT tras la exposición a PGO.

En neuronas no se evidenció efecto en la activación de vías de autofagia con el tratamiento, sin embargo, los resultados en las células SHSY5Y sugieren que en células de morfología neuronal podrían ofrecer protección ante la privación de glucosa y oxígeno posiblemente por activación de vías diferentes.

7.2 Modelo Propuesto.

Basados en los resultados obtenidos tenemos 2 escenarios diferentes en los dos modelos celulares estudiados, neuronas y glía expuestas o no a pretratamiento con agonista LXR.

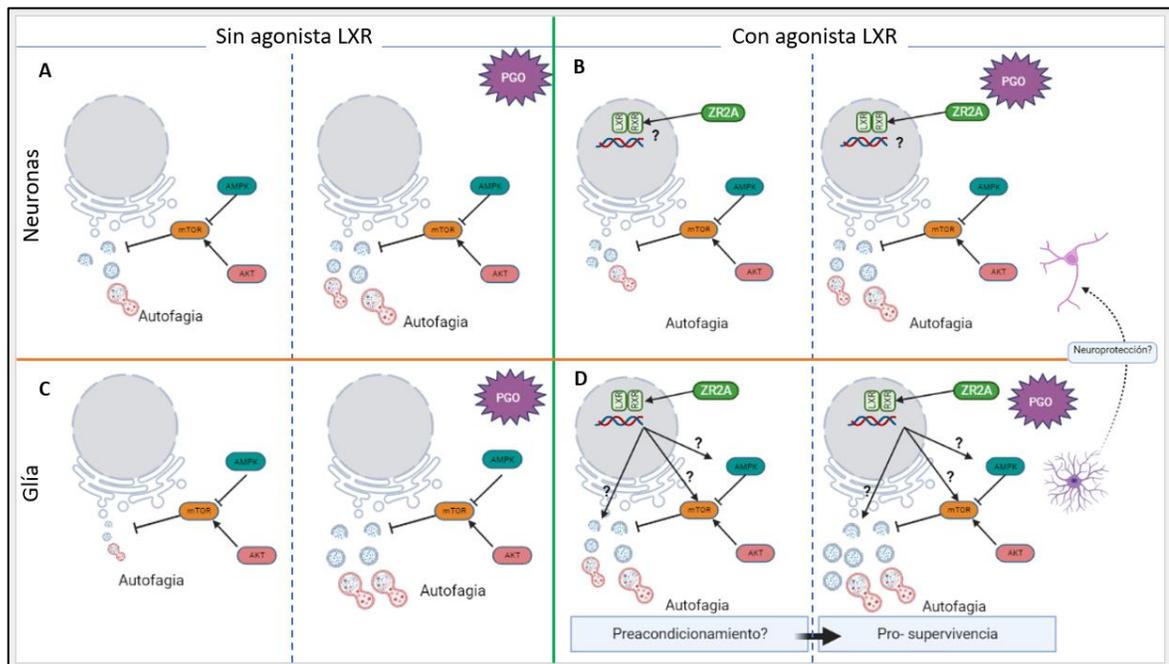


Figura 7.2.1 Modelo propuesto de mecanismo de acción de los agonistas LXR en células gliales y neuronales expuestas a PGO. A y C Activación de la autofagia en neuronas y glia respectivamente, en ausencia de pretratamiento con agonista LXR (derecha sin PGO, izquierda con PGO). B y D Activación de la autofagia en neuronas y glia respectivamente, pretratadas con agonista LXR (derecha sin PGO, izquierda con PGO)

En la figura 7.2.1 recuadro A y C se muestra la activación de la autofagia en condiciones basales (derecha) y tras la PGO (Izquierda) en Neuronas y células gliales respectivamente en ausencia del agonista LXR. Como se comprobó en los experimentos y de acuerdo con lo reportado en la literatura, la privación combinada de glucosa y oxígeno activa el proceso de autofagia en ambos tipos celulares posiblemente dependientes de la vía AMPK/mTOR.

También vimos que los niveles basales de LC3I y LC3II son casi indetectables en células gliales con un incremento sustancial tras la PGO (Fig. 5.5) y que el pretratamiento de 24 horas con el agonista LXR incrementó de forma importante los niveles de LC3I y LC3II en células que no habían sido expuestas a PGO con un aumento más significativo en la forma lipidada de la proteína (Fig. 5.6.1) sugiriendo que en este tipo celular el agonista LXR activa vías de autofagia al menos en estadios tempranos (Recuadro D, derecha).

Este aumento en la autofagia basal en células gliales se corresponde con aumento en los niveles de autofagia tras la privación de glucosa y oxígeno con respecto a las células no tratadas favoreciendo así la supervivencia celular en este escenario, por lo cual

proponemos que el pretratamiento con el agonista LXR puede servir como un precondicionamiento celular que prepara a la célula para responder mejor ante una lesión por privación combinada de glucosa y oxígeno. Estudios adicionales deberán realizarse para clarificar las vías por las cuales se activa la autofagia y la supervivencia celular.

Aunque en neuronas no hubo ningún cambio en la expresión de LC3 I y LC3II tras el pretratamiento con el agonista LXR y no se pudo comprobar su acción protectora frente a PGO en este grupo celular; teniendo en cuenta que otros autores han reportado que favorecer la supervivencia de la glía mejora la supervivencia neuronal en un escenario de isquemia aguda planteamos un efecto neuroprotector de los agonistas LXR a través del precondicionamiento de las células gliales que ante la privación combinada de glucosa y oxígeno aumenta la activación de las vías de autofagia favoreciendo la supervivencia de estas células que sirven de soporte a las neuronas ante la caída energética.

Proponemos dos diferentes mecanismos por los cuales la fracción ZR2A y el agonista LXR pueden activar las vías de autofagia en células gliales.

Basado en el cambio que ocurre en los niveles tanto de LC3I como de LC3II en condiciones basales con los pretratamientos (ZR2A y GW) podríamos suponer que uno de los lugares en los que podría actuar es facilitando la acción de la proteína ATG4 sobre LC3 (Fig. 7.2.2). ATG4 es una proteasa que actúa sobre la forma inactiva de LC3 eliminando en el extremo C terminal uno o más aminoácidos, dejándolo libre para la posterior lipidación, proceso en el que también interviene haciendo además una retroalimentación negativa favoreciendo también la delipidación de LC3II (Maruyama, T, 2017) (Agrotis, A, 2017). Agrotis y colaboradores (2017) demostraron que el silenciamiento de las dos isoforma de ATG4A/B podría bloquear por completo el flujo autofágico en ratones, demostrando el papel fundamental que cumple esta proteína.

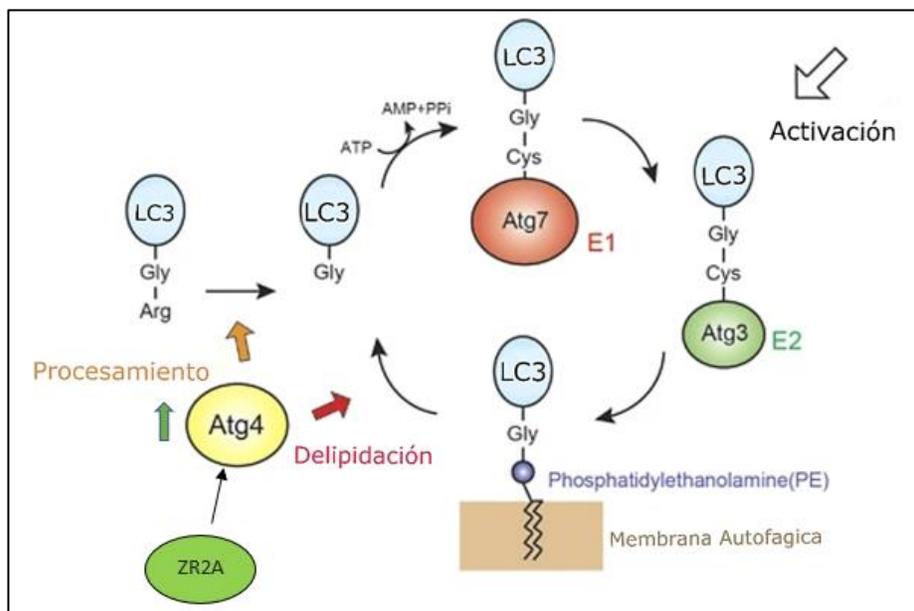


Figura 7.2.2 Sistema de Conjugación LC3. Adaptado de Maruyama, T. (2017): Se muestra la Acción de la proteína ATG4 en el sistema de conjugación de LC3. Procesamiento: Elimina de la forma inactiva de LC3 un aminoácido (Arginina) del extremo C terminal, esto permite que mediante las proteínas Atg7 Y Atg3 se active para finalmente lipidarse y unirse a la membrana del autofagosoma. Delipidación: Como una acción de retroalimentación negativa Atg4 favorece el reciclaje de LC3 mediante su Delipidación. El tratamiento con ZR2A (o con el agonista GW) podría actuar sobre Atg4 aumentando su actividad de procesamiento para favorecer la lipidación de LC3 y activar la autofagia.

Por otro lado, encontramos que los niveles de fosforilación de AKT no cambiaron con los tratamientos, por lo cual, la acción del tratamiento debería estar corriente abajo de AKT, o en una vía diferente, al ser mTOR el principal inhibidor de la autofagia, se podría suponer que uno de los puntos donde los tratamientos actúan es por inhibición de mTOR, aunque existen otros complejos proteínicos que inician los procesos de Autofagia donde también podrían actuar (Fig. 7.2.3)

Finalmente, sabemos que modular vías de autofagia es considerado como una estrategia protectora en respuesta a la isquemia, y como mencionamos previamente, algunos compuestos naturales sirven como neuroprotectores al menos en parte por modulación de las vías de autofagia, sin embargo, no se puede descartar que otros mecanismos como el efecto antioxidante y anti-apoptosis puedan contribuir en este caso.

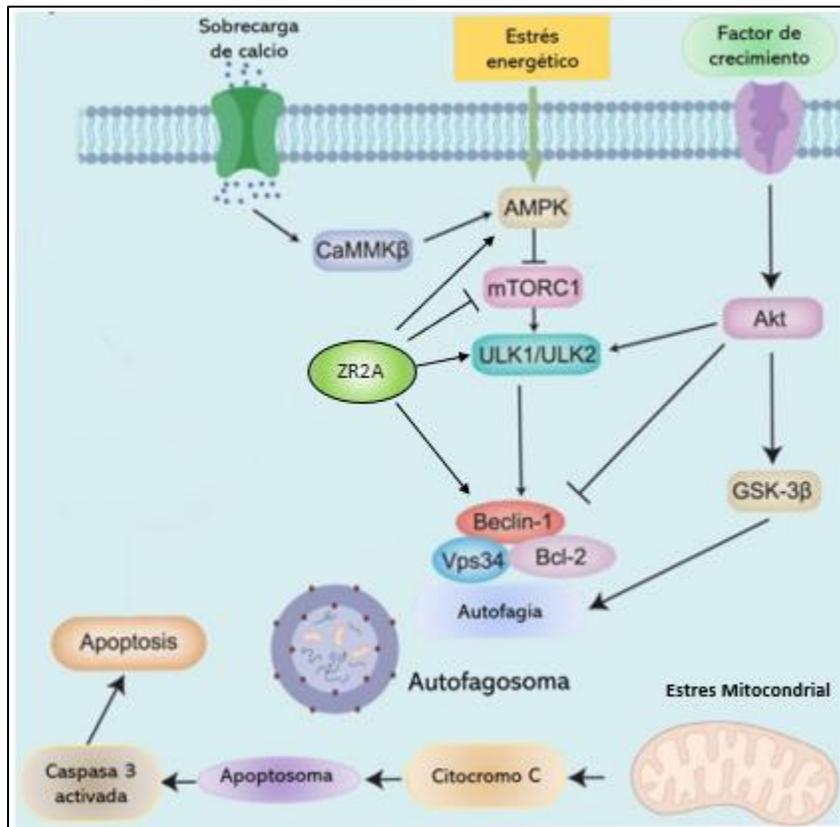


Figura 7.2.3 Activación vía clásica de autofagia en isquemia. Modificado de Qin, C. (2022). Existen diferentes mecanismos de activación de la vía de autofagia clásica en un escenario de isquemia, al no encontrar modificaciones en la activación de AKT se podría suponer que la acción del tratamiento se da corriente abajo o por una vía diferente. Se propone acción inhibiendo mTOR o activando proteínas cascada abajo como el complejo ULK1, Beclin.1 Vps34, o cascada arriba activando AMPK.

8 Bibliografía

Agrotis, A., Pengo, N., Burden, J. J., & Ketteler, R. (2019). Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells. *Autophagy*, 15(6), 976–997. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569925>

Ahsan, A., Liu, M., Zheng, Y., Yan, W., Pan, L., Li, Y., Ma, S., Zhang, X., Cao, M., Wu, Z., Hu, W., Chen, Z., & Zhang, X. (2021). Natural compounds modulate the autophagy with potential implication of stroke. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 11(7), 1708–1720. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.10.018>

Amado, B., Melo, L., Pinto, R., Lobo, A., Barros, P., & Gomes, J. R. (2022). Ischemic Stroke, Lessons from the Past towards Effective Preclinical Models. *Biomedicines*, 10(10), 2561. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102561>

Avezum, Á., Costa-Filho, F. F., Pieri, A., Martins, S. O., & Marin-Neto, J. A. (2015). Stroke in Latin America: Burden of Disease and Opportunities for Prevention. *Global heart*, 10(4), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2014.01.006>

Balduini, W., Carloni, S., & Buonocore, G. (2012). Autophagy in hypoxia-ischemia induced brain injury. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 25 Suppl 1, 30–34. <https://doi.org/10.3109/14767058.2012.663176>

Beaudoin, G. M., 3rd, Lee, S. H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y. G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature protocols*, 7(9), 1741–1754. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.099>

Bento, C. F., Renna, M., Ghislat, G., Puri, C., Ashkenazi, A., Vicinanza, M., ... Rubinsztein, D. C. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work? *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 685–713. doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014556

Broughton, B. R., Reutens, D. C., & Sobey, C. G. (2009). Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*, 40(5), e331–e339. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531632>

Buckley, K. M., Hess, D. L., Sazonova, I. Y., Periyasamy-Thandavan, S., Barrett, J. R., Kirks, R., Grace, H., Kondrikova, G., Johnson, M. H., Hess, D. C., Schoenlein, P. V., Hoda, M. N., & Hill, W. D. (2014). Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAL, and embolic MCAO, murine

models of stroke. *Experimental & translational stroke medicine*, 6, 8. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-6-8>

Casals, J. B., Pieri, N. C., Feitosa, M. L., Ercolin, A. C., Roballo, K. C., Barreto, R. S., Bressan, F. F., Martins, D. S., Miglino, M. A., & Ambrósio, C. E. (2011). The use of animal models for stroke research: a review. *Comparative medicine*, 61(4), 305–313.

Carlioni, S., Buonocore, G., & Balduini, W. (2008). Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiology of disease*, 32(3), 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.07.022>

Chapuisat, G., Dronne, M. A., Grenier, E., Hommel, M., & Boissel, J. P. (2010). In silico study of the influence of intensity and duration of blood flow reduction on cell death through necrosis or apoptosis during acute ischemic stroke. *Acta biotheoretica*, 58(2-3), 171–190. <https://doi.org/10.1007/s10441-010-9100-2>

Chen, J., Zacharek, A., Cui, X., Shehadah, A., Jiang, H., Roberts, C., Lu, M., & Chopp, M. (2010). Treatment of stroke with a synthetic liver X receptor agonist, TO901317, promotes synaptic plasticity and axonal regeneration in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(1), 102–109. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.187>

Chen, W., Sun, Y., Liu, K., & Sun, X. (2014). Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regeneration Research*, 9(12), 1210–1216. <http://doi.org/10.4103/1673-5374.135329>

Cheng, O., Ostrowski, R. P., Liu, W., & Zhang, J. H. (2010). Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor-kappaB. *Neuroscience*, 166(4), 1101–1109. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.024>

Chu C. T. (2006). Autophagic stress in neuronal injury and disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65(5), 423–432. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000229233.75253.be>

Cui, X., Chopp, M., Zacharek, A., Cui, Y., Roberts, C., & Chen, J. (2013). The neurorestorative benefit of GW3965 treatment of stroke in mice. *Stroke*, 44(1), 153–161. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.677682>

Deng, Y. H., He, H. Y., Yang, L. Q., & Zhang, P. Y. (2016). Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *Neural regeneration research*, 11(7), 1108–1114. doi:10.4103/1673-5374.187045

Dikic I, Elazar Z (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 349–364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

Ding, C., Zhang, J., Li, B., Ding, Z., Cheng, W., Gao, F., Zhang, Y., Xu, Y., & Zhang, S. (2018). Cornin protects SH-SY5Y cells against oxygen and glucose deprivation-induced autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Molecular medicine reports*, 17(1), 87–92. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7864>

Du, Y., Deng, W., Wang, Z., Ning, M., Zhang, W., Zhou, Y., Lo, E. H., & Xing, C. (2017). Differential subnetwork of chemokines/cytokines in human, mouse, and rat brain cells after oxygen-glucose deprivation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(4), 1425–1434. <https://doi.org/10.1177/0271678X16656199>

Duque, A. A., & Lucumi, D. I. (2019). *Caracterización del accidente cerebrovascular en colombia* (N.o 63). Escuela de Gobierno Alberto Lleras Camargo, Universidad de los Andes.
<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/40736/Caracterizaci%C3%B3n-accidente.pdf?sequence=1>

Faysel, M. A., Singer, J., Cummings, C., Stefanov, D. G., & Levine, S. R. (2019). Disparities in the Use of Intravenous t-PA among Ischemic Stroke Patients: Population-based Recent Temporal Trends. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 28(5), 1243–1251. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2019.01.013>

Friedman, L. G., Lachenmayer, M. L., Wang, J., He, L., Poulouse, S. M., Komatsu, M., Holstein, G. R., & Yue, Z. (2012). Disrupted autophagy leads to dopaminergic axon and dendrite degeneration and promotes presynaptic accumulation of α -synuclein and LRRK2 in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(22), 7585–7593. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5809-11.2012>

Gandolfi, M., Smania, N., Vella, A., Picelli, A., & Chirumbolo, S. (2017). Assessed and Emerging Biomarkers in Stroke and Training-Mediated Stroke Recovery: State of the Art. *Neural Plasticity*, 2017, 1389475. <http://doi.org/10.1155/2017/1389475>

Gao, L., Jiang, T., Guo, J., Liu, Y., Cui, G., Gu, L., Zhang, Y. (2012). Inhibition of Autophagy Contributes to Ischemic Postconditioning-Induced Neuroprotection against Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PLoS ONE*, 7(9), e46092. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046092>

Giordano, G., & Costa, L. G. (2011). Primary neurons in culture and neuronal cell lines for in vitro neurotoxicological studies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 758, 13–27. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-170-3_2

Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3–12. doi:10.1002/path.2697

Gómez-Sánchez, R., Pizarro-Estrella, E., Yakhine-Diop, S. M., Rodríguez-Arribas, M., Bravo-San Pedro, J. M., Fuentes, J. M., & González-Polo, R. A. (2015). Routine Western blot to check autophagic flux: cautions and recommendations. *Analytical biochemistry*, 477, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.020>

Guzik, A., & Bushnell, C. (2017). *Stroke Epidemiology and Risk Factor Management. Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 23(1, Cerebrovascular Disease), 15–39.

Ha, J., Guan, K. L., & Kim, J. (2015). AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism. *Molecular aspects of medicine*, 46, 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2015.08.002>

Haque, M. N., Hannan, M. A., Dash, R., Choi, S. M., & Moon, I. S. (2021). The potential LXR β agonist stigmasterol protects against hypoxia/reoxygenation injury by modulating mitophagy in primary hippocampal neurons. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 81, 153415. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153415>

Haque, M. N., Hannan, M. A., Dash, R., Choi, S. M., & Moon, I. S. (2021). The potential LXR β agonist stigmasterol protects against hypoxia/reoxygenation injury by modulating mitophagy in primary hippocampal neurons. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 81, 153415. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153415>

Harnett, M. M., Pineda, M. A., Latré de Laté, P., Eason, R. J., Besteiro, S., Harnett, W., & Langsley, G. (2017). From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomedical journal*, 40(1), 9–22. doi:10.1016/j.bj.2016.12.004.

Holloway, P. M., & Gavins, F. N. (2016). Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke*, 47(2), 561–569. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.011932>

Hu, S., Wu, G., Ding, X., & Zhang, Y. (2016). Thrombin preferentially induces autophagy in glia cells in the rat central nervous system. *Neuroscience letters*, 630, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.023>

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., & Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6), 1256–1269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>

Jia, Z., Dong, A., Che, H., & Zhang, Y. (2017). 17-DMAG Protects Against Hypoxia-/Reoxygenation-Induced Cell Injury in HT22 Cells Through Akt/Nrf2/HO-1 Pathway. *DNA and cell biology*, 36(2), 95–102. <https://doi.org/10.1089/dna.2016.3445>

<https://doi.org/10.1089/dna.2016.3445>

Juntunen, M., Hagman, S., Moisan, A., Narkilahti, S., & Miettinen, S. (2020). In Vitro Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Stroke Models with Human Neuroblastoma Cell- and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons. *Stem cells international*, 2020, 8841026. <https://doi.org/10.1155/2020/8841026>

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, et al. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720–5728

Kasprowska, D., Machnik, G., Kost, A., & Gabryel, B. (2017). Time-Dependent Changes in Apoptosis Upon Autophagy Inhibition in Astrocytes Exposed to Oxygen and Glucose Deprivation. *Cellular and molecular neurobiology*, 37(2), 223–234. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0363-2>

Kaushik, S., Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(6), 365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>

Kikuchi, K., Uchikado, H., Morioka, M., Murai, Y., & Tanaka, E. (2012). Clinical neuroprotective drugs for treatment and prevention of stroke. *International journal of molecular sciences*, 13(6), 7739–7761. doi:10.3390/ijms13067739

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., Agostinis, P., ... 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>

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., & Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 169(3), 425–434. <https://doi.org/10.1083/jcb.200412022>

Koukourakis, M. I., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Zois, C. E., Sivridis, E., Pouliliou, S., Mitrakas, A., Gatter, K. C., & Harris, A. L. (2015). Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. *PloS one*, 10(9), e0137675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137675>

Kuma, A., Komatsu, M., & Mizushima, N. (2017). Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, 13(10), 1619–1628. doi:10.1080/15548627.2017.1343770

Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., & Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of translational medicine*, 7, 97. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-97>

Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circulation research*, 96(12), 1221–1232. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000170946.56981.5c>

Li, H., Qiu, S., Li, X., Li, M., & Peng, Y. (2015). Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *Journal of Translational Medicine*, 13, 359. <http://doi.org/10.1186/s12967-015-0726-3>

Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, et al. (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402: 672–676

Li, H., Qiu, S., Li, X., Li, M., & Peng, Y. (2015). Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *Journal of translational medicine*, 13, 359. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0726-3>

Liu, P., He, S., Gao, J., Li, J., Fan, X., & Xiao, Y.-B. (2014). Liver X receptor activation protects against inflammation and enhances autophagy in myocardium of neonatal mouse challenged by lipopolysaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(9), 1504–1513.

Liu, X., Tian, F., Wang, S., Wang, F., & Xiong, L. (2018). Astrocyte Autophagy Flux Protects Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation and Ischemic/Reperfusion Injury. *Rejuvenation research*, 21(5), 405–415. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1999>

Long, H. Z., Cheng, Y., Zhou, Z. W., Luo, H. Y., Wen, D. D., & Gao, L. C. (2021). PI3K/AKT Signal Pathway: A Target of Natural Products in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Frontiers in pharmacology*, 12, 648636. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.648636>

Lyden P. D. (2021). Cerebroprotection for Acute Ischemic Stroke: Looking Ahead. *Stroke*, 52(9), 3033–3044. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.032241>

Marchus, C. R. N., Knudson, J. A., Morrison, A. E., Strawn, I. K., Hartman, A. J., Shrestha, D., Pancheri, N. M., Glasgow, I., & Schiele, N. R. (2021). Low-cost, open-source cell culture chamber for regulating physiologic oxygen levels. *HardwareX*, 11, e00253. <https://doi.org/10.1016/j.ohx.2021.e00253>

Maruyama, T., & Noda, N. N. (2017). Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of antibiotics*, 71(1), 72–78. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.104>

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell* 15:1101–11

Mulder, I. A., van Bavel, E. T., de Vries, H. E., & Coutinho, J. M. (2021). Adjunctive cytoprotective therapies in acute ischemic stroke: a systematic review. *Fluids and barriers of the CNS*, 18(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12987-021-00280-1>

Nguyen, T. N., Padman, B. S., Usher, J., Oorschot, V., Ramm, G., & Lazarou, M. (2016). Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *The Journal of Cell Biology*, 215(6), 857–874. <http://doi.org/10.1083/jcb.201607039>

Oliva Trejo, J. A., Tanida, I., Suzuki, C., Kakuta, S., Tada, N., & Uchiyama, Y. (2020). Characterization of starvation-induced autophagy in cerebellar Purkinje cells of pHluorin-mKate2-human LC3B transgenic mice. *Scientific reports*, 10(1), 9643. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66370-6>

Pipicano Ordoñez, P. A. (2016). Evaluación del preconditionamiento hipóxico como un mecanismo protector en cultivos primarios neuronales de rata wistar. Universidad ICESI.

Prasad, A., Kumar, S. S., Dessimoz, C., Bleuler, S., Laule, O., Hruz, T., Grussem, W., & Zimmermann, P. (2013). Global regulatory architecture of human, mouse and rat tissue transcriptomes. *BMC genomics*, 14, 716. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-716>

Qin, A. P., Liu, C. F., Qin, Y. Y., Hong, L. Z., Xu, M., Yang, L., Liu, J., Qin, Z. H., & Zhang, H. L. (2010). Autophagy was activated in injured astrocytes and mildly decreased cell survival following glucose and oxygen deprivation and focal cerebral ischemia. *Autophagy*, 6(6), 738–753. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12573>

Qin, C., Yang, S., Chu, Y. H., Zhang, H., Pang, X. W., Chen, L., Zhou, L. Q., Chen, M., Tian, D. S., & Wang, W. (2022). Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal transduction and targeted therapy*, 7(1), 215. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01064-1>

Rami A. (2008). Upregulation of Beclin 1 in the ischemic penumbra. *Autophagy*, 4(2), 227–229. <https://doi.org/10.4161/auto.5339>

Ravanan, P., Srikumar, I. F., & Talwar, P. (2017). Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sciences*, 188, 53–67. doi:10.1016/j.lfs.2017.08.029.

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., Criqui, M., ... GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>

Ryou M, Mallet R (2018) An in vitro Oxygen-Glucose deprivation model for studying ischemia - Reperfusion Injury of neuronal cells chapter 18 at Binu Tharakan (ed.), Traumatic and Ischemic Injury: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1717, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7526-6_18, © Springer Science+Business Media, LLC

Saha, S., Panigrahi, D. P., Patil, S., & Bhutia, S. K. (2018). *Autophagy in health and disease: A comprehensive review. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 485–495. doi:10.1016/j.biopha.2018.05.007

Saxena, S, Agrawal, I, Singh, P, Jha, S. Portable, low-cost hypoxia chamber for simulating hypoxic environments: Development, characterization and applications. *Med Devices Sens.* 2020; 3:e10064. <https://doi.org/10.1002/mds3.10064>

Segala, G., David, M., de Medina, P., Poirot, M. C., Serhan, N., Vergez, F., ... Silvente-Poirot, S. (2017). Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers. *Nature communications*, 8(1), 1903. doi:10.1038/s41467-017-01948-9

Sekerdag, E., Solaroglu, I., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2018). Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Current neuropharmacology*, 16(9), 1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180302115544>

Sironi, L., Mitro, N., Cimino, M., Gelosa, P., Guerrini, U., Tremoli, E., & Saez, E. (2008). Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage. *FEBS letters*, 582(23-24), 3396–3400. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.035>

Smith, B. A., & Smith, B. D. (2012). Biomarkers and molecular probes for cell death imaging and targeted therapeutics. *Bioconjugate chemistry*, 23(10), 1989–2006. doi:10.1021/bc3003309

Smith, C. M., Chen, Y., Sullivan, M. L., Kochanek, P. M., & Clark, R. S. B. (2011). Autophagy in Acute Brain Injury: Feast, Famine, or Folly? *Neurobiology of Disease*, 43(1), 52–59. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.014>.

Sommer C. J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta neuropathologica*, 133(2), 245–261. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1667-0>

Sun, T., Li, Y. J., Tian, Q. Q., Wu, Q., Feng, D., Xue, Z., Guo, Y. Y., Yang, L., Zhang, K., Zhao, M. G., & Wu, Y. M. (2018). Activation of liver X receptor β -enhancing neurogenesis ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Experimental neurology*, *304*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.02.006>

Suzuki, H., Osawa, T., Fujioka, Y., Noda, N. (2017) Structural biology of the core autophagy machinery *Curr. Opin. Struct. Biol.*, *43*, pp. 10-17

Tasca, C. I., Dal-Cim, T., & Cimarosti, H. (2015). In vitro oxygen-glucose deprivation to study ischemic cell death. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), *1254*, 197–210. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2152-2_15

Tian, F., Deguchi, K., Yamashita, T., Ohta, Y., Morimoto, N., Shang, J., Zhang, X., Liu, N., Ikeda, Y., Matsuura, T., & Abe, K. (2010). In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model. *Autophagy*, *6*(8), 1107–1114. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13427>

Thrift, A. G., Howard, G., Cadilhac, D. A., Howard, V. J., Rothwell, P. M., Thayabaranathan, T., Feigin, V. L., Norrving, B., & Donnan, G. A. (2017). Global stroke statistics: An update of mortality data from countries using a broad code of "cerebrovascular diseases". *International journal of stroke: official journal of the International Stroke Society*, *12*(8), 796–801.

Tuo, Q. Z., Zhang, S. T., & Lei, P. (2022). Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Medicinal research reviews*, *42*(1), 259–305. <https://doi.org/10.1002/med.21817>

Wang, H. X., Zhang, K., Zhao, L., Tang, J. W., Gao, L. Y., & Wei, Z. P. (2015). Association of liver X receptor α (LXR α) gene polymorphism and ischemic stroke. *Genetics and molecular research : GMR*, *14*(1), 118–122. <https://doi.org/10.4238/2015.January.15.14>

Wang, R., Jin, F., & Zhong, H. (2014). A novel experimental hypoxia chamber for cell culture. *American journal of cancer research*, *4*(1), 53–60.

Wang, Y., & Zhang, H. (2019). Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. *Advances in experimental medicine and biology*, *1206*, 67–83. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_3

Wen, Y. D., Sheng, R., Zhang, L. S., Han, R., Zhang, X., Zhang, X. D., Han, F., Fukunaga, K., & Qin, Z. H. (2008). Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*, *4*(6), 762–769. <https://doi.org/10.4161/auto.6412>

Wong, P. M., Feng, Y., Wang, J., Shi, R., & Jiang, X. (2015). Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nature communications*, 6, 8048. <https://doi.org/10.1038/ncomms9048>

Wright WE, Shay JW. Inexpensive low-oxygen incubators. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2088-90. doi: 10.1038/nprot.2006.374. PMID: 17487199.

Wu, C. H., Chen, C. C., Lai, C. Y., Hung, T. H., Lin, C. C., Chao, M., & Chen, S. F. (2016). Treatment with TO901317, a synthetic liver X receptor agonist, reduces brain damage and attenuates neuroinflammation in experimental intracerebral hemorrhage. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0524-8>

Wu, Y., Fan, L., Wang, Y., Ding, J., & Wang, R. (2021). Isorhamnetin Alleviates High Glucose-Aggravated Inflammatory Response and Apoptosis in Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation-Induced HT22 Hippocampal Neurons Through Akt/SIRT1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway. *Inflammation*, 44(5), 1993–2005. <https://doi.org/10.1007/s10753-021-01476-1>

Xian, M., , Cai, J., , Zheng, K., , Liu, Q., , Liu, Y., , Lin, H., , Liang, S., , & Wang, S., (2021). Aloe-emodin prevents nerve injury and neuroinflammation caused by ischemic stroke via the PI3K/AKT/mTOR and NF- κ B pathway. *Food & function*, 12(17), 8056–8067. <https://doi.org/10.1039/d1fo01144h>

Xiong X, Liang L, Yang Q. (2016), Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Progress in Neurobiology* Volume 142, Pages 23-44. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.05.001>

Xiong, Y., Manwani, B., & Fisher, M. (2019). Management of Acute Ischemic Stroke. *The American journal of medicine*, 132(3), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.10.019>

Xu, M., & Zhang, H. L. (2011). Death and survival of neuronal and astrocytic cells in ischemic brain injury: a role of autophagy. *Acta pharmacologica Sinica*, 32(9), 1089–1099. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.50>

Xu, S., Lu, J., Shao, A., Zhang, J. H., & Zhang, J. (2020). Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke. *Frontiers in immunology*, 11, 294. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00294>

Yamamoto, A., & Yue, Z. (2014). Autophagy and its normal and pathogenic states in the brain. *Annual review of neuroscience*, 37, 55–78. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014149>

Yan X, Zhou R, Ma Z. Autophagy-Cell Survival and Death. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1206:667-696. doi: 10.1007/978-981-15-0602-4_29. PMID: 31777006.

Yanez, N., Useche, J. N., Bayona, H., Porras, A., & Carrasquilla, G. (2020). Analyses of Mortality and Prevalence of Cerebrovascular Disease in Colombia, South America (2014-2016): A Cross-Sectional and Ecological Study. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*, 29(5), 104699. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.104699>

Yoshii, S. R., & Mizushima, N. (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1865. <http://doi.org/10.3390/ijms18091865>

Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2), 207–215. doi:10.1080/15548627.2017.1378838

Zelcer, N., & Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), 607–614. <https://doi.org/10.1172/JCI27883>

Zeng, Z., Zhang, Y., Jiang, W., He, L., & Qu, H. (2020). Modulation of autophagy in traumatic brain injury. *Journal of cellular physiology*, 235(3), 1973–1985. <https://doi.org/10.1002/jcp.29173>

Zhang, Z., Yao, L., Yang, J., Wang, Z., & Du, G. (2018). PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (Review). *Molecular medicine reports*, 18(4), 3547–3554. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9375>

Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK (2006) Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1114–1121

Zhao, H., Yang, Y., Si, X., Liu, H., & Wang, H. (2022). The Role of Pyroptosis and Autophagy in Ischemia Reperfusion Injury. *Biomolecules*, 12(7), 1010. <https://doi.org/10.3390/biom12071010>

Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Bahr, B. A., Shibata, M., Uchiyama, Y., Hagberg, H., & Blomgren, K. (2005). The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell death and differentiation*, 12(2), 162–176. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401545>

Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *The Yale journal of biology and medicine*, 80(2), 51–60.

A. Anexo: El protocolo de privación de glucosa y oxígeno

El protocolo de privación de glucosa y oxígeno se adaptó de Tasca y colaboradores (2015)

Materiales:

Cámara de hipoxia

Cabina de flujo laminar

Mezcla de gases (95% Nitrógeno 5% CO₂)

Cajas de siembra

Células de cultivo primario y líneas celulares a evaluar

Medios de cultivo

Medios de crecimiento de acuerdo con la línea celular

Medio para privación de glucosa: HBSS + Penicilina 1%

PBS

Descripción del procedimiento.

1. Limpiar la cámara de hipoxia con etanol al 75% y dejarla bajo luz UV por al menos 30 min
2. Burbujear el medio de privación de glucosa con la mezcla de gases por 5 min
3. Retirar el medio de cultivo de crecimiento y hacer 3 lavados con PBS
4. Poner el medio de privación previamente burbujeado a las células de experimentación.

5. Introducir las células dentro de la cámara de hipoxia y dejar fluir la mezcla de gases, a través de la cámara de hipoxia por 5 min para equilibrar el medio de cultivo.
6. Incubar las células de estudio en la cámara de hipoxia por el tiempo establecido.
7. Retirar las células de la cámara de hipoxia
8. Continuar con ensayos de viabilidad celular.

B. Anexo: Protocolo de siembra y crecimiento de células

Protocolo cultivo de Neuronas y células gliales de corteza de Raton C57BL/6

Objetivo del Procedimiento: Aislamiento de células de diferentes áreas cerebrales del ratón para estudio de la fisiología y señalización celular ante diferentes estímulos

Materiales a Usar:

1. Elementos de bioseguridad (Tapabocas, guantes, gorro)
2. Contenedor de objetos punzantes o guardián.
3. Bolsa para desechos biológicos (roja)
4. Cajas de petri 60 mm x 4
5. Cabina de flujo laminar
6. Tijeras finas
7. Pinzas de punta fina
8. Hielo
9. Medio de disección (HBSS 10X, HEPES 0.3 M, Penicilina/Streptomycin 1%, H₂O
10. estéril)

Descripción del procedimiento

Adaptado por Tatiana Baez de Beaudoin et al, 2012

Los cultivos primarios a partir de crías E18

A. Eutanasia de Ratones

- a. Preparar 3 platos de cultivo de 60 mm con 5 mL de medio de disección (Tres cerebros por plato) El medio de disección debe ponerse en baño de maría a 37° C, 30 min antes de empezar
- b. Someter los animales a eutanasia: Colocar los neonatos en caja de petri sobre hielo durante 5 minutos

B. Disección del cerebro. En cabina de flujo laminar de flujo horizontal

- a. Decapitar los neonatos con tijeras finas y estériles puestas en etanol
- b. Remover la cabeza y ponerla en placas de petri con medio de disección

- c. Tomar cada cabeza y hacer una incisión en la línea media de la superficie de la piel cerca de la región posterior del cerebro y extenderla hasta la región dorsal, con tijeras finas hacer una pequeña incisión en la base del cráneo y extender a lo largo de la línea media
- d. Tomar el cerebro desde la base con las pinzas y separar el tejido cerebral pasándolo a un plato de cultivo de 60 mm con medio de disección

C. Disociación Celular y siembra

El tejido se disocia mediante tratamiento con Tripsina a 37°C durante 20 minutos, pasado este tiempo se remueve completamente la tripsina y se lava dos veces con medio de disección, tras lo cual se bloquea la tripsina con medio neurobasal suplementado con Suero fetal bovino al 10%, este se deja actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se repite procedimiento una vez más. Se realiza disociación mecánica mediante pipeteo y posteriormente se pasa el medio con células disociadas a través de un *cell strainer*. Se realiza el conteo celular y se siembran en cajas de 24 pozos previamente tratadas con poli Lysina a una densidad de 50.000 células por pozo. Las neuronas se siembran con medio neurobasal suplementado con B27 al 2%, glutamato al 1.5% y penicilina al 1%, a los 3 DIV se hace cambio de medio a uno sin glutamato y se adiciona arabinósido de citosina a una concentración final de 0.5 uM para inhibir el crecimiento de glía en estos pozos. Dos veces por semana se hace el cambio del 50% del medio de mantenimiento.

Las células gliales se siembran con medio DMEM suplementado con glutamax al 1.5% y penicilina al 1% y se hace cambio del 50% del medio cada 4 a 7 días.

Protocolo de siembra, crecimiento y diferenciación Línea Celular SHSY5Y

El cultivo de las células SHSY5Y se realizó en DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB, 1% de glutamax y 1% de P/S. La diferenciación se indujo sustituyendo el medio de cultivo por DMEM-F12, con 5% de SFB, 1% de glutamax, 5 µM de ácido retinoico y 1% P/S durante 5 días. El medio se cambiaba día de por medio. Las células se mantuvieron en una confluencia entre el 70 y 80%.

Protocolo de siembra, crecimiento Línea Celular UMG87

El cultivo de las células SHSY5Y se realizó en DMEM suplementado con 10% de SFB, y 1% de P/S. El medio se cambiaba día de por medio. Las células se mantuvieron en una confluencia entre el 70 y 80%

C. Anexo: Protocolo western blot específico para detección LC3

Una vez realizados los tratamientos, se retiró el medió y se inició el proceso de extracción de proteínas con 100 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; ditioneitol 100 mM; inhibidores de proteasas y fosfatasa; y azul de bromofenol) para 3 pozos de cajas de 12. El procesamiento de las muestras se hizo en frío todo el tiempo.

Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos 2 veces y sonicadas durante 5 minutos

Para el análisis de expresión de proteínas, una fracción de 30µg de proteína de cada muestra se separarán en un gel de SDS-PAGE al 15 % bajo condiciones reductoras: las muestras se disuelven en buffer Laemmli y se desnaturalizan a 95°C durante 10 min. Este proceso se hizo el mismo día de la extracción para evitar degradación de la proteína

La electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) se llevó a cabo en cámara de electroforesis con buffer de corrido (buffer Towin 1x) a 50 mV durante los primeros 45 min y a 100 mV por 90 min adicionales. Luego del corrido, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con poro de 0,22 µm, 0,22 µm (BioRad) y se realizó transferencia semihúmeda con protocolo para proteínas de bajo peso molecular (Trans-Blot Turbo transfer system, Biorad)

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó en buffer de bloqueo (5 % leche en buffer TTBS (0.1 % Tween + Tris-buffered saline (TBS))) por 1 h. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpos primarios diluidos en buffer de bloqueo, durante la noche a 4°C.

Al siguiente día, la membrana se lavó con TTBS 3 veces por 5 min y se incubó con los anticuerpos secundarios diluidos en buffer de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente.

Luego, la membrana se lava con TTBS 3 veces por 5 min y se detectará la presencia de las proteínas por quimioluminiscencia.

D. Anexo: Anticuerpos usados

Tabla 2: Listado de Anticuerpos Usados

Anticuerpos primarios	Animal de obtención	Fabricante	Referencia
LC3B	<i>Rabitt</i>	<i>Abcam</i>	ab51520
Phospho-Akt (Ser473) Antibody #9271	<i>Rabitt</i>	<i>Cell Signaling Techonology</i>	#9271
AKT (pan)	<i>Rabitt</i>	<i>Cell Signaling Techonology</i>	#4685
HIF-1 α (D1S7W)	<i>Rabitt</i>	<i>Techonology</i>	#36169
Anticuerpos Secundarios	Animal que reconoce	Fabricante	Referencia
<i>Anti Rabbit</i>	<i>Rabbit</i>	<i>Cell Signaling Technology</i>	7074S