Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Estudio de los mecanismos moleculares regulados por la yerba mate en neuronas dopaminérgicas en cultivo.

Tesista: Hernán E. Hauché P.

Título a obtener: Lic. en Ciencias Biológicas.

Director de tesis: Dr. Juan E. Ferrario

Directora asistente: Dra. Melina P. Bordone

Lugar de trabajo: Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3, FCEyN, UBA).

Marzo de 2020

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Ferrario por su dirección y tutela. Por sus enseñanzas en este campo complejo y vasto que es el de la investigación en Parkinson. Por sus consejos y su paciencia. Por sus clases magistrales en cultivo primario, y por los mates de ciencia.

A la Dra. Melina Bordone, por sus enseñanzas, su técnica y su atención al detalle. Por su profesionalismo y su dedicación. Por su compañía en cada protocolo, paso a paso, compartiendo los éxitos y los fracasos. Por sus "*Meli tips*" salvadores de Western's.

A la Lic. Soledad Anesetti, a Tomas Eidelman, y a todo el equipo del Laboratorio de Neurobiología del Parkinson, por compartir codo a codo este desafío y aprendizaje. Por compartir las alegrías por los resultados y las frustraciones cuando se arruinó un buffer, se transfirió mal una membrana o simplemente se contaminaron los cultivos. Gracias por su ayuda y su buena onda, por los mates y los consejos.

Al grupo de la Dra. Elena Avale, y la Lic. Ana Damianich, por sus enseñanzas en cultivo y por compartir su *expertise* en el manejo de la línea que compete a esta tesis.

Al iB3 y a todos sus investigadores y estudiantes. Gracias por la calidez y por sus consejos.

A mis Viejos, por su apoyo incondicional a lo largo de estos años. Por acompañarme desde el primer día y haber estado siempre ahí. Por entender los silencios, los malhumores y las rabietas de la cursada. Por apostar a que sus hijos estudien y persigan sus sueños, a pesar del viento en contra. Gracias por tanto esfuerzo, son un ejemplo para mí.

A mis hermanas por su paciencia y por compartir el estrés de la cursada. A Toto por esas madrugadas de estudio, compartiendo algún que otro mate. A Lula, mi *roomate*, por esperarme con esas cenas gourmet y esas tardes en la biblioteca.

A mi abuela, que, aunque nunca llegue a leer estas palabras sé que estará orgullosa. Y a mi abuelo, mi octogenario favorito, que tuvo la paciencia de aguantarme estos años en su casa.

A Milagros porque si no hubiera sido por ella, quizás nunca me hubiese animado a vivir esta aventura que es la ciencia, a tomar coraje y cambiar el rumbo hacia donde siempre quise ir. Por su apoyo y por acompañarme a cada paso en este desafío. Sos una fuente de inspiración para mí.

A los amigos de siempre, por saber entender los "*hoy no puedo, tengo que estudiar*", "*la semana que viene tengo parcial*" y demás. Siempre estuvieron ahí, cuando la cursada afloja y hay ganas de hacer algún que otro asadito.

A toda esa gente hermosa que conocí en exactas, con la que compartí tantos mates y tantas horas de estudio en mi amada *ermita de la sabiduría silenciosa*. Hicieron de estos años de cursada algo maravilloso, gracias.

A la universidad pública, gratuita y no arancelada, una de las cosas más hermosas que tiene nuestro país.

RESUMEN

Estudio de los mecanismos moleculares regulados por la yerba mate en neuronas dopaminérgicas en cultivo.

La presente Tesis de Licenciatura se desarrolló con el objetivo general de explorar los mecanismos celulares regulados por la exposición a un extracto de yerba mate (YM). En particular, planteamos la hipótesis de que la YM, o ácido clorogénico (CGA), regulan mecanismos intracelulares relacionados con la supervivencia y el crecimiento de las neuronas dopaminérgicas. Para comenzar a demostrar esta hipótesis, propusimos en una primera instancia evaluarlo *in vitro*, en cultivos de la línea celular SH-SY5Y a los que se trató con un extracto de yerba mate. Este modelo, si bien es más reduccionista aún, permite explorar de manera rápida y confiable la regulación de vías de señalización.

Como punto de partida, evaluamos la regulación (niveles de fosforilación) de AMPK, una molécula clave en el metabolismo energético, muy conservada y fuertemente relacionada con neuroprotección. Se desarrollaron experimentos para estudiar el efecto de la concentración y el tiempo de exposición de la YM sobre los niveles de fosforilación de AMPK. Además, se evaluó el efecto del CGA en concentraciones similares a las del extracto. Se observó que la YM produce un aumento en los niveles de fosforilación de AMPK (pAMPK/β-actina) cuando se emplea en una relación de entre 1 y 0,1 µl de extracto por cada 500 µl de medio de cultivo, durante 30min. No fue posible emular dichos resultados con CGA *per se*. A su vez, se inició la exploración de otras moléculas regulatorias incluyendo un marcador indirecto de mTOR (p-p70S6Kα), EGR-1 y ERK.

Por otra parte, se comenzó a trabajar en la evaluación del efecto del extracto de YM en un cultivo primario dopaminérgico, realizado a partir de mesencéfalos de embriones de ratón a día 13,5 de desarrollo. Se logró desarrollar con éxito el cultivo dopaminérgico, aunque no se logró avanzar en las pruebas experimentales dentro del tiempo de esta Tesis.

Con los resultados obtenidos se concluye que el modelo de línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y responde al tratamiento con YM, regulando una serie de moléculas relacionadas con el metabolismo celular. Entre ellas, destacamos fuertemente la regulación de AMPK, la cual fue replicada consistentemente, y sobre la que existe sobrada literatura que vincula el aumento de la fosforilación de AMPK en paradigmas de neuroprotección.

Si bien resta aún mucho trabajo experimental para demostrar las vías intracelulares reguladas por la YM y su potencial rol en la neuroprotección, esta Tesis de Licenciatura ha logrado sentar las bases de una nueva línea de investigación en el laboratorio con proyección en el corto plazo.

ABSTRACT

Study of the molecular mechanisms regulated by yerba mate in dopaminergic neurons in culture.

The current Thesis was conceived to explore the cellular mechanisms regulated by the exposure to extracts of yerba mate (YM). We have particularly hypothesized that YM, or one of its main active compounds, chlorogenic acid (CGA), regulates intracellular mechanisms related with growth and survival of dopaminergic neurons.

As a first step to test this hypothesis, we have started with an even simplified model such as the neuroblastoma cell line SH-SY5Y treated with an extract of YM. We have tested the phosphorylation status of AMPK, a key signaling molecule involved in cell metabolism, very conserved, and linked with neuroprotection. We have developed experiments to test different concentrations and exposure times. Also, we have tested the effect of CGA at the equivalent concentration present in the extract. We have observed that YM produced an increase in the phosphorylation of AMPK (pAMPK/β-actin) at 1 and 0.1 µl of the extract per 500 µl of culture medium. It was not possible to detect any regulation with CGA during these trials. In addition, we have started the exploration of other regulatory molecules including an indirect marker of mTOR (p-p70S6Kα), EGR-1 and ERK.

On the other hand, we aimed to test changes in the cellular pathways of dopaminergic cultures *in vitro* undergoing treatments with yerba mate. We have developed with success this primary culture from mesencephala of embryos at 13.5 developmental stage, despite we could not advance further with the experimental approaches that we expected to include in this Thesis.

Results from the neuroblastoma SH-SY5Y cell line showed that they respond to the treatment with YM, regulating some molecules previously associated with neuroprotection. Among them, we focus our attention in the regulation of AMPK, which has been analyzed several times and consistently showed an increase in its phosphorylation after YM exposure. This result is encouraging because there is a huge evidence in the literature linking increase of phosphorylation of AMPK in paradigms of neuroprotection.

In conclusion, even if there are still too many experiments to demonstrate the intracellular pathways modulated by YM and there putative role in neuroprotection, this work have settle down the bases of a new experimental line with a clear projection in the short term.

ABREVIATURAS

3,4-DCQ: ácido 3,4-dicafeoílquinico.

3,5-DCQ: ácido 3,5-dicafeoílquinico.

4,5-DCQ: ácido 4,5-dicafeoílquinico.

AMP: adenosín monofosfato.

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

AMPK: proteína quinasa dependiente de AMP *(Adenosine monophosphate-activated kinase)*.

ANOVA: análisis de la varianza (*Analysis Of Variance*).

BL: buffer de lisis.

BSA: seroalbúmina bovina *(Bovine Serum Albumin)*.

CaMKK2: proteína quinasa quinasa dependiente de Calcio/calmodulina 2 (*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*).

CGA: Ácido Clorogénico (*chlorogenic acid)*.

EGR-1: proteína de respuesta de crecimiento temprano-1 (*Early Growth Response-1*).

EP: Enfermedad de Parkinson.

ERK: quinasa regulada por señal extracelular (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*).

ES: error estándar.

FBS: Suero Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum*).

GABA: ácido gamma-aminobutírico (*gamma-aminobutyric acid)*.

HRP: peroxidasa de rábano picante *(horseradish peroxidase)*.

HS: suero equino (*horse serum)*.

INYM: Instituto Nacional de la Yerba Mate.

LB: Cuerpos de Lewy (*Lewy bodies*).

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase*).

Met: Metformina.

mTORC1 ó mTORC2: Complejo TOR mamífero 1 ó 2 (*mammalian target of Rapamycin complex 1 or 2*).

p70S6Kα: proteína p70S6 quinasa α.

PBS: buffer fosfato salino (*phosphate buffered saline*).

SDS: dodecilsulfato de sodio *(Sodium dodecyl sulfate)*.

SN: Substantia nigra.

SNpc: Substantia nigra pars compacta.

TBS: buffer tris salino (*Tris-buffered saline*).

Theo: Teobromina.

TOR: Blanco de Rapamicina (*Target of Rapamycin*).

TSC2: complejo de esclerosis tuberosa (*Tuberous sclerosis complex 2*).

Wb: Western Blot.

YM: Yerba Mate.

α-Syn: proteína α-Sinucleína.

INDICE

AGRADECIMIENTOS..... 3
RESUMEN..... 4
ABSTRACT..... 5
ABREVIATURAS..... 6
1. INTRODUCCIÓN..... 8
1.1. Enfermedad de Parkinson..... 8
1.1.1. Neurodegeneración Dopaminérgica..... 10
1.1.2. Terapéutica..... 11
1.1.3. Incidencia de la dieta sobre la EP y su potencialidad neuroprotectora..... 12
1.2. Yerba Mate..... 13
1.2.1. Composición..... 16
1.2.2. Efectos benéficos sobre la salud y otros antecedentes..... 19
1.3. Modelos Experimentales..... 20
1.3.1. SH-SY5Y..... 21
1.3.2. Cultivos primarios..... 22
1.4. Procesos celulares asociados con Metabolismo Energético y Neuroprotección..... 22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... 26
3. MATERIALES Y MÉTODOS..... 27
3.1. Cultivos celulares..... 27
3.1.1. Tratamientos..... 28
3.2. Cultivo primario..... 31
3.3. Análisis por Western Blot de los niveles proteicos..... 32
3.4. Análisis histológicos..... 35
3.5. Análisis de datos y estadística..... 36
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 37
4.1. Cambios moleculares inducidos por YM o CGA en SH-SY5Y..... 37
4.2. Validación en cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas..... 44
4.3. Futuras aproximaciones experimentales..... 47
5. CONCLUSIÓN..... 50
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 54

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Parkinson.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo multifactorial, cuya etiología aún se desconoce (Michel, Hirsch and Hunot, 2016). En esencia, es una enfermedad neurodegenerativa con muerte prematura y prominente de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Como resultado, la deficiencia de dopamina en los ganglios basales conduce a un trastorno del movimiento caracterizado por síntomas motores parkinsonianos clásicos (Kalia and Lang, 2015).

Fue descripta por primera vez a principios del siglo XIX por James Parkinson en su trabajo "*An Essay on the Shaking Palsy*" (Parkinson, 1817), y poco después, fue revisada y difundida por Jean-Martin Charcot en 1861 (Rodríguez-Violante *et al.*, 2017). Como entidad patológica, en las últimas décadas fue revisada y actualizada en numerosas ocasiones siendo aún hoy un tema de debate entre los especialistas (Parkinson, 1969, 2002; Goetz, 2011). Hoy en día es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente en personas mayores de 60 años, siendo menos del 10% los casos atribuibles a causas genéticas (Michel, Hirsch and Hunot, 2016). Su diagnóstico se basa en la presencia de síntomas motores típicos que incluyen bradicinesia (lentitud de inicio del movimiento voluntario con reducción progresiva de la velocidad y amplitud de las acciones repetitivas), rigidez, postura anormal (inestabilidad no causada por disfunción primaria visual, vestibular, cerebelosa o propioceptiva), y temblor de reposo ("shaking palsy"; movimientos involuntarios de extensión y contracción de los miembros distales a una frecuencia de 4-6Hz) (Gibb and Lees, 1988; Michel, Hirsch and Hunot, 2016). Si bien se la clasifica con frecuencia como un trastorno motor, también presenta síntomas no motores que abarcan deterioro cognitivo, depresión, dolor y otros síntomas sensoriales sumados a disfunción autonómica (como incontinencia urinaria, estreñimiento con la necesidad de laxantes diarios e hipotensión postural sintomática) (Kalia and Lang, 2015; Jankovic, Rousseaux and Shulman, 2017; Weil *et al.*, 2017).

La manifestación de la enfermedad se caracteriza a nivel histológico por: (1) la presencia de los cuerpos de Lewy (LB)[1], que son agregados proteicos anormales enriquecidos en α-Sinucleína (α-Syn); (2) la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la substantia nigra (SN) que proyectan al estriado; y (3) microgliosis, que es la acumulación de células microgliales activadas (Xicoy, Wieringa and Martens, 2017). La α-Sinucleína es una proteína pequeña de unos 140

[1] Excepto en ciertos casos genéticos como los causados por mutaciones en Parkina. Estas son la causa más común de EP autosómica recesiva y son especialmente prevalentes en los pacientes que desarrollan la enfermedad antes de los 30 años. En estos pacientes, es notable la pérdida neuronal en la SNpc, pero sin una presencia prominente de LB (Kim and Alcalay, 2017).

aminoácidos que se encuentra principalmente en el compartimiento presináptico. Se cree que interviene en la formación del complejo SNARE, regulando de este modo la dinámica y tráfico vesicular, y en consecuencia la liberación de neurotransmisores (Burré *et al.*, 2010; Michel, Hirsch and Hunot, 2016). En un estado mal plegado, la α-Sinucleína se vuelve insoluble y se agrega formando inclusiones intracelulares dentro del cuerpo celular (cuerpos de Lewy) y procesos (neuritas de Lewy) de las neuronas (Kalia and Lang, 2015).

La característica patológica crucial de la EP, es la pérdida de neuronas dopaminérgicas dentro de la SNpc, donde el área más comprometida es típicamente el haz ventrolateral, que contiene neuronas que se proyectan hacia el putamen dorsal del cuerpo estriado (figura 1.1.a). La pérdida neuronal dopaminérgica moderada a severa dentro de esta área es probablemente la causa de las características motoras, en particular de la bradicinesia y la rigidez, en estadios avanzados de la enfermedad de Parkinson. Además, la pérdida ocurre en muchas otras regiones del cerebro, incluido el *locus ceruleus*, el núcleo basal de Meynert, núcleo pedunculopontino, núcleo rafe, núcleo motor dorsal del vago, amígdala e hipotálamo (Kalia and Lang, 2015).

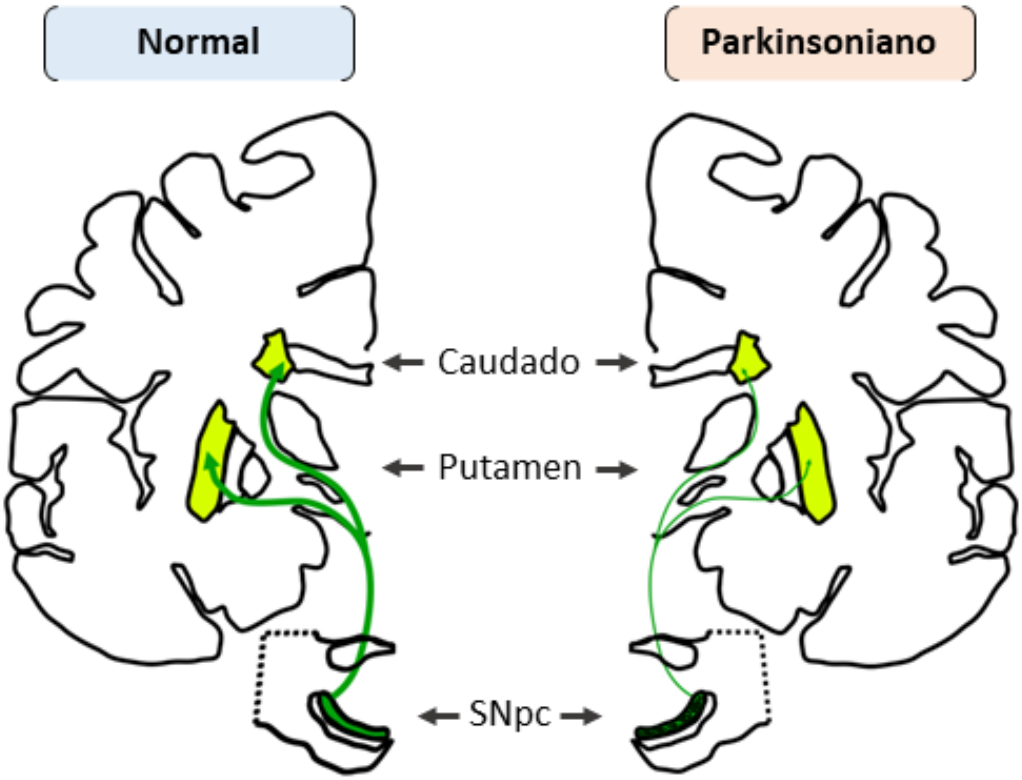

Figura 1.1.a: Representación esquemática de sección coronal de un cerebro normal y un cerebro parkinsoniano. Se destacan la SNpc y los Núcleos Caudados y Putamen. Las flechas verdes representan proyecciones de la SNpc, y su proporción disminuida en pacientes con Parkinson. Las figuras inferiores representan secciones transversales del cerebro medio. En amarillo se destacan el Caudado y el Putamen (núcleo estriado), y en verde la SNpc (el moteado oscuro representa neurodegeneración.

Si bien la causa de la enfermedad sigue siendo desconocida, la EP parece ser el resultado de una complicada interacción de factores genéticos y ambientales que afectan numerosos procesos celulares fundamentales. La complejidad etiológica de la EP se acompaña de desafíos clínicos, incluida la incapacidad de hacer un diagnóstico definitivo en las primeras etapas de la enfermedad y las dificultades en el manejo de los síntomas en las etapas posteriores.

Se entiende por etapa premotora o prodrómica al período temporal previo a la manifestación de los síntomas motores clásicos, tales como temblor, rigidez y bradicinesia. Es una etapa caracterizada por la manifestación de síntomas como la constipación, trastornos del sueño REM, y depresión. Estos síntomas son difícilmente atribuibles a la patología en un diagnóstico diferencial temprano dado que son comunes a múltiples patologías y condiciones. De esta forma, el diagnóstico ocurre recién con la manifestación de los síntomas motores. De hecho, por análisis retrospectivo de las historias clínicas de pacientes diagnosticados con EP es que pueden atribuirse los síntomas citados al período prodrómico (Siderowf and Lang, 2012; Kalia and Lang, 2015).

1.1.1. Neurodegeneración Dopaminérgica.

El deterioro progresivo de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc puede devenir de perturbaciones celulares causadas por un plegado anómalo y consecuente precipitación proteica de la proteína sináptica α-Syn; la disrupción del catabolismo autofágico-lisosomal; estrés del retículo endoplasmático; disfunción mitocondrial; o pérdida de la homeostasis del calcio. Además, estos mecanismos pueden cooperar en la promoción de la muerte celular. (Michel, Hirsch and Hunot, 2016).

Si bien la EP es una enfermedad neuronal, no todas las neuronas se ven afectadas en la misma. Si tomamos como referencia la formación de LB en cerebros de pacientes que han padecido la EP, vemos que la patología no afecta neuronas de manera aleatoria y mucho menos de manera ubicua. De hecho, en estadios intermedios de la enfermedad, el porcentaje total de neuronas afectadas en el cerebro, ronda el 1%. Así, las neuronas con la mayor vulnerabilidad documentada son las dopaminérgicas de la SNpc. Existen distintas hipótesis que buscan explicar esta vulnerabilidad particular. Una propuesta ampliamente difundida sostiene que la dopamina en sí misma (y sus metabolitos), mediante su oxidación citosólica y consecuente producción de radicales libres citotóxicos, es la causante de la muerte de estas neuronas (Greenamyre and Hastings, 2004). En cambio, Surmeier y colaboradores ponen el énfasis en las demandas energéticas que acarrea su el fenotipo fisiológico. Lo que hace distintivas a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc es que disparan potenciales relativamente lentos, con picos ensanchados, presentan actividad marcapasos, y tienen una pobre capacidad buffer intrínseca

sobre el Ca^{2+} intracelular. Las demandas energéticas que atienden al mantenimiento de los gradientes iónicos electroquímicos necesarios para la excitabilidad neuronal, y en particular en lo que respecta a la homeostasis del Calcio, supondrían una carga metabólica lo suficientemente elevada para estas células como para ponerlas en una situación de vulnerabilidad fisiológica (James Surmeier *et al.*, 2012).

1.1.2. Terapéutica.

En la actualidad, las terapias disponibles sólo tratan los síntomas de la EP. El manejo de base de la patología es el tratamiento sintomático con fármacos que aumentan las concentraciones de dopamina o estimulan directamente los receptores de dopamina. Las estrategias de manejo clínico para los cuadros discapacitantes que aparecen en los estadios avanzados de la enfermedad son deficientes. Estos cuadros incluyen síntomas motores que no responden a las terapias dopaminérgicas o se desarrollan como complicaciones del uso de drogas dopaminérgicas a largo plazo, así como una serie de síntomas no motores. Los tratamientos modificadores de la enfermedad que reducen la tasa de neurodegeneración o detienen el proceso de la enfermedad han sido esquivos y son la mayor necesidad terapéutica no satisfecha en la enfermedad de Parkinson (James Surmeier *et al.*, 2012; Kalia and Lang, 2015).

Como se mencionó anteriormente, las causas subyacentes de la enfermedad son heterogéneas, y múltiples procesos celulares están involucrados en la neurodegeneración de manera variable en la enfermedad de Parkinson. Así, una estrategia más efectiva podría ser apuntar a las vías moleculares disfuncionales específicamente en cada paciente con un cóctel de medicamentos. Otras posibles intervenciones quirúrgicas, no exentas de fuertes discusiones, incluyen terapia génica dirigida, trasplante de células y estimulación cerebral profunda de núcleos subtalámicos (Kalia and Lang, 2015).

En la figura 1.1.2.a se representa la evolución temporal de EP, donde se destacan las etapas preclínicas (progresión de una paulatina muerte de neuronas dopaminérgicas, sin manifestación de síntoma alguno); prodrómica (manifestación de síntomas no motores); y clínica (manifestación de síntomas motores y eventual diagnóstico clínico). Usualmente, los síntomas motores se manifiestan cuando degeneran ~80% de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. Es recién en este punto crítico que puede realizarse en la actualidad un diagnóstico certero. En ese momento el daño es irreversible por lo que las terapias existentes son de carácter paliativo. Dado este panorama resulta interesante plantear la posibilidad de extender el período prodrómico de manera tal que los pacientes manifiesten los síntomas motores a edades aún mayores, o no lleguen a manifestarlos jamás. En este contexto, el descubrimiento de opciones neuroprotectoras cobra relevancia.

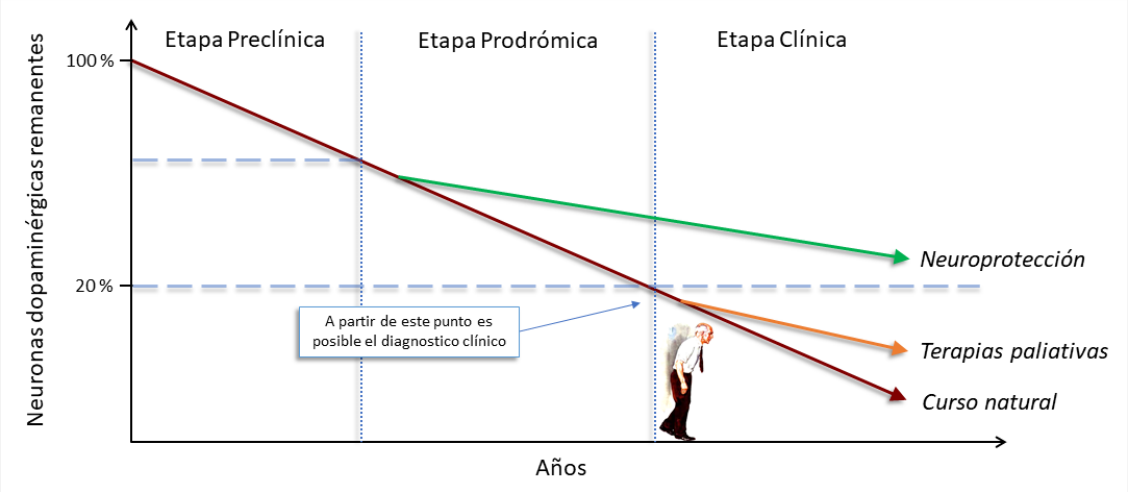

Figura 1.1.2.a: Evolución de la enfermedad de Parkinson. Representación esquemática del curso temporal de la patología. Se destacan la etapa preclínica (sin manifestación de síntomas, pero con paulatina degeneración dopaminérgica), prodrómica (con manifestación de síntomas no motores), y clínica (con manifestación de síntomas motores y eventual diagnóstico).

1.1.3. Incidencia de la dieta sobre la EP y su potencialidad neuroprotectora.

Existen antecedentes conocidos y aceptados de elementos comúnmente presentes en la dieta que presentan una relación inversa con el desarrollo de la EP, así como también se ha reportado la existencia de una posible asociación protectora del tabaquismo con la EP, pudiendo esto constituir una pista etiológica importante (Morens *et al.*, 1995). Sin embargo, un estudio más reciente muestra que los pacientes con EP pueden dejar de fumar más fácilmente que los controles, lo que sugiere que la asociación negativa con el tabaquismo podría deberse a una disminución de la respuesta a la nicotina durante la fase prodrómica (Ritz *et al.*, 2014). Por otra parte, el consumo elevado de café y cafeína se asocia con una significativa menor incidencia de EP (Ross *et al.*, 2000). También, el consumo de té ha atraído un interés creciente, ya que además de ser una de las bebidas más consumidas en el mundo, en particular el té verde, contiene polifenoles específicos que pueden desempeñar un papel importante en retrasar el inicio o detener la progresión de la EP. Bajo esta perspectiva, en los últimos años múltiples estudios han permitido desentrañar la forma en que dichos polifenoles modulan vías de señalización clave a nivel neuronal (Caruana and Vassallo, 2015; C. Jurado-Coronel *et al.*, 2016). En cuanto al consumo de alcohol, un meta-análisis de características no motoras tempranas y factores de riesgo para la EP encontró una significativa relación negativa para el consumo de alcohol moderado, entre otros factores (Noyce *et al.*, 2012). Recientemente se asoció también la dieta mediterránea con una menor incidencia al desarrollo de EP (Maraki *et al.*, 2019).

Sumado a estas evidencias, Milioli y colaboradores examinaron la actividad antiparkinsoniana de un extracto de *Ilex paraguariensis* en modelos de protección contra la

lesión cerebral inducida por MPTP y la reversión de la catatonia inducida por reserpina en ratones. Sus resultados sugieren que el extracto puede tener un perfil antiparkinsoniano en modelos animales, probablemente a través de su actividad antioxidante y acción antagonista sobre los receptores de adenosina A_{2A} (Milioli *et al.*, 2007). Por otra parte, un trabajo epidemiológico de nuestro país puso de manifiesto una asociación inversa entre el consumo de yerba mate y el desarrollo de EP (Gatto *et al.*, 2015). Estos resultados llevaron a plantear la hipótesis de que la yerba mate podría tener un papel protector potencial frente al desarrollo de enfermedad. En concordancia con esta idea, nuestro Laboratorio recientemente ha demostrado el efecto neuroprotector de un extracto de YM sobre neuronas dopaminérgicas de cultivos primarios de mesencéfalo de ratón (Bernardi *et al.*, 2019). Frente a este panorama, y dados los antecedentes citados en el área es que esta tesis se propone explorar los mecanismos que median el efecto neuroprotector de la yerba mate.

Todas estas observaciones pusieron nuevamente en el centro de escena el impacto de la dieta sobre la evolución de la enfermedad (Marras and Obeso, 2019), y sumado a la mejora en las herramientas para detectar los signos y síntomas de la EP en su período prodrómico (Berg *et al.*, 2015), se vuelve altamente atractiva la posibilidad de identificar y validar posibles alimentos neuroprotectores que puedan tener un impacto positivo en la progresión de la enfermedad.

1.2. Yerba Mate.

Ilex paraguariensis (Saint-Hilaire) es un árbol nativo de la selva paranaense, perteneciente a la familia de las aquifoliáceas, usado comúnmente en Sudamérica para la producción de yerba mate (YM). En estado silvestre puede alcanzar los 18 metros de altura, aunque en las producciones yerbateras se lo suele mantener a un máximo de 2 metros, para facilitar su cosecha. A partir de las hojas y ramas secas del mismo se produce la infusión comúnmente conocida como “mate”, aunque también se consume en distintos formatos como ser el “tereré”, el “mate cocido” y el “chimarrão”. El origen de la palabra “mate” deriva del quechua “*Mati*”, que significa calabaza. Esto se debe a que tradicionalmente el recipiente en que se produce la infusión es el fruto de la planta *Lagenaria vulgaris*, calabaza autóctona de la zona yerbatera (INYM). En la figura 1.2.a puede apreciarse una representación clásica de la planta.

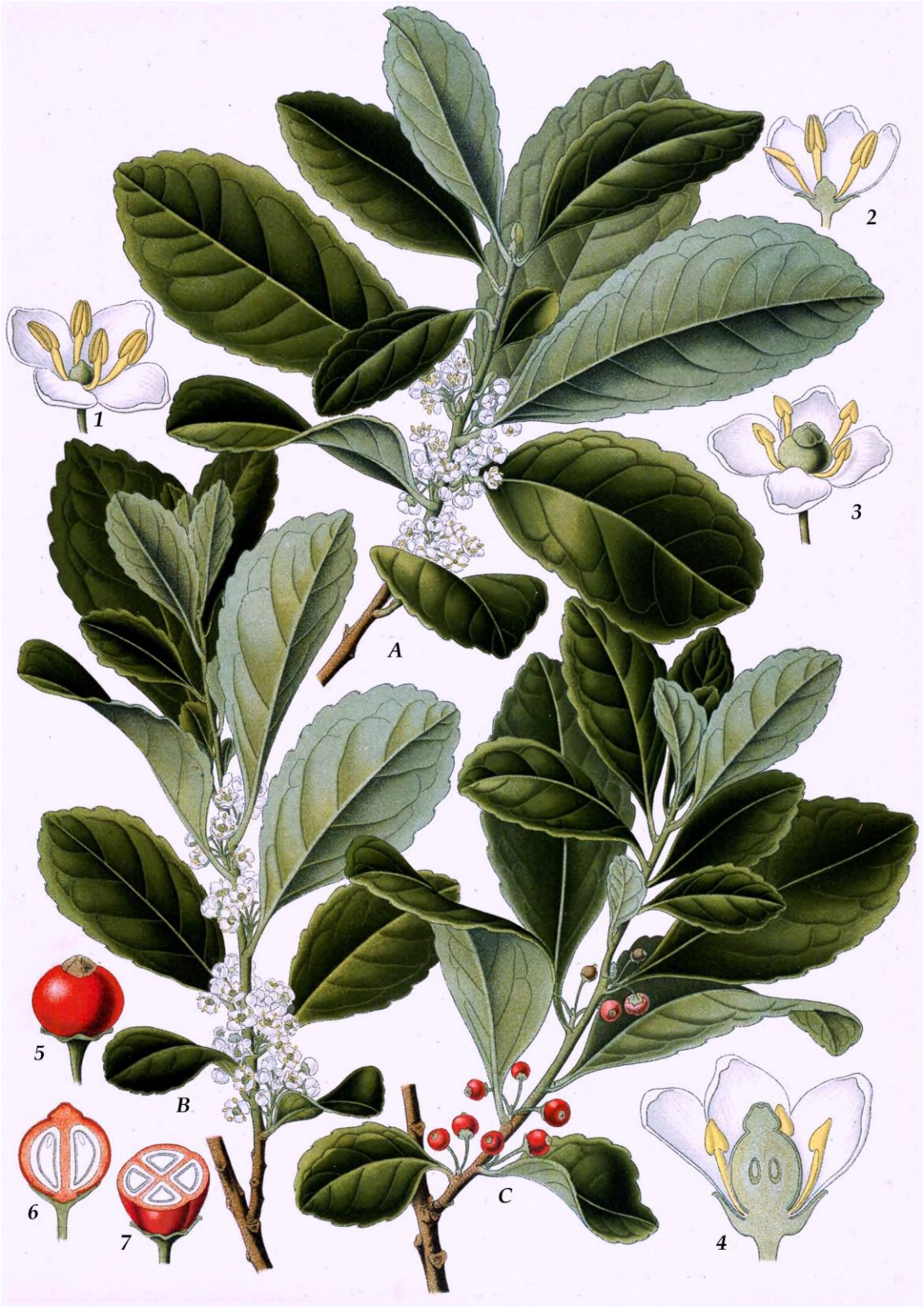

Figura 1.2.a: *Ilex paraguariensis* ilustrada por Franz Eugen Köhler, (Köhler's Medizinal-Pflanzen vol. 3, 1897). (A) Rama masculina. (B) Rama femenina. (C) Rama de fruto. (1) Flor masculina y (2) sección longitudinal. (3) Flor femenina y (4) sección longitudinal. (5) Frutos y (6) sección longitudinal y (7) transversal. (A, B, C) ligeramente reducido. (1-7) agrandado.

Ilex paraguariensis es cultivado principalmente en Argentina (Corrientes, Misiones), Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Sao Paulo), Paraguay (Alto Paraná, Amambay, Caaguazú, Canendiyu, Central, Guaira, Itapuá, Misiones, San Pedro). La producción mundial es de aproximadamente 500.000 toneladas anuales, siendo la República Argentina la que ocupa el primer lugar con un 60% (165.000 hectáreas por año con un rinde de aproximadamente 262.000 toneladas por año, según el INYM), seguido por Brasil con el 30%, y en menor medida Paraguay con el 10% del total. En la figura 1.2.b se muestra la principal zona productora de yerba mate en nuestro país.

Figura 1.2.b: Principal zona productora de yerba mate. Argentina es el país productor de un 60% del total de la producción mundial, siendo las provincias de Corrientes y Misiones las únicas productoras del país (modificado de la página web del Instituto Nacional de la Yerba Mate - INYM).

Mientras que brebajes como el té y el café se consumen comúnmente en volúmenes de 200 ml y en el intervalo de 10 minutos, el mate es consumido de una manera particular. Su consumo por cebadas consiste en ingestas intermitentes de entre 20 y 40 ml por cebada (dependiendo del tamaño del mate). El volumen total ingerido suele ser de entre 0,5 y 2 litros diarios, y el consumo tiene un curso sostenido y más prolongado que en los demás brebajes, siendo típicamente de alrededor de una hora. Esta forma continua de consumo produce niveles

sostenidos (aunque menores) de principios activos en plasma sanguíneo. Además, el aporte total de los mismos es mayor dado el volumen total de brebaje ingerido (Bracesco *et al.*, 2011).

La yerba mate no se consume directamente luego de su cosecha, sino que sufre un procesamiento previo a ser comercializada. A grandes rasgos, cabe destacar las siguientes tres etapas: (1) el sapecado y secado, que consiste en un secado rápido de las hojas al exponerlas a la llama directa; (2) el canchado, que consiste en una primera molienda gruesa y empaquetado para su estacionamiento; (3) y el estacionamiento propiamente dicho. La principal consecuencia del sapecado es el de reducir al mínimo el porcentaje de humedad, evitando la fermentación, y el de inhibir la enzima polifenol oxidasa[2].

1.2.1. Composición.

Existen numerosos compuestos bioactivos identificados en extractos de yerba mate, posibles responsables de sus potenciales efectos sobre la salud (figura 1.2.1.a). Entre ellos, las dos familias más abundantes son los polifenoles (ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQ) también conocido directamente como ácido clorogénico (CGA), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ), ácido gálico, galocatequinas y epicatequinas) y las xantinas (cafeína y teobromina), seguidos de alcaloides de purina (ácido cafeico; ácido 3,4-dicafeoilquínico; ácido 3,5-dicafeoilquínico), flavonoides (quercetina, kaempferol y rutina), saponinas, aminoácidos, minerales (P, Fe y Ca) y vitaminas (C, B1 y B2) (Pomilio, Trajtemberg and Vitale, 2002; Heck and de Mejia, 2007; Bracesco *et al.*, 2011).

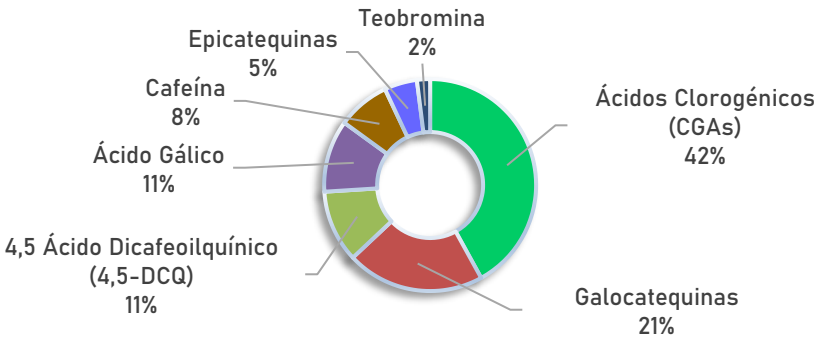

Figura 1.2.1.a: Principales compuestos orgánicos presentes en extractos de *Ilex paraguariensis*, según el relevamiento de Bracesco y colaboradores (2011). Además, en cada litro de extracto se encuentran habitualmente 5 g de polifenoles totales y 0,35 g de saponinas totales (Bracesco *et al.*, 2011).

[2] El extracto empleado en esta tesis fue obtenido a partir de hojas canchadas mediante la misma metodología seguida por Bernardi y colaboradores (Bernardi *et al.*, 2019).

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se caracterizó un extracto de yerba mate obtenido a partir de 2 g de hojas secas canchadas, concordante cualitativa y cuantitativamente con los reportes bibliográficos (Bracesco *et al.*, 2011). En la figura 1.2.1.b puede observarse el perfil por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) del mismo (Bernardi *et al.*, 2019).

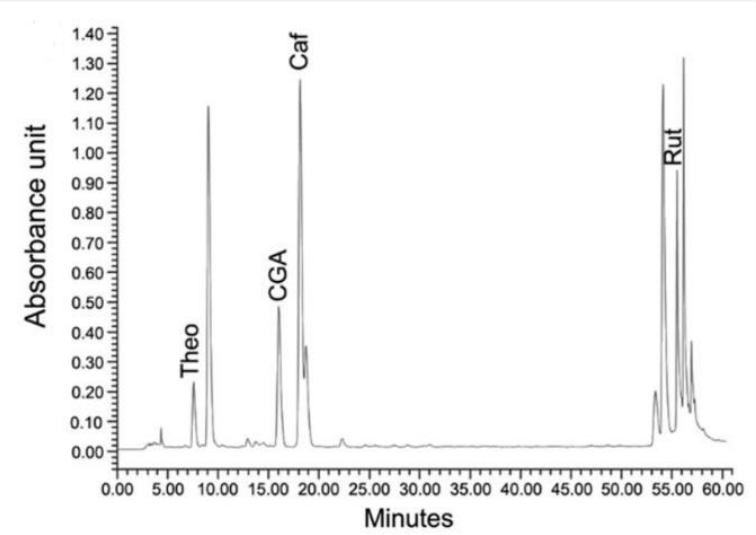

Figura 1.2.1.b: Perfil cromatográfico de HPLC del extracto de yerba mate empleado en nuestro laboratorio. El mismo fue caracterizado por 0,51 ± 0,21mg de GAE/ml de compuestos fenólicos en 1µL de extracto. Las concentraciones determinadas por HPLC fueron: Theo (teobromina): 0,56 ± 0,01mM (101,2 2,5 ppm), CGA: 1.05 ± 0.05mM (317.7 18.5 ppm), Caf (cafeína): 2.66 ± 0.08mM (515.8 16.5 ppm), y Rut (rutina): 1.79 ± 0.09mM (1091,4 53,4 ppm). Modificado de Bernardi y colaboradores, 2019.

Si bien el ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQ), por ser el primero en ser descubierto y subsecuentemente aislado en 1908 por Görter (Moores, McDermott and Wood, 1948), es también conocido directamente como ácido clorogénico (CGA). Los ácidos clorogénicos (CGAs) pertenecen a una familia de ésteres formados entre un ácido cinámico (como el ácido cafeico, ácido ferúlico y ácido p-cumárico) y el ácido quínico (figura 1.2.1.c); cuyo rol en la fisiología vegetal es actuar como intermediarios en la biosíntesis de la lignina (Boerjan, Ralph and Baucher, 2003). Es interesante destacar que a pesar de lo que sugiere su nombre no poseen cloro en su estructura, y su nombre se debe al color verdoso que producen al oxidarse en los compuestos en los que están presentes.

El término de “ácido clorogénico” se utilizó por primera vez en 1846 y desde entonces ha habido discrepancias en la literatura respecto a la nomenclatura de los CGAs (Kremr *et al.*, 2016). Los problemas con la nomenclatura datan de los primeros intentos por aislar compuestos fisiológicamente activos de semillas y hojas, y continuó más tarde con el descubrimiento de isómeros “mono-cafeicos” de ácido quínico (3-CQ o ácido neoclorogénico, 4-CQ y 5-CQ o CGA).

Cabe destacar que además de los isómeros mencionados existe también otro grupo de compuestos emparentados, isómeros entre sí, con dos sustituyentes de ácido cafeico que difieren en la ubicación de los mismos. Estos compuestos polifenólicos son el ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ), el ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DCQ) y el ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-DCQ), todos presentes en extractos de yerba mate. Esto pone de manifiesto la dificultad inicial que supuso el aislamiento y purificación de estos compuestos y los esfuerzos posteriores por unificar y esclarecer su nomenclatura (Kremr *et al.*, 2016).

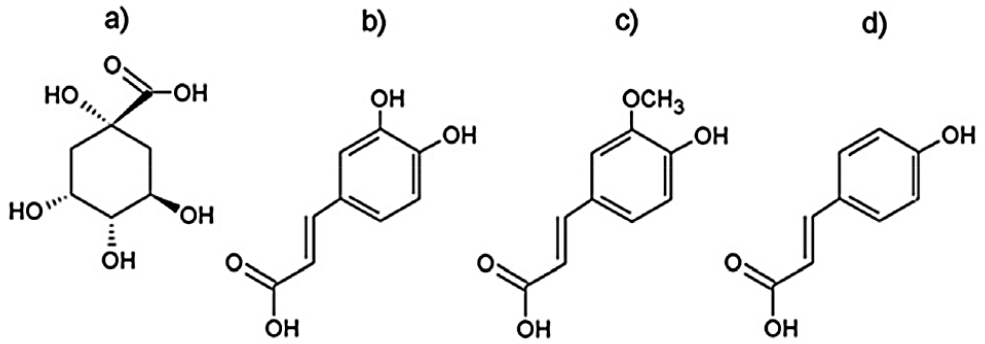

Figura 1.2.1.c: Formulas estructurales del ácido quínico (a) y tres de los más comunes ácidos trans-cinámicos de la familia de los CGAs: ácido cafeico (b), ácido ferúlico (c) y ácido p-cumárico. Tomado de Kremr y colaboradores (2016).

En la figura 1.2.1.d se esquematiza la estructura molecular del ácido 5-O-cafeoilquínico, principal compuesto de la familia de CGAs, al cual nos referiremos de aquí en más simplemente como ácido clorogénico (CGA)[3]. En los últimos años el CGA ha atraído particular interés como un componente beneficioso para la salud. Se encuentra ampliamente distribuido en la dieta, presente en alimentos como frutas y verduras, aunque en variadas cantidades, y en brebajes como el cómo el té y el café. En particular, las principales fuentes de CGA son los granos de café y la yerba mate (Marques and Farah, 2009; Heitman and Ingram, 2017).

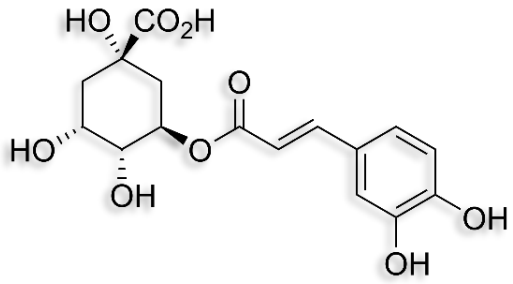

Figura 1.2.1.d: Estructura molecular del ácido 5-O-cafeoilquínico o ácido clorogénico, principal compuesto de la familia de los CGAs.

[3] Cosa que también sucede en la literatura.

1.2.2. Efectos benéficos sobre la salud y otros antecedentes.

Al momento de la conquista europea en América, las hojas de *Ilex paraguariensis* eran utilizadas por los pueblos guaraníes como una opción medicinal, tanto es así que fue inscripta en un compendio de *"materia médica misionera"* realizado por el cura jesuita Pedro de Montenegro en el año 1711, en el que se le atribuían propiedades para mitigar el cansancio (Montenegro, 1711). La investigación formal realizada en YM fue muy escasa hasta las últimas décadas, y muchas propiedades medicinales que se le atribuían a la YM están empezando a ser demostradas y validadas científicamente.

Entre los múltiples beneficios sobre la salud, se ha publicado que la yerba mate es hipocolesterolémica, hepatoprotectora, estimulante del sistema nervioso central, diurética y que beneficia al sistema cardiovascular. También se la ha sugerido para el manejo de la obesidad por sus propiedades reductoras de lípidos y adelgazantes. Tiene una alta capacidad antioxidante, habiendo mostrado en ensayos *in vitro* protección del ADN frente a la oxidación y protección de la lipoproteína de baja densidad (LDL) a la peroxidación lipídica. También se ha informado cierta asociación con la prevención de algunos tipos de cáncer mediante la inhibición de la topoisomerasa II. De todos modos cabe señalar que existe cierta controversia vinculada al desarrollo de ciertos tipos de cáncer, como ser el oral, orofaríngeo, esofaríngeo y laríngeo, aunque pareciera deberse más a un factor térmico (temperatura del agua de cebada) que a un factor químico (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2005; Heck and de Mejia, 2007; Bracesco *et al.*, 2011).

Por su parte, el consumo de CGA ha sido vinculado con efectos benéficos para la salud, que incluyen neuroprotección, cardioprotección, pérdida de peso, actividad antiinflamatoria, disminución de la presión arterial, disminución de la resistencia a la insulina inducida por la dieta, efectos ansiolíticos y antihiperalgésicos (incremento mantenido en la sensibilidad al dolor). Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado fuertes correlaciones entre el consumo de polifenoles en la dieta y la reducción del riesgo de desarrollar afecciones neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson (Heitman & Ingram, 2017). Además, existe una creciente evidencia de que el consumo de café, alto en CGA, parece ser neuroprotector y puede atenuar el deterioro cognitivo (Heitman and Ingram, 2017). Conjuntamente, ha sido reportado que el CGA puede pasar la barrera hematoencefálica (BBB) como metabolito o en su forma pura para actuar directamente sobre el sistema nervioso central (SNC)(Ito *et al.*, 2008).

1.3. Modelos Experimentales.

Existen múltiples modelos experimentales de la EP tanto en roedores como en primates e incluso en moscas. Los mismos pueden ser divididos en dos categorías: los modelos genéticos y los modelos basados en la administración de toxinas. Mientras que los primeros son creados en base a blancos asociados a mecanismos potenciales de la generación de la EP en humanos, en los segundos se utilizan diferentes moléculas que dañan la vía nigro-estriatal (Bové *et al.*, 2005; Dawson, Ko and Dawson, 2010; Tieu, 2011). Es importante destacar que los modelos experimentales distan considerablemente de lo que representa la EP desde el punto de vista clínico (sintomatología motora y no motora), histológico o fisiológico, pero son de gran utilidad para el estudio del funcionamiento de los ganglios basales, la actividad anti-Parkinsoniana de determinadas sustancias, el estudio de los mecanismos implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y la eficacia de posibles tratamientos neuroprotectores, como el aquí propuesto.

A partir del amplio conocimiento de la EP y la oferta de modelos animales, la investigación en EP permite optar por modelos simplificados que se adapten a la/s hipótesis específicas de trabajo. Algunas líneas experimentales relacionadas con la muerte y sobrevida de las neuronas dopaminérgicas, pueden estudiarse en modelos *in vitro*, como instancia previa a la validación de los resultados en modelos más complejos *in vivo*.

Entre los modelos *in vitro*, son comúnmente empleados los cultivos primarios de cerebro medio de embriones de rata o ratón y -aunque más limitado y acotado- el uso de la línea celular SH-SY5Y. Estos, resultan atractivos para los primeros pasos en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la neuroprotección mediada por la yerba mate. Si bien la distancia entre los modelos *in vitro* y la fisiopatogenia de la EP es considerable, ofrecen un paradigma experimental sobre el cual desarrollar aproximaciones preliminares en gran escala, que luego deberán revalidarse con modelos más complejos, e incluso, en pacientes.

En el afán de buscar alternativas experimentales, las células SH-SY5Y representan una herramienta atractiva para estudiar ciertos mecanismos celulares que podrían correlacionarse con el funcionamiento neuronal y/o la EP, además de bridar la posibilidad de desarrollar estrategias de análisis masivo. A pesar de esto, es preciso tener presente que pocos aspectos de la patología de la enfermedad pueden ser fehacientemente estudiados en este modelo celular, y por lo tanto anormalidades electrofisiológicas o disfunciones neuroquímicas requieren otros modelos más complejos, como por ejemplo los cultivos primarios dopaminérgicos, o mejor aún, animales (Xicoy, Wieringa and Martens, 2017).

Las ventajas de los cultivos en general es que ofrecen la posibilidad de probar muchas manipulaciones en simultáneo, en un intervalo temporal breve, reduciendo cuestiones éticas y regulatorias. La exploración en líneas celulares como primera opción, reduce considerablemente el uso de animales de experimentación, y permiten una intervención genética y farmacológica más sencilla, así como una simplificada obtención de imágenes y análisis bioquímicos a nivel celular.

Las células cultivadas son sistemas reducidos que nos permiten responder a preguntas específicas rápidamente, explorar vías de señalización y resolver detalles sobre mecanismos moleculares (Falkenburger, Saridaki and Dinter, 2016).

1.3.1. SH-SY5Y.

La línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) es una sublínea de la línea celular SK-N-SH, que se estableció en cultivo en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea de un neuroblastoma metastásico de una mujer de 4 años, y fue sometida a tres rondas de selección clonal (SK-N-SH -> SH-SY -> SH-SY5 -> SH-SY5Y) (Kovalevich and Langford, 2013; Xicoy, Wieringa and Martens, 2017).

Presentan ciertas ventajas experimentales, que las vuelven un modelo atractivo en el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Dado que las células SH-SY5Y derivan de células humanas, expresan una cantidad de proteínas e isoformas de proteínas específicas de humanos. Esto, sumado a la ventaja de que, al ser consideradas una línea celular, no acarrean conflictos éticos destacables con respecto a su uso. Además, su manejo es relativamente más sencillo y económico que el de cultivos primarios, dando un rendimiento en biomasa considerablemente mayor. Esto último es clave, cuando el planteo experimental demanda una cantidad de muestra compatible con análisis de niveles proteicos (como Wb) (Kovalevich and Langford, 2013).

Por otra parte, las células SH-SY5Y muestran una serie de aberraciones genéticas debido a su origen canceroso, pero la mayoría de los genes y vías desreguladas en la patogénesis de la EP se mantienen intactas (Krishna *et al.*, 2014; Xicoy, Wieringa and Martens, 2017). Si bien hay ciertos investigadores que las consideran como un modelo celular para estudiar la EP, y existe mucha literatura al respecto, nuestro grupo y otros no consideramos a esta línea celular como modelo de la EP, pero sí como una herramienta exploratoria de utilidad. El hecho que sea una línea de origen tumoral, sumado a que son catecolaminérgicas, y no dopaminérgicas, son puntos críticos en la controversia sobre su uso como modelo celular de la EP.

A pesar de todo esto, su uso está ampliamente difundido en la investigación en neurociencias en general y la EP en particular, principalmente porque tienen características de las neuronas catecolaminérgicas (aunque no estrictamente dopaminérgicas), y son

relativamente sencillas de mantener en cultivo, siendo de nivel de bioseguridad 1 (CDC, 2009; Dextera and Jenner, 2013; Kovalevich and Langford, 2013; Xicoy, Wieringa and Martens, 2017). Por estos motivos la línea SH-SY5Y también es usada en otras áreas de la neurociencia como en el estudio de la enfermedad de Alzheimer, la neurotoxicidad, isquemia y otras (Xicoy, Wieringa and Martens, 2017). En nuestro laboratorio somos conscientes de las limitaciones de las líneas celulares, pero creemos que podernos valernos de ellas para obtener información primaria sobre mecanismos de acción.

1.3.2. Cultivos primarios.

Se denominan cultivos primarios a los cultivos preparados a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado y tienen inhibición por contacto. El estar en contacto con su entorno celular de origen, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural. Por otra parte, la mayoría de los cultivos primarios mantienen la viabilidad por un período de tiempo limitado (a excepción de algunos derivados de tumores).

En particular, Michel y colaboradores (Beck *et al.*, 1991; Michel *et al.*, 1999; Guerreiro *et al.*, 2008) desarrollaron un modelo en cultivo de neurodegeneración dopaminérgica, realizado a partir de mesencéfalos de embriones de rata de 14,5 de desarrollo embrionario, luego adaptado en ratón al día 13,5 (E13,5). Este tipo de cultivos se componen de una mezcla de diferentes tipos de neuronas y glía, con un 2 a 5% de neuronas dopaminérgicas que, en medios no enriquecidos, mueren espontáneamente en lapso de dos semanas (Falkenburger, Saridaki and Dinter, 2016), hecho que no ocurre con los otros tipos neuronales (Beck *et al.*, 1991). Este paradigma experimental ofrece la posibilidad evaluar potenciales factores neuroprotectores sobre células dopaminérgicas en cultivo, tal y como Bernardi y colaboradores evaluaron en un reciente trabajo de nuestro laboratorio (Bernardi *et al.*, 2019).

1.4. Procesos celulares asociados con Metabolismo Energético y Neuroprotección.

La investigación acumulada ha señalado varios factores neuropatológicos que parecen particularmente relevantes para el desarrollo y la progresión de la EP (*ver sección 1.1.1*). Varios enfoques de tratamiento experimental para la EP han tratado de abordar estos factores, a menudo de forma individual, pero una aproximación sobre los elementos que los regulan en forma colectiva, podría resultar más efectiva. Muchos de estos factores fueron relacionados con

la actividad de la proteína quinasa activada por 5'-AMP (AMPK, por sus siglas en inglés, *Adenosine monophosphate-activated kinase*) (Curry *et al.*, 2018). Se trata de una quinasa de serinas y treoninas, altamente conservada que se encuentra en todos los genomas eucariotas, lo que sugiere un papel clave en el funcionamiento celular. Es una proteína heterotrimérica compuesta por las subunidades α (α1 o α2, con función catalítica), β (β1 o β2, con función de andamiaje o estructural) y γ (γ1, γ2 o γ3, de unión a AMP). Debido a que existen varias isoformas para cada subunidad, existen 12 combinaciones posibles, y, por lo tanto, 12 complejos AMPK únicos. Dichos complejos parecieran tener una distribución tejido-específica, e incluso una distribución intracelular diferencial. AMPK se activa alostéricamente por concentraciones elevadas de AMP. La unión de AMP a la subunidad γ promueve un cambio conformacional que permite la fosforilación de la treonina 172 en el dominio de activación de la subunidad α o evita su desfosforilación por fosfatasas proteicas (Hardie, Ross and Hawley, 2012; Xu and Ash, 2016).

En condiciones normales, las células mantienen niveles bajos de AMP, y AMPK se mantiene en un estado inactivo desfosforilado. Cuando se atraviesa una crisis energética y los niveles de ATP disminuyen, AMPK se fosforila y desencadena la restauración del estado energético al inhibir las vías que consumen ATP, como la síntesis proteica, la síntesis de ARN y la síntesis de ácidos grasos, al mismo tiempo que activa las vías que generan ATP, como la glucólisis, la β-oxidación y la biogénesis mitocondrial (Hardie, Ross and Hawley, 2012; Xu and Ash, 2016).

Un mecanismo potencial por el cual la activación de AMPK puede mediar neuroprotección es a través de la activación de la autofagia o la inhibición de la síntesis proteica (figura 1.4.a) (Poels *et al.*, 2009; Curry *et al.*, 2018). Estos procesos son regulados respectivamente por los sustratos de AMPK, mTORC1 y mTORC2. El blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus silgas en inglés, *mammalian target of Rapamycin*) forma parte de una cascada de señalización que regula múltiples procesos celulares tales como el crecimiento celular, el ciclo celular y la autofagia. Forma dos complejos proteicos: mTORC1 y mTORC2, de los cuales el primero es el más estudiado. AMPK fosforila en forma directa múltiples componentes de la vía mTORC1 como ser TSC2 (por sus siglas en inglés, *Tuberous sclerosis complex 2*) y Raptor (componente distintivo de mTORC1). Ambas fosforilaciones tienen consecuencias inhibitorias por sobre la vía de mTORC1. Por otra parte, la activación de ULK1 es esencial para la formación de autofagosomas, siendo uno de los componentes principales del llamado complejo de iniciación de la autofagia. AMPK y mTOR regulan la autofagia mediante la fosforilación directa de ULK1, promoviéndola y reprimiéndola respectivamente (Xu and Ash, 2016). Además, P70S6Kα (proteína ribosómica S6 quinasa alfa-1), es una serín/treonín quinasa cuyo sustrato es la proteína ribosómica S6. La fosforilación de S6 induce la síntesis de proteínas en el ribosoma.

El estudio de la fosforilación de p70S6Kα en treonina 389 es controvertido, ya que durante mucho tiempo se utilizó como un sello distintivo de activación por mTOR y por lo tanto se correlaciona con la inhibición de la autofagia, pero varios estudios recientes sugieren que la actividad de p70S6K juega un papel positivo en el aumento de la autofagia (Ci *et al.*, 2014; Datan *et al.*, 2014).

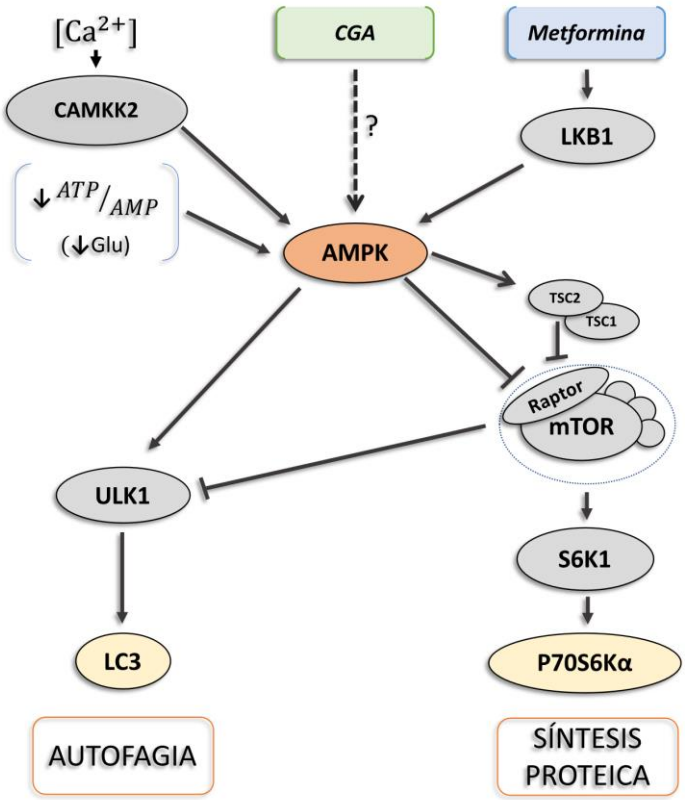

Figura 1.4.a: Posible vía molecular involucrada en el efecto neuroprotector de la yerba mate, y en particular del CGA. Aquí se propone que el CGA induciría la fosforilación de AMPK y como consecuencia de ésta, la formación del complejo de iniciación (fosforilación de ULK1) que finalmente estimularía la autofagia. A su vez, es sabido que AMPK inhibe la inhibición causada por la vía de mTORC1 sobre ULK1, e inhibe la síntesis proteica mediada también por mTORC1.

El planteo de que estos mecanismos regulados por AMPK puedan ejercer un rol clave en la neuroprotección, se ve reforzado por evidencia reciente en mejoras cognitivas y clínicas en pacientes con Alzheimer, y a su vez diabéticos, tratados con Metformina (Met; activador de AMPK) (Markowicz-Piasecka *et al.*, 2017).

Estudios recientes han demostrado que el CGA activa AMPK induciendo su fosforilación en diferentes tipos celulares no neuronales (Ong, Hsu and Tan, 2012; Naveed *et al.*, 2018). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales el CGA activaría AMPK son aún poco claros. Más aún, la regulación de AMPK por CGA o YM en neuronas es aún desconocida, y en este punto se centra el objeto de esta tesis.

Frente a este panorama, esta Tesis propone desarrollar una primera aproximación para estudiar los cambios moleculares regulados por la exposición a yerba mate y CGA en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando el marco teórico propuesto y teniendo presentes los antecedentes experimentales en el área, se desprende la hipótesis de trabajo de esta tesis de licenciatura.

Hipótesis de Trabajo

La exposición a extractos de yerba mate o ácido clorogénico (CGA) regulan mecanismos intracelulares relacionados con la supervivencia y el crecimiento de las neuronas dopaminérgicas.

Objetivo General

Profundizar en los mecanismos moleculares que median el efecto neuroprotector de la yerba mate sobre las neuronas dopaminérgicas en cultivo.

Objetivos específicos:

OE1: Evaluar cambios moleculares inducidos por YM/CGA en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y.

OE2: Validar los cambios descriptos en el OE1 en cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos celulares.

Se utilizaron cultivos de la línea celular SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) a los que se sometió a una serie de tratamientos experimentales con el objeto de inducir cambios a nivel molecular, atribuibles a la aplicación de YM o CGA. Para ello, se utilizó el extracto de YM desarrollado y caracterizado por nuestro laboratorio en un trabajo previo, obtenido a partir de hojas canchadas (Bernardi *et al.*, 2019). En la figura 3.1 pueden observarse micrografías representativas de los cultivos de SH-SY5Y al microscopio óptico, según informa el ATCC® (por sus siglas en inglés, *American Type Culture Collection*).

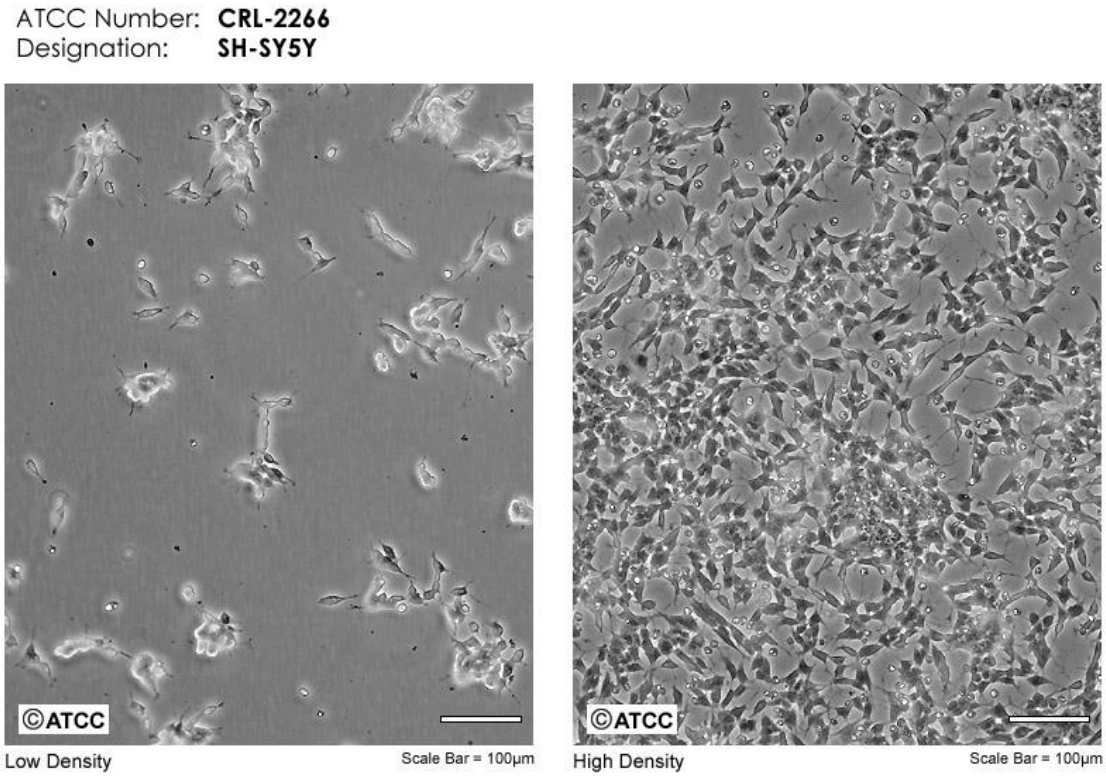

Figura 3.1: Micrografías de referencia para el cultivo de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y según el ATCC®. Pueden observarse células a baja densidad de cultivo (izq) y a alta densidad (der). Imagen tomada de la página web del ATCC®

El manejo de cultivos involucró el aprendizaje de las técnicas de rutina que esta práctica conlleva, como ser: el mantenimiento de la línea celular, con su correspondiente control diario, involucrando cambios de medio periódicos, conteo celular mediante cámara de Neubauer, pasajes de cultivo mediante tripsinización, además del congelamiento y conservación de determinados pasajes celulares en Nitrógeno líquido, etc.

El cultivo de la línea SH-SY5Y fue realizado en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) o DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) suplementado con FBS 10% (Suero Fetal Bovino 10%; Natocor® Argentina), L- Glutamina 2 mM y Penicilina-Estreptomicina sulfato 1% (stock: 10.000 UI/ml Penicilina G sódica, 10.000 µg/ml Estreptomicina Sulfato, Gibco®, Cat n° 15140-122). Las células se incubaron en una estufa de cultivo humidificada con 5% de CO_2 a 37°C. Las condiciones de cultivo celular empleadas en esta tesis coinciden en la mayoría de los aspectos con los criterios más frecuentes, vistos por Xicoy et al. , en un relevamiento de 962 publicaciones pertinentes al tema (Xicoy, Wieringa and Martens, 2017).

Para el mantenimiento y amplificación de las células, se realizó el cultivo en flask's de tipo T25 y T75. En el primer caso se plaquearon a una densidad de sembrado de $0,7x10^6$ de células con un volumen de medio de entre 3 y 5 ml. Para los T75 se sembró a una densidad de $2,1x10^6$ de células con un volumen de medio de entre 8 y 15 ml.

Para el desarrollo de tratamientos experimentales se plaquearon las células en placas de 6 y 12 pocillos, a una densidad de siembra de $0,3x10^6$ células/pocillo y $0,1x10^6$ células/pocillo respectivamente. El volumen de medio usado fue de entre 3 y 5 ml/pocillo para el primero y de entre 1 y 2 ml/pocillo para el segundo.

Los pasajes celulares se desarrollaron sin dejar que las células alcanzaran la confluencia total, siempre en valores entre 70% y 90% de confluencia. Para la realización de las mismas se utilizó Tripsina 0,05% (Trypsin 1:250 powder, Gibco® cat n° 27250018) en volumen suficiente y por un tiempo máximo de 3 minutos. Para el posterior plaqueo se realizó el conteo de células viables mediante tinción con Azul de Tripán y conteo en cámara de Neubauer. Esto último, tanto para el mantenimiento como para las placas destinadas a tratamiento experimental. En esta tesis se usaron células de un pasaje menor a 40.

En cuanto a la conservación de la línea celular se desarrolló en distintas oportunidades su criopreservación en nitrógeno líquido, así como también su descongelado para posterior uso, cuando las necesidades experimentales así lo requirieron. Dicha preservación se realizó en medio DMEM/F12 suplementado en la forma antes descripta con el agregado de DMSO 10%.

3.1.1. Tratamientos.

Para abordar el objetivo de esta tesis, se desarrollaron tres tipos de experimentos sobre los cultivos de SH-SY5Y. Haciendo uso del extracto de YM, las células se incubaron a distintos tiempos de exposición, por un lado, y a distintas concentraciones relativas del extracto, por el otro. Además, fueron incubadas con CGA a una concentración que igualase la presente en el

extracto, y otras variantes. Previo a esto, fue necesario poner a punto un control positivo, en particular, de la fosforilación de AMPK. De la revisión bibliográfica abordada, el uso de Metformina en concentraciones que oscilan entre 1 y 10mM surgió como un candidato promisorio. En esta tesis, se preparó una dilución 1M de Metformina a partir de comprimidos comerciales de Hipoglut Met® (Glimepirida 2mg – Metformina 1000mg) molidos y disueltos en PBS. Luego, se cultivaron células con distintas concentraciones de Metformina (1, 2, 5 y 10 mM), asumiendo que la glimepirida no tiene efecto sobre las variables de interés en esta aproximación experimental.

En el primer caso se buscó construir una curva temporal que permitiera estimar el tiempo para el cual el efecto sobre los distintos niveles de fosforilación de proteínas clave (sobre todo en AMPK), fuera máximo. De esta forma, las células se incubaron con el extracto durante los tiempos que muestra la figura 3.1.1.a. Como control de fosforilación de AMPK se usó Metformina a una concentración 5 mM, y como células no tratadas se emplearon pocillos sin exponer a ningún compuesto en todas las placas empleadas. El manejo experimental fue abordado de manera de que la lisis de todos los tratamientos se realizara al mismo tiempo. El extracto de YM fue usado en una relación de 1 µl por cada 500 µl de medio de cultivo, y fue aplicado directamente sobre el medio en que se encontraban las células.

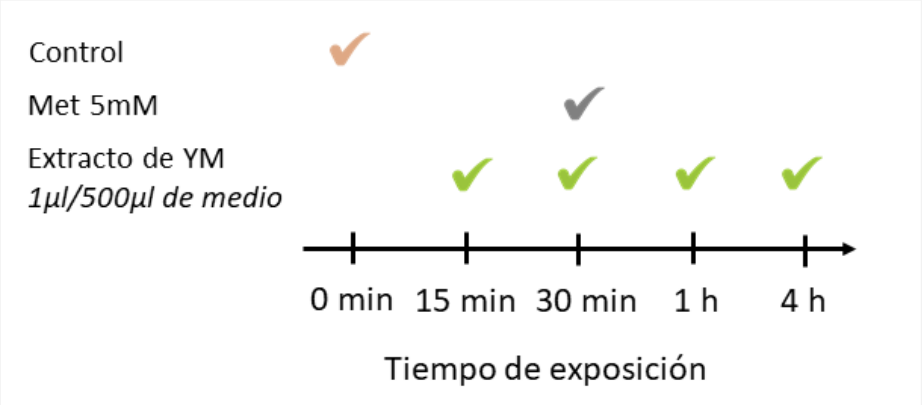

Figura 3.1.1.a: Representación esquemática de la curva temporal planteada respecto a la exposición al extracto de yerba mate. Se empleó Metformina 5mM como control de fosforilación de pAMPK. El control refiere a células no tratadas con ningún compuesto, cultivadas en las mismas placas que las demás.

En cuanto al segundo caso, se buscó construir una curva de concentraciones relativas, que permitiera estimar la concentración de extracto necesaria para obtener un efecto máximo, por sobre la fosforilación de proteínas clave en neuroprotección, y en particular sobre AMPK. Para este fin, los cultivos fueron expuestos durante 30 min con diluciones seriadas de extracto. En la figura 3.1.1.b puede observarse una representación esquemática de esto mismo, siendo la

concentración de partida la relación de 1 µl de extracto por cada 500 µl de medio. Nuevamente, aquí se empleó como control de fosforilación de AMPK, Metformina en concentración 1mM. Como control no tratado se emplearon células de pocillos presentes en todas las placas experimentales. Además, algunos cultivos fueron expuestos al doble de la dilución original, es decir, 2 µl de extracto por cada 500 µl de medio. Todas las diluciones empleadas se prepararon en una alícuota de medio de cultivo completo, el mismo día que se usaron en sus respectivos experimentos. Este recaudo se tomó para prevenir la degradación de algún componente del extracto, por alguno presente en el medio.

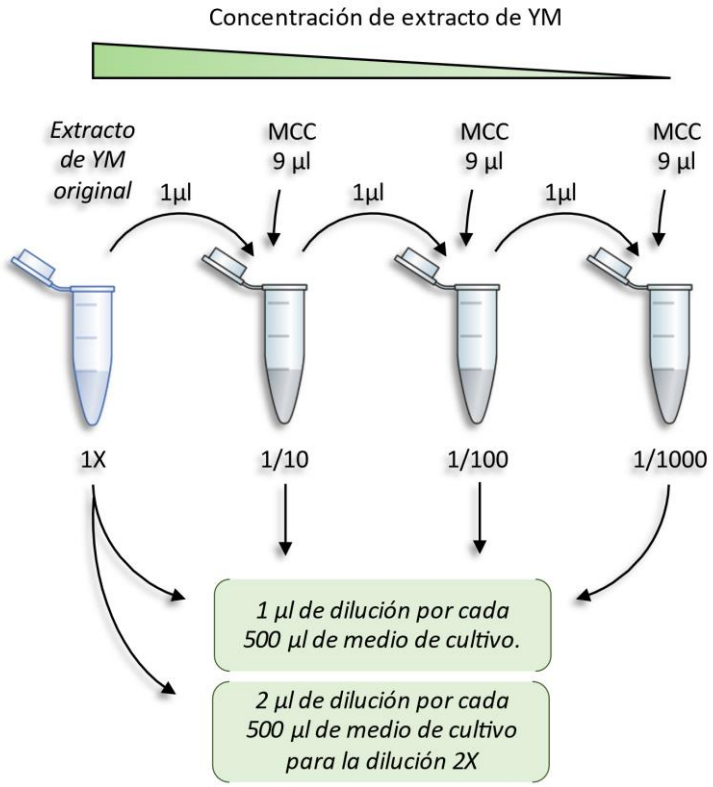

Figura 3.1.1.b: Representación esquemática de la curva de concentraciones relativas utilizada. A partir de una relación de 1 µl de extracto de YM por cada 500 µl de medio (1/1 o 1X), se desarrollaron diluciones seriadas con las que se trató a los cultivos celulares SH-SY5Y. Todas las diluciones se prepararon el mismo día de su respectivo experimento. MCC: Medio de Cultivo Completo.

Por último, se desarrolló un experimento similar a la curva de concentración relativa pero únicamente con CGA (Sigma®, cat n° C3878). A partir de la caracterización del extracto por HPLC se estableció que la concentración de CGA es aproximadamente 1mM (Figura 1.2.1.b). De esta forma, se empleó dicha concentración (1X), el doble (2X) y el décimo (1/10) para incubar distintos cultivos.

3.2. Cultivo primario.

Los cultivos primarios se realizaron a partir de embriones de ratón (cepa CF-1) de 13,5 días de desarrollo embrionario (E13.5), siguiendo el protocolo propuesto por Michel y Ruberg (Mitchell, 2000), y puesto a punto por nuestro grupo. En esta etapa, las neuronas dopaminérgicas se encuentran en un estadio postmitótico y los astrocitos comienzan a proliferar.

En una primera instancia, los animales preñados fueron sacrificados por desnucamiento a día 13,5 post visualización del tapón seminal, indicador comúnmente empleado en bioterio como referencia de cópula. Los E13,5 fueron extraídos quirúrgicamente y colectados en medio L15 (Leibovit's L-15 Medium, Powder, cat n° 41300-021, Gibco®) para la disección posterior de los cerebros medios con la ayuda de una lupa binocular. La disección consistió en aislar mecánicamente la región ventral del mesencéfalo que contiene las neuronas dopaminérgicas. La figura 3.2.a muestra esquemáticamente la región disectada. Luego, los mesencéfalos colectados en el mismo medio fueron llevados al flujo laminar para proceder con la disociación de los mismos, en condiciones de esterilidad.

La disociación de los mesencéfalos se realizó mediante trituración mecánica con una micropipeta P1000. Luego, se centrifugó a 450 g por 4 minutos. Luego, las células son resuspendidas en *Medio Completo "A"* (DMEM/F12, 5% HS, 2.5% FBS, 100 U/ml Penicilina - Estreptomicina y L-Glutamina 2 mM) y plaqueadas a una densidad de 250.000 células por pocillo de 16 mm (2-2.5x10^5 células/cm^2). En general se utilizó la relación de un embrión cada dos pocillos. Las placas empleadas se prepararon con un "*cover slip"* por pocillo (cubreobjetos circulares de diámetro menor al del pocillo), y con un *coating* de Polietilenimina (PEI). Para lo cual, cada pocillo con *cover slip* se incubó previamente durante la noche en presencia de 500 µl de una solución de polietilenimina 1 mg/ml en buffer borato 0.03 M (pH 8,3). El PEI es un compuesto policatiónico que permite que las neuronas se adhieran a las placas.

Para su mantenimiento en cultivo, cada dos días después del tercer día *in vitro* se les cambió parcialmente el medio de cultivo con *Medio completo "B"* (DMEM/F12, 5% HS,0.5% FBS,100 U/ml Penicilina – Estreptomicina y L- Glutamina 2 mM), que tiene la particularidad de estar reducido en FBS para detener el crecimiento de células gliales y enriquecer el crecimiento de neuronas.

Una vez terminados los tratamientos, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) 4% y se desarrolló una inmunomarcación de tirosina Hidroxilasa (TH), un marcador de neuromas dopaminérgicas, para determinar qué células resultaron TH positivas (TH+) (*ver sección 3.4*).

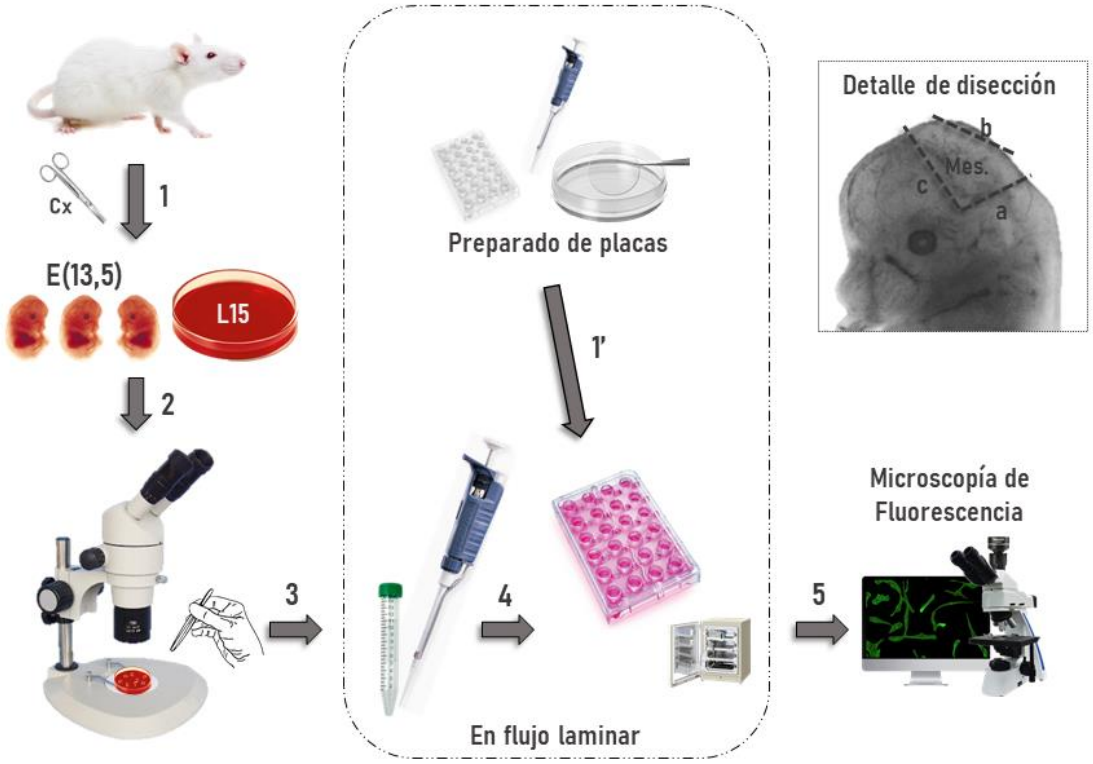

Figura 3.2.a: Cultivo primario de neuronas dopaminérgicas, diagrama de flujo de la técnica. (1) Al día 13,5 post cópula (post visualización de tapón seminal vaginal) los ratones preñados se sacrifican por desnucamiento y los embriones E(13,5) se extraen quirúrgicamente y se colectan en medio L15 para su inmediata disección. De cada hembra se obtienen aproximadamente 12 embriones. (2) los embriones colectados son disectados con la ayuda de pinzas de disección y lupa binocular. En la esquina superior derecha se detalla la disección del mesencéfalo (mes) ventral. Las letras "a, b, c" representan los cortes sucesivos en el procedimiento de disección. (3) Posteriormente, los cerebros medios en L15 se trituran mecánicamente bajo un flujo laminar. (4) Luego, se plaquean las células disgregadas en medio completo A y se incuban en cámara a 37°C con 5% de CO2 y 95% de aire común. (5) Posterior a los tratamientos experimentales las células se fijan con PFA 4%, y se incuban con distintos anticuerpos y DAPI. Luego los cubreobjetos son recuperados y montados con Mowiol. Los resultados experimentales son observados mediante microscopia de fluorescencia. (1') Preparado de placas mediante revestimiento con PEI.

3.3. Análisis por Western Blot de los niveles proteicos.

Al finalizar los tratamientos realizados sobre los cultivos de la línea SH-SY5Y, se realizó la lisis celular para estudiar los niveles proteicos o el grado de fosforilación de diferentes proteínas de interés. En primer lugar, se recuperaron las células tratadas en cada pocillo mediante trispsinización y se centrifugaron a 3000 rpm por 8 min. Al pellet obtenido se lo resuspendió en buffer de lisis frío (BL) (Tris HCL 50 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 0,1M; SDS 5 mM; EDTA 2 mM, pH 8) con el agregado de inhibidores de proteasas y fosfatasas 0,1 M (HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail EDTA-Free Cat no. 78441. Thermo Scientific®. EE.UU). Luego de agitar en frío para disolver el pellet, se centrifugó a 4°C, 10.000 rpm por 15

min. Se descartó el pellet (*debris* celular) y se conservó el sobrenadante obtenido, correspondiente al contenido celular. Las muestras obtenidas se conservaron a -20°C.

Previo al desarrollo del Western Blot (Wb), se realizó el dosaje de proteínas de cada muestra mediante el método de Bradford. Para este fin, en cada oportunidad se realizó la correspondiente curva de calibración con BSA (seroalbúmina bovina) en BL, por duplicado o triplicado. Para cuantificar las proteínas de las muestras, se tomó una alícuota de las mismas y se adicionó reactivo de Bradford. La lectura indirecta de la concentración proteica se realizó mediante la medición de absorbancia obtenida con un lector de placas multiwell (Microplate Reader DR-200Bs, Diatek®) a una longitud de onda de 595 nm. Dichos datos fueron convertidos mediante el uso de la Ley de Lambert Beer.

Dado que en las proteínas analizadas se encuentran en un rango de 70 - 40 kDa se armaron geles de poliacrilamida con 1mm de espesor y 12% de acrilamida/bisacrilamida. Estos estuvieron constituidos por dos fases: el *running* gel (Acrilamida 30 %, Tris-HCl 1,5M pH 8,8, dodecilsulfato de sodio (SDS) 10 %, persulfato de amonio (APS) 10 % y TEMED 1%) y el *stacking* gel (acrilamida 30 %; Tris-HCl 1 M pH 6,8, SDS 10 %, APS 10 % y TEMED 1%). En este último se colocó un peine para delimitar las calles en las que luego se sembraron las proteínas. Se dejó polimerizar cada gel por lo menos por 45min.

Para la corrida electroforética, 30 µg de proteínas por muestra se diluyeron *en buffer de siembra* (azul de bromofenol 0.01%, Tris 15 mM pH 6,8, glicerol 6.25 %, SDS 2,5 % y β-mercaptoetanol 10 %) y se crakearon a 95 °C por 10 min en baño termostático. Luego, se realizó un spin down y se sembraron las muestras en cada calle y en paralelo un marcador de peso molecular (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Full Range. cat no. RPN800E. Amersham®, Reino Unido).

Los geles armados se montaron dentro de la cuba de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra cel. cat n° 1658004 BioRad Laboratories inc., USA). La corrida se realizó en *buffer de corrida* (glicina 0,19 M, Tris-Base 0,4 M, SDS 10%), en condiciones refrigeradas. A voltaje constante y comenzando en 100 V se desarrolló un protocolo de corrida a voltajes crecientes, con un aumento de 10 V cada media hora hasta alcanzar los 160 V. La corrida se finalizó cuando se logró resolver satisfactoriamente a las proteínas en cuestión, con un tiempo aproximado de algo más de 3 horas (el marcador de peso molecular permitió seguir este punto).

Se desarrolló transferencia húmeda del gel a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (Nitrocellulose Membranes, 0,2 µm, cat n° 162-0112, Bio-Rad Laboratories inc., EE.UU). Para esto, se dispuso del *cassette* de transferencia (Mini Trans-Blot® Module cat no. 1703935. Bio-Rad Laboratories inc., EE.UU) siguiendo las indicaciones del fabricante, habiendo saturado previamente todos los componentes en *buffer de transferencia* (Tris Base 25 mM, glicina 1.92

M, metanol 20%), solución en la que luego se desarrolló la transferencia. Nuevamente se ensambló la cuba y se procedió a desarrollar la transferencia en condiciones refrigeradas y en agitación constante mediante un agitador electromagnético para evitar el sobrecalentamiento de los electrodos y para homogeneizar la solución durante toda la transferencia. La transferencia se realizó a 100 V por 50 min. Luego, las membranas fueron incubadas con solución de rojo Ponceau (*Ponceau* 0,2 % y tricloroacético 3%) entre 5 y 10 minutos para visualizar las proteínas y chequear la transferencia (Figura 3.3, izq.). Después, se lavó con agua destilada el colorante. Por otra parte, y con el mismo fin, los geles fueron teñidos con Azul de Coomasie (Coomassie Blue R250 (o Coomassie Blue G) 10%, metanol 50%, ac. Acético 10%) y diferenciados con solución desteñidora (metanol 40% y ácido acético 7%) (Figura 3.3, der.).

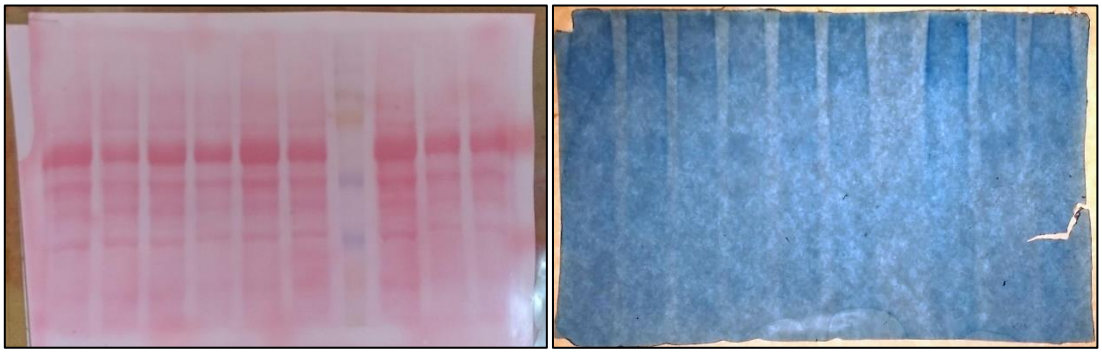

Figura 3.3: Fotografía representativa de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau (izq) y su correspondiente gel de acrilamida teñido con azul de Coomasie (Der). Ambas tinciones se desarrollan con el fin de chequear la correcta transferencia húmeda. En la calle 7 (de izq. a der.) puede apreciarse el marcador de peso molecular.

El bloqueo de sitios inespecíficos en las membranas, previo a la incubación con anticuerpos, se realizó con leche descremada 5% (Sancor®, Argentina) en TBS-T (Tris Base 0,5M, NaCl 0,07M, Tween-20 0,1 M, pH 7,6) por 1 hora a temperatura ambiente. En el caso de las proteínas fosforiladas se optó por bloquear con BSA 5 % en TBS-T. Esto se debe a que la leche contiene fosfatasas.

Se incubó *over night* a 4° C con anticuerpo primario en leche 0,5% o BSA 5 % en TBS-T. Luego, previo lavado con TBS-T, se incubó con anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano picante (HRP) en leche 0,5 % en TBS-T por 2 horas. Nuevamente, luego de su lavado en TBS-T, se reveló por quimioluminiscencia con solución ECL (Enzymatic chemiluminescence, Pierce Biotechnology, USA cat no. 32106), en el equipo Amersham Imager 600RGB (General Electric Healthcare life sciences®).

Para revelar en una misma sección de membrana dos proteínas de peso molecular similar se realizó un protocolo de *Pseudostripping* entre revelados. Dicho protocolo consistió en

incubar las membranas durante 90 minutos con una solución de H_2O_2 15 volúmenes en TBS a temperatura ambiente. El *pseudostripping* inactiva la peroxidasa del anticuerpo secundario previamente empleado, por lo cual este protocolo se empleó sólo en los casos en los que el anticuerpo secundario de la primera proteína es contra una especie diferente al anticuerpo secundario de una segunda proteína.

Luego, la cuantificación de las bandas obtenidas por Wb se realizó mediante el análisis de las imágenes obtenidas con el software AlphaEase®FC (FluorChem versión 4.1.0; Alpha inmunotech Corporation).

Lista de anticuerpos primarios (Ac1°) empleados:
- pAMPKα (Thr172) (Cell Signaling®, cat n°: 2535; dil: 1/2000).
- Actina: anti-β-actina (Sigma-Aldrich® cat no. A2066, RRID: AB_476693; dil: 1/2000).
- p-P70S6Kα (Thr 389) (Santa Cruz®, sc-11759-R; dil: 1/200).
- ERK1/2 (MAPK) (Cell Signaling®, cat n°: #9102; dil: 1/1000).
- pERK (pMAPK; Thr202/Tyr204) (Cell Signaling®, cat n°: #9106; dil: 1/500).
- EGR-1 (Santa Cruz®, sc-189; dil: 1/200)

Lista de anticuerpos secundarios (Ac2°) empleados:
- anti-conejo IgG (H + L) (Invitrogen®, cat no° A16035, dil: 1/2000) conjugado a HRP.
- anti-ratón IgG (H + L) ((Invitrogen®, cat no° A16017, dil: 1/2000) conjugados a HRP.

3.4. Análisis histológicos.

Para analizar los cultivos primarios se realizó un protocolo de inmunohistoquímica. Una vez concluidos los tratamientos experimentales, los cultivos fueron fijados con paraformaldehido 4% (PFA 4%) durante 15 minutos. Dado que al momento de la fijación cada pocillo de placa contenía un volumen de 500 µl de medio, se colocó un volumen equivalente de PFA 4% para que la fijación sea gradual y no produzca un estrés brusco sobre los cultivos. Luego de lavar con PBS-T (PBS 0,1 M - Tritón 0.1%), se incubó cada pocillo con un volumen de 250µl/pocillo de Ac 1° diluido en PBS 0,1M, durante toda la noche a 4°C y con las placas bien selladas para evitar deshidratación. Luego, previos lavados con PBS-T se incubó con las combinaciones requeridas de Ac 2° en conjunto con DAPI, a temperatura ambiente por una hora. Luego, se montaron en cubreobjetos con Mowiol 4-88 (Calbiochem®; Cat n° 475904) para su posterior análisis por microscopia de fluorescencia.

Ac1° empleados:
- TH (Pel Freez Biologicals®; P40101-0; dil: 1/1000)

Ac2° empleados:
- anti-conejo (IgG) conjugado a floróforo Alexa flúor 488 (Molecular Probes®; Cat n°: A-11034; dil: 1/1000).

Marcador nuclear:
- DAPI (Sigma®; D9542; 1/1000).

3.5. Análisis de datos y estadística.

El análisis de datos en cuanto a los niveles proteicos se desarrolló de la siguiente manera: se consideraron réplicas a los tratamientos desarrollados en placas distintas, cada una de las cuales contó con un control de células sin tratar y un tratamiento con metformina. Eventualmente, algunas muestras fueron sembradas por duplicado en las corridas de Wb. Las cuantificaciones de dichas bandas fueron promediadas entre sí para el posterior análisis, siempre que no sea evidente algún problema de incubación en alguna de ellas. Para determinar los niveles de pAMPK, se estableció la relación pAMPK/β-actina. Dichas relaciones fueron a su vez relativizadas a los niveles del control (células sin tratar) de cada set de muestras (replica experimental). En todas las membranas analizadas siempre hubo presente una banda del control correspondiente al mismo set experimental que las demás muestras.

Para el análisis estadístico de los niveles proteicos, se realizó un ANOVA de una vía. Los supuestos son chequeados utilizando los test de Shapiro-Willks y de Levene respectivamente. Las comparaciones posteriores se realizan mediante un test de Tukey, o de Dunnet. En todos los casos se consideró como valor límite de significancia $p < 0.05$. Por último, el análisis de datos se realizó con el software Graphpad Prism (GraphPad® Software, versión 8.0).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cambios moleculares inducidos por YM o CGA en SH-SY5Y.

Acorde al planteo experimental propuesto, resultó fundamental el desarrollo de cultivos celulares de la línea SH-SY5Y, homogéneos y que respeten los estándares experimentales de rutina (como el presentar un bajo número de muerte celular, y encontrarse libres de contaminaciones). En la figura 4.1.a puede apreciarse una micrografía representativa de los cultivos con que se trabajó en esta tesis.

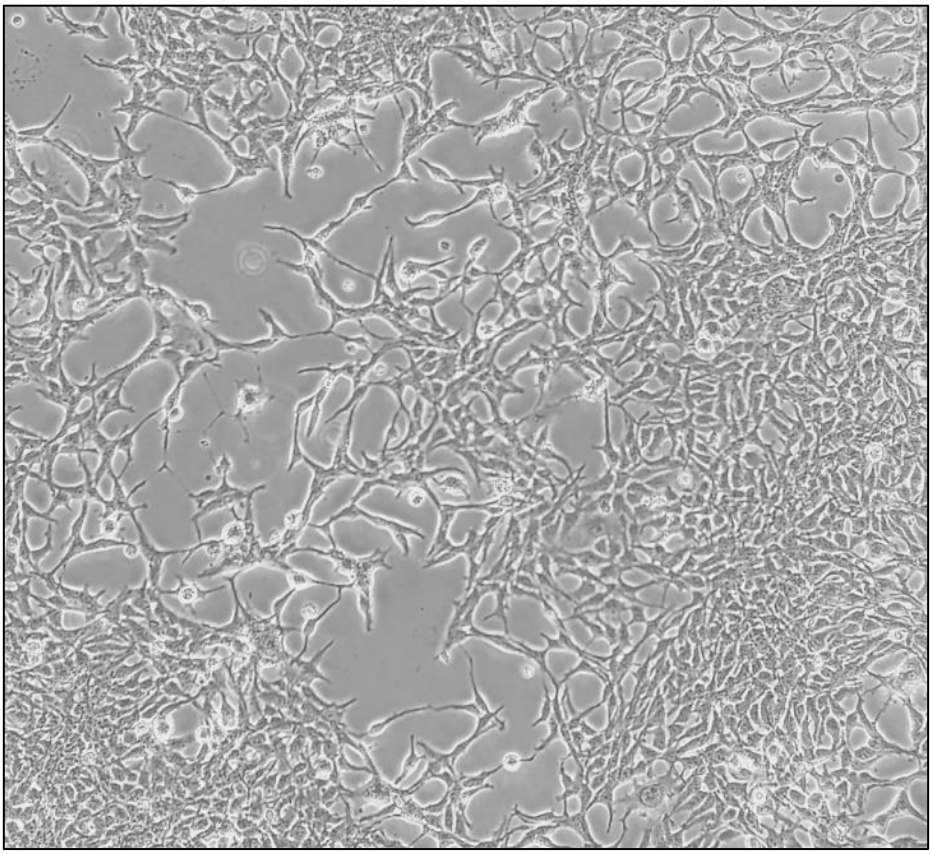

Figura 4.1.a: **Micrografía de Células SH-SY5Y indiferenciadas.** Las células tienden a crecer en grupos y pueden formar grupos de células redondeadas una encima de la otra. En los bordes del grupo, las células comienzan a extenderse con "neuritas" cortas. Imagen modificada digitalmente a partir de una micrografía a 40X.

Siguiendo nuestra hipótesis de que la YM, a través del CGA, activa AMPK, nuestro primer objetivo fue demostrar que en nuestras manos la línea celular SH-SY5Y regula (aumenta) la fosforilación de AMPK. Para ello, basándonos en datos de la literatura, escogimos la droga metformina, la cual es un activador de AMPK (Rena, Hardie & Pearson, 2017). En particular, en la línea celular SH-SY5Y se emplean con frecuencia concentraciones de metformina que oscilan entre los 0,5mM y los 10mM en el medio de cultivo, por un intervalo temporal de aproximadamente 30 minutos. Nosotros ideamos un diseño experimental donde se probaron 3

concentraciones de metformina[4]: 1, 5 y 10 mM, por 30 minutos. De esta forma, tal y como se observa en la figura 4.1.b (a y c), fue posible reproducir los efectos descriptos en el paradigma experimental empleado en esta tesis, habiendo observado una activación de AMPK dependiente de la dosis de metformina. En paralelo, con estas mismas muestras evaluamos los niveles de fosforilación de P70S6Kα, una proteína corriente debajo de AMPK y la cual -según la literatura- se encuentra regulada de manera negativa por AMPK (es decir, que un aumento de fosforilación de AMPK debería reducir la fosforilación de P70S6Kα, como se esquematizó en la figura 1.4a). En concordancia con este esquema regulatorio, encontramos una disminución en la fosforilación de P70S6Kα según aumenta la dosis de metformina (figura 4.1.b (b y c)). En este primer ensayo exploratorio agregamos YM, habiendo observado un leve aumento en la fosforilación de AMPK y no habiendo visto cambios en P70S6Kα.

Dado que el efecto de metformina como un control positivo de activación de AMPK está suficientemente validado, tomamos a éste como un experimento piloto, y concentramos los siguientes pasos experimentales en investigar el efecto de la YM.

Basados en esta prueba decidimos utilizar 5mM de metformina como control positivo en los experimentos siguientes. Además, observamos que a concentración de 10mM se modificaba visiblemente el aspecto del medio de cultivo de las células, probablemente por la cantidad de excipientes presente en la dilución.

Una vez puesto a punto el Wb y haber logrado ver cambios en la fosforilación de AMPK, se desarrollaron los experimentos para determinar dos temas claves en la futura experimentación con yerba mate en la línea celular SH-SY5Y: el tiempo de exposición (figura 4.1.c) y la concentración (figura 4.1.d) a los cuales observaríamos los efectos regulatorios más importantes.

Partiendo de la concentración de base de 1µl de extracto por cada 500 µl de medio (1X) empleada por Bernardi y colaboradores en un trabajo previo de nuestro grupo (Bernardi *et al.*, 2019), se buscó hallar el tiempo de exposición en que el efecto de la YM fuera máximo (figura 4.1.c). No fue posible resolver diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos experimentales (ANOVA de una vía, $p = 0{,}374$), y en consecuencia no fue posible discernir con criterio estadístico el punto para el cual el extracto ejerce un efecto máximo. De todas formas, de los datos pareciera desprenderse que en la ventana posterior a los 15 min y antes de las 4h el nivel fosforilación de AMPK por efecto de la YM alcanza el valor máximo. Como no se realizaron puntos intermedios entre 1h y 4h no fue posible encontrar el máximo de activación de AMPK que indicaría que a partir de allí la actividad de las fosfatasas (desfosforilación de

[4] Preparada de la forma explicitada en la sección "3.1.1. Tratamientos".

AMPK) supera a la de las quinasas (fosforilación de AMPK). Dada la dispersión de los datos y la falta de significancia estadística no se pueden obtener resultados concluyentes de estos experimentos. Sin embargo, algunas cosas en limpio podemos sacar de este experimento: en casi todas las réplicas experimentales a 30 min y 1h los niveles de fosforilación de AMPK superaron los del control, siendo consecuencia de la dispersión de los datos la falta de significancia estadística (al menos a los 30min). Esperamos que en futuros experimentos, cuando dispongamos del anticuerpo contra AMPK total, podamos reducir la variabilidad entre los experimentos y mejorar esta curva temporal del efecto de la YM agregando nuevos intervalos de tratamiento.

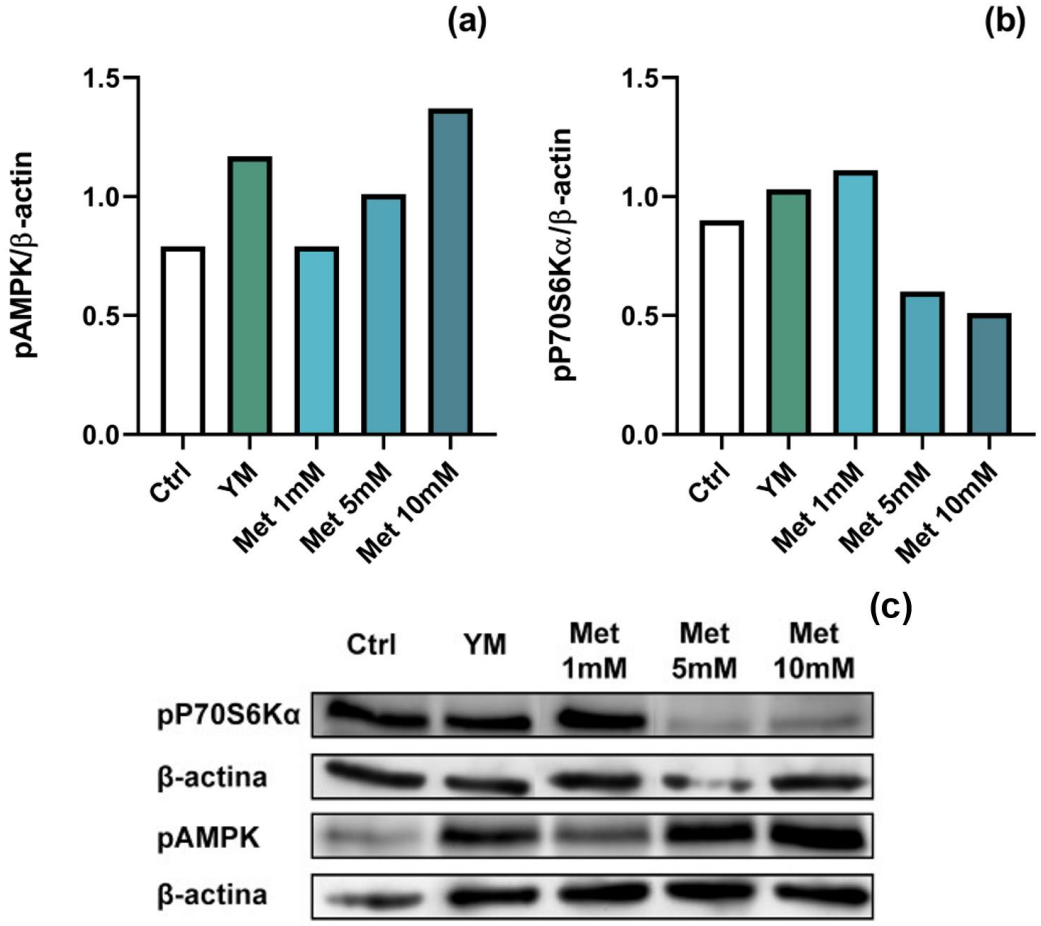

Figura 4.1.b: **Metformina como control positivo de fosforilación de AMPK**: puesta a punto experimental de un control positivo respecto de la activación de pAMPK. Adicionalmente se observó una disminución en los niveles de fosforilación de P70S6Kα. **(a)** Niveles de fosforilación de AMPK en función de la concentración de metformina. **(b)** Niveles de fosforilación de P70S6Kα en función de la concentración de metformina. **(c)** Inmunoblot contra los anticuerpos señalados, resultante de la corrida de Wb desarrollada. YM: extracto de yerba mate; Met: metformina; Ctrl: células sin tratar. Los niveles de fosforilación de P70S6Kα y AMPK se relativizaron a la marca de β-actina (n=1).

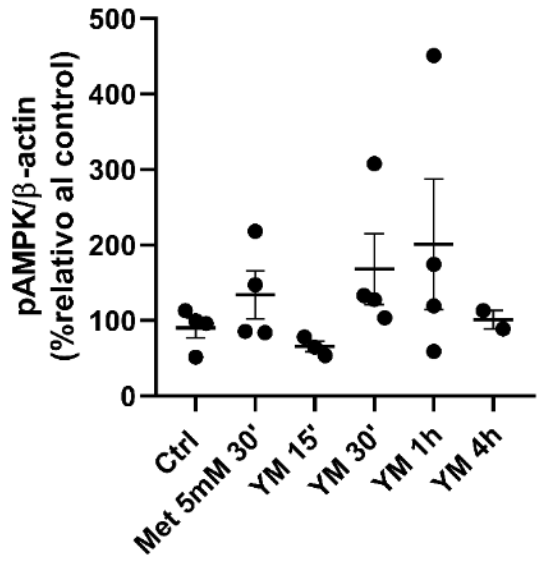

Figura 4.1.c: **Curva temporal de exposición a YM:** niveles de fosforilación de AMPK en función del tiempo de exposición al extracto de YM disuelto en medio de cultivo, relativos a los niveles en células sin exponer (control). Los cultivos fueron lisados en simultáneo. En todos los casos la concentración de extracto empleada fue de 1 µl de extracto cada 500 µl de medio de cultivo (1X). Met: como control de fosforilación de AMPK se empleó metformina 5mM. Ctrl: Células sin tratar. Gráfico de dispersión con media y ES, donde cada punto denota una réplica experimental. Los niveles de fosforilación de AMPK se relativizaron a la marca de β-actina. Mediante el análisis estadístico con un ANOVA de una vía (p=0,374) no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

Respecto al control de fosforilación de AMPK con metformina, se obtuvieron resultados dispersos. Si bien en dos experimentos la activación resulto efectiva, otros dos no respondieron en la forma esperada. Es interesante agregar que estas dos réplicas en particular presentaron valores bajos en general, con escasas diferencias entre tratamientos, de hecho, corresponden a los valores más bajos de 30min y 1h con YM. Dichos datos no fueron excluidos por falta de un criterio estadístico certero que lo permitiese con un tamaño muestral tan reducido, pero marca la pauta para tener en consideración en futuras réplicas experimentales.

Dado que en células de mamíferos 30 min es un intervalo de tiempo corto como para que se produzca la inducción de la expresión génica y en consecuencia en nuestro caso una acumulación significativa de AMPK total por síntesis de *novo,* el aumento en la fosforilación de AMPK registrado luego de 30 minutos de estimulación con YM (o 5mM de Met) es más probable que se deba a la modificación postraduccional (por fosforilación) de AMPK ya presente en las células y no a una mayor cantidad de AMPK total disponible y susceptible a ser fosforilada por quinasas que fosforilen de forma basal a AMPK. Es decir que a tiempos cortos sospechamos que la YM puede tener un efecto rápido sobre AMPK induciendo su fosforilación y no podemos descartar que a tiempos más largos la YM pueda tener también efectos genómicos. Es por ello que, a pesar de la falta de significancia estadística en la curva temporal, para la construcción de

una curva de concentración relativa (figura 4.1.d) se escogió el intervalo de 30 min de exposición a YM en lugar de 1h.

Siguiendo el planteo experimental de la figura 3.1.1.b, los cultivos fueron expuestos a distintas concentraciones, relativas a la concentración de trabajo 1X antes mencionada. La YM en concentraciones relativas de 1/10 y 1/1 (o 1X) aumentó significativamente los niveles de pAMPK/β-actina respecto del control. Además, estas concentraciones también presentaron diferencias significativas respecto a la menor concentración 1/1000, que al estar tan diluida se comportaría como el control sin YM. A pesar de esto, los valores correspondientes a la concentración 2X de extracto parecieran apuntar también hacia un aumento respecto del control, pero dada la dispersión de los datos y lo acotado de la muestra (solo dos datos para esta concentración) no fue posible resolver estadísticamente el aumento. Por otra parte, y como ya se anticipó en Materiales y Métodos, como consecuencia de un error experimental, en lugar de la concentración 5mM de metformina se empleó la de 1mM que resultó en niveles de fosforilación de AMPK similares al grupo control y, a su vez, similares al obtenido en la puesta a punto (figura 4.1.b.a).

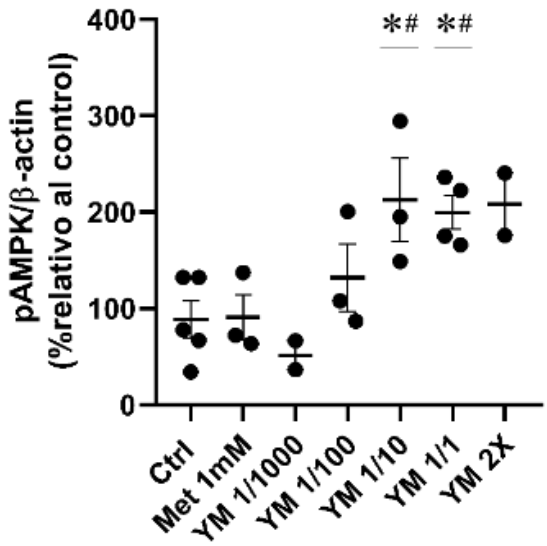

Figura 4.1.d: **Curva de concentración relativa de YM:** niveles de fosforilación de AMPK en función de la concentración de extracto de yerba mate en el medio de cultivo, relativos a los niveles en células sin tratar (control). Los cultivos fueron expuestos en todos los casos a 30 min de tratamiento. 1/1 refiere a 1 µl de extracto cada 500 µl de medio de cultivo, 2X al doble, y las demás relaciones a distintas diluciones. Met: como control de fosforilación de AMPK se empleó metformina 1mM. Ctrl: Células sin tratar. Gráfico de dispersión con media y ES, donde cada punto denota una réplica experimental. Los niveles de fosforilación de AMPK se relativizaron a la marca de β-actina. ANOVA de una vía ($p = 0,0061$) y test de Tukey. * $p < 0,05$ vs el control y # $p < 0,05$ vs la dilución 1/1000.

De los resultados obtenidos, pareciera observarse una tendencia hacia la saturación del efecto de la YM sobre los cultivos, si bien, en sentido estricto es preciso aumentar el número de

réplicas experimentales para disminuir la dispersión de los datos y obtener una conclusión más robusta.

Por otra parte, para comprender cuánto del efecto de la YM sobre la fosforilación de AMPK se debe al CGA, se sometió a los cultivos celulares a una concentración de CGA equivalente a la que se encuentra presente en el extracto. Se llamó a esta concentración 1X y, adicionalmente, se utilizó el doble (2X) y la décima parte de la misma (1/10). El protocolo experimental fue similar al de la curva de concentración, siendo de una exposición del compuesto durante 30 min. Los resultados además de compararse con el control (sin tratar) se compararon en paralelo con el efecto de la YM (1X) (figura 4.1.e).

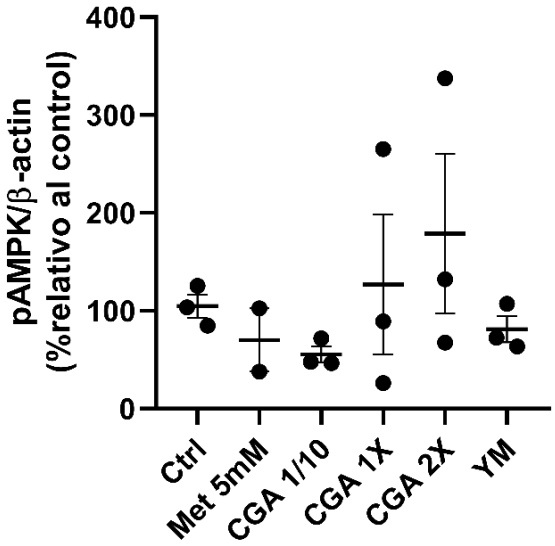

Figura 4.1.e: **Efecto del CGA:** niveles de fosforilación de AMPK en función de la concentración de CGA. Valores relativizados a los niveles en células sin tratar (control). Los cultivos fueron expuestos al tratamiento correspondiente por 30 min. 1X refiere a la concentración de CGA equivalente a la contenida en el extracto de YM, a partir de datos obtenidos por HPLC (1mM). YM: exposición a extracto de yerba mate en concentración 1X. Met: como control de fosforilación de AMPK se empleó metformina 5mM. Ctrl: Células sin tratar. Gráfico de dispersión con media y ES, donde cada punto denota una réplica experimental. Los niveles de fosforilación de AMPK se relativizaron a la marca de β-actina. ANOVA de una vía ($p = 0,4918$). No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

Si bien no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos (ANOVA de una vía, $p = 0,4918$), son varios los puntos que vale la pena discutir. Por un lado, aun habiéndose utilizado 5mM de metformina no se logró reproducir el incremento observado en la fosforilación de AMPK en la puesta a punto (27,8%) ni el obtenido para algunas de las réplicas en la curva temporal (en 2 de 4 réplicas la metformina aumentó pAMPK un 15,4% y un 86,1%). Una posible explicación podría girar en torno a la dilución de metformina preparada para

trabajar en cultivo. La misma se realizó una única vez y fue conservada a 4°C. Luego empleada temporalmente en el mismo orden que aquí se exponen los resultados, es decir, primero usada en la curva temporal, luego en la de concentración relativa, y por último en esta serie experimentos. Quizás, la pérdida total de efecto en la misma podría estar indicando que la solución de metformina debe prepararse en el momento en el que es utilizada porque podría perder eficacia en solución. Sorpresivamente, tampoco pudo reproducirse el efecto de la yerba mate en esta serie de experimentos. Por último, en lo que respecta al efecto del CGA *per se*, sólo se observó activación en una de las réplicas de CGA 1X y en dos de CGA 2X. Los dos puntos más altos con CGA 1X y CGA 2X casualmente corresponden a la misma replica experimental. De todos modos, aquí la dispersión de datos es considerablemente elevada y esto socava cualquier conclusión que pudiera desprenderse de este experimento.

De los resultados obtenidos respecto a los cambios moleculares inducidos por YM o por el CGA varios son los puntos que merecen ser discutidos y revisados. Primero, los niveles de fosforilación proteica, en sentido estricto, solo pueden ser determinados relativizándolos al nivel de proteína total (en este caso, pAMPK/AMPK). En esta tesis, esto no ha sido posible, y, teniendo presente esta limitación, se realizaron las cuantificaciones relativizando a los niveles de β-actina (pAMPK/β-actina). Esta alternativa parte del supuesto de que los niveles de expresión proteica de AMPK no varían entre tratamientos, a pesar de que β-actina es un control de carga sumamente difundido y utilizado en análisis por Wb. Más allá de las dificultades atravesadas, estos resultados son el puntapié inicial para los experimentos que realizaremos en el futuro para los que esperamos cuantificar la relación pAMPK/AMPK y confirmar este análisis. Segundo, los cultivos desarrollados con la línea celular SH-SY5Y en esta tesis fueron realizados con células de menos de 40 pasajes. Si bien, son un número de pasajes considerablemente alto, aquí se considera que, para el tipo de análisis buscado, estos valores son aceptables.

El uso de un control de fosforilación de AMPK robusto y confiable es fundamental en un planteo experimental como el aquí propuesto. Es por esto, que es preciso ajustar detalles experimentales inherentes a la preparación, conservación y uso de la metformina, o incluso, buscar otra alternativa para futuros experimentos.

4.2. Validación en cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas.

En una primera instancia fue preciso poner a punto en nuestras manos y en el nuevo laboratorio, el cultivo primario como técnica en sí misma. Tal y como se desarrolló en la sección correspondiente (*ver sección 3.2*) esta técnica consta de una serie de instancias críticas para la sobrevida neuronal. A diferencia de los cultivos de líneas celulares, como por ejemplo el de la línea SH-SHSY, los cultivos primarios y en particular los desarrollados en este modelo son sumamente susceptibles a la manipulación experimental y más aún a las condiciones de cultivo. Es por esto que desafortunadamente, a pesar de reiterados intentos (>10), no fue posible lograr el objetivo específico propuesto para este tipo de enfoque experimental. Las dificultades no fueron pocas, a pesar de la experiencia con que cuenta nuestro grupo de trabajo en el área. Con el paso de los intentos fuimos reduciendo variables que potencialmente afectan el cultivo hasta que logramos obtener cultivos aceptables. Lamentablemente el tiempo no nos alcanzó para poder realizar los experimentos planeados.

Hemos logrado identificar un "factor cuarto de cultivo", ya que llevando los cultivos a otro instituto logramos que crezcan razonablemente. Al momento de la publicación de esta tesis seguimos trabajando para solucionar los problemas del cuarto de cultivo de nuestro laboratorio, el cual creemos, tiene que ver con la poca ventilación que produce la acumulación de elementos neurotóxicos en el aire (alcoholes, lavandina, desinfectantes).

En particular, estas dificultades se reflejaron en cultivos que no se desarrollaron de la manera esperada, y con una muerte celular prematura que impidió desarrollar los tratamientos planteados de manera exitosa.

Sin embargo, a pesar de lo antes dicho, en la figura 4.2.a puede apreciarse una micrografía de uno de los últimos cultivos desarrollado (a la fecha) considerado aceptable para los estándares experimentales apuntados y que, por limitaciones de tiempo, no fue posible desarrollar tratamientos experimentales. Dicho cultivo fue realizado en nuestro laboratorio, pero se incubó en un cuarto de cultivo de otro instituto en inmediaciones de la Facultad equipado con sistema de ventilación, hecho que consideramos clave por evitar la acumulación de gases nocivos para las neuronas en cultivo.

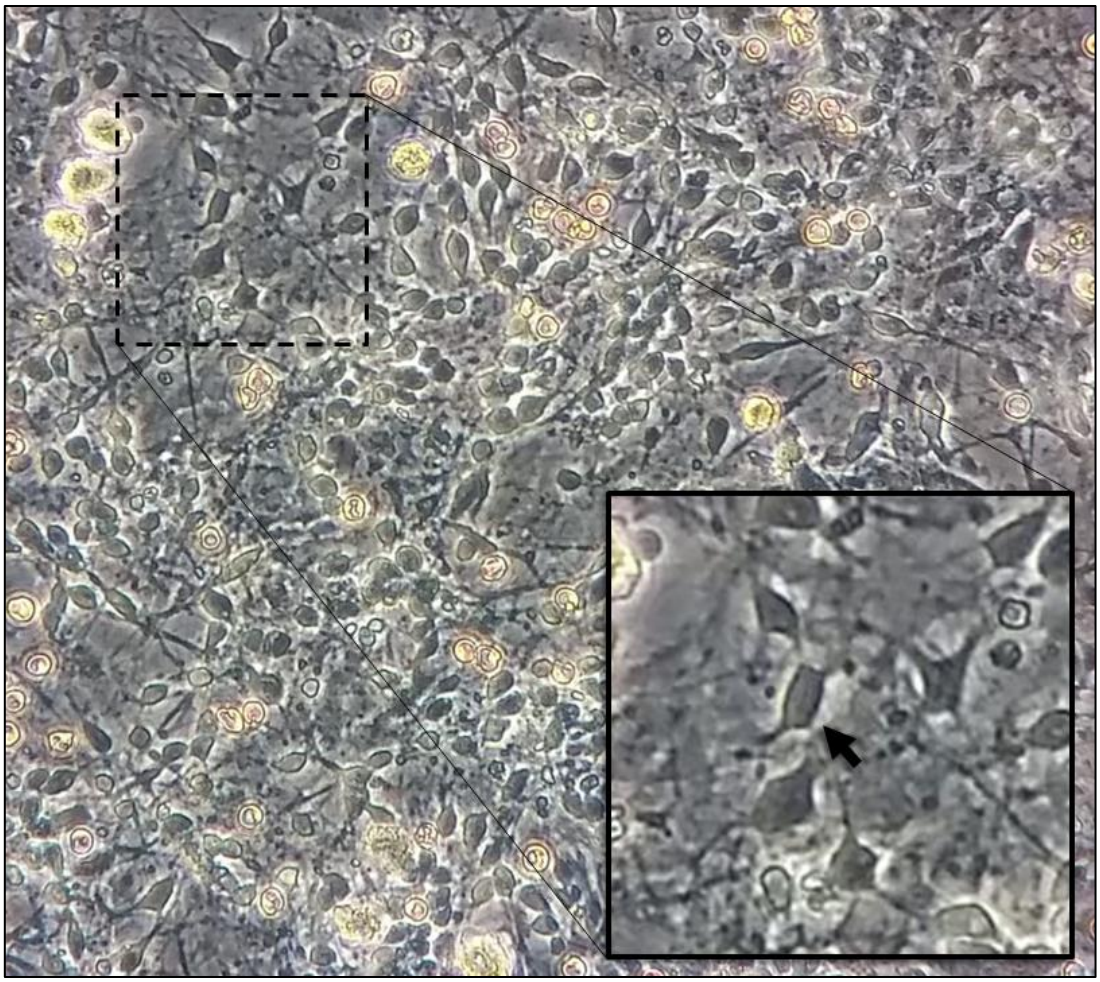

Figura 4.2.a: **Cultivo primario de cerebro medio de ratón (E13,5):** aspecto general del cultivo a día 1 *in vitro*. Las células, entre ellas neuronas y glía, tienden a adherirse al fondo de la placa (sobre el *cover slip*) gracias al pretratamiento de la misma con PEI. El recuadro discontinuo destaca la zona ampliada donde puede observarse un conjunto de neuronas. La flecha destaca uno de los cuerpos neuronales. Pueden observarse también eritrocitos, remanentes de la disgregación del tejido. En este tipo de cultivos, las neuronas dopaminérgicas suponen un 5% y mueren espontáneamente en un lapso de dos semanas. Imagen modificada digitalmente a partir de una micrografía a 40X.

En la figura 4.2.b puede apreciarse una inmunodetección contra TH y su respectiva marca de DAPI. Aquí, TH se empleó como marcador específico de neuronas dopaminérgicas, lo cual, hubiese permitido desarrollar el recuento del número de neuronas dopaminérgicas bajo las diferentes condiciones experimentales. Se esperaba poder estudiar los cambios previamente analizados por Wb, poniendo a punto la inmunodetección fluorescente doble de TH con p-AMPK, e incluso de TH con p-P70S6Kα, para en última instancia, cuantificar la marca de dichos anticuerpos.

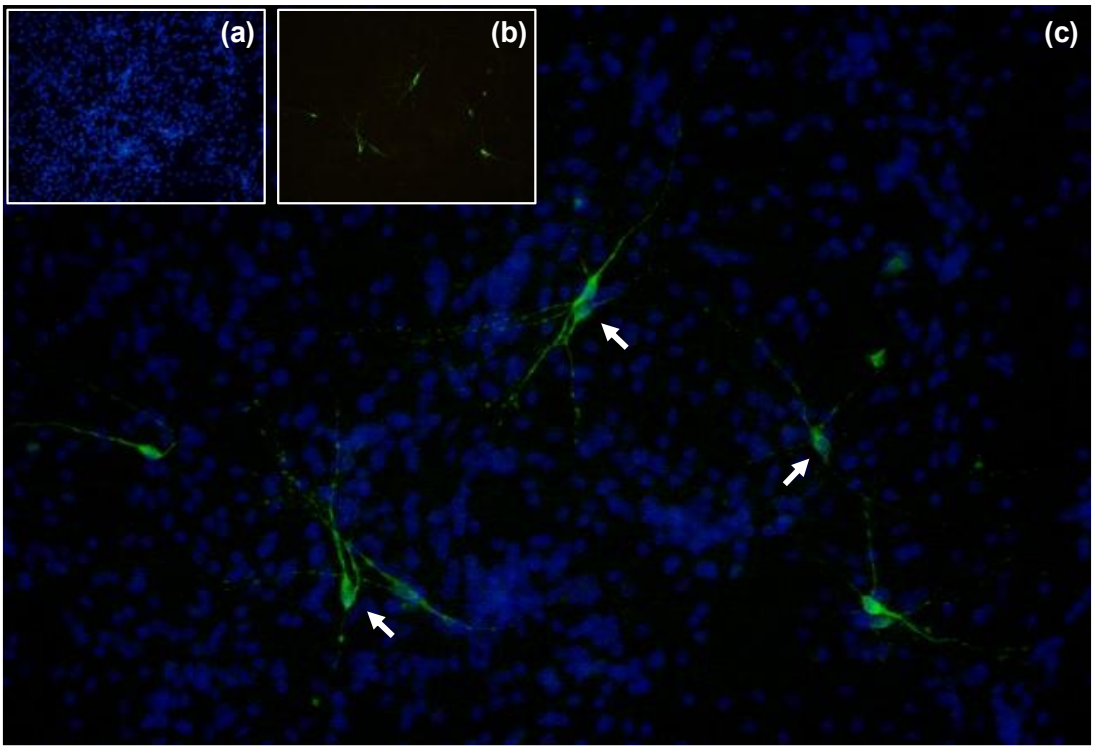

Figura 4.2.b: **Neuronas dopaminérgicas en cultivo primario**: (a) DAPI, (b) inmunodetección citológica de tirosina hidroxilasa (TH) y composición de imágenes (c). Las flechas destacan los somas de neuronas dopaminérgicas. Imágenes de un cultivo no tratado. Se esperaba que la inmunomarcación contra TH y la tinción con DAPI eventualmente permitiesen desarrollar el recuento del número de neuronas dopaminérgicas bajo las diferentes condiciones experimentales. Imagen modificada digitalmente a partir de una micrografía por microscopía de epifluorescencia a 40X.

A pesar de no haber logrado realizar los experimentos propuestos, la puesta a punto de este paradigma experimental fue un aprendizaje muy valioso y representó un avance muy importante en mi formación personal como también en el desarrollo de esta línea experimental. Haber ido sorteando todos los obstáculos con que nos enfrentamos nos generó una gran frustración inicial, pero me permitió aprender respecto a los pormenores de los cultivos primarios, y sobre todo, practicar y perfeccionar una de las etapas más complejas, que es la disección del mesencéfalo a partir de embriones de 13,5 días de gestación. Como resultado de esta etapa experimental puedo decir que logré realizar cultivos primarios mesencefálicos, que presentan neuronas dopaminérgicas, y que sobrevivieron durante 8 días (el tiempo máximo que los dejamos).

La siguiente etapa, incluirá terminar de sortear las dificultades de infraestructura, pero ya sabiendo que -logrado esto- somos capaces de avanzar hacia las opciones experimentales.

4.3. Futuras aproximaciones experimentales.

Como toda instancia exploratoria, este trabajo tuvo un alto contenido de puesta a punto y representa la instancia inicial a la aproximación experimental pretendida. Los resultados que de esta tesis se desprendan permitirán dirigir esfuerzos y recursos en futuras aproximaciones experimentales. Estamos convencidos de que, al replicar los diseños experimentales aquí descriptos, con las mejoras y modificaciones que fuimos discutiendo, como el uso de pAMPK/AMPK, nos permitirá resolver con mayor exactitud y precisión la hipótesis de esta Tesis de Licenciatura.

Casi en simultáneo con los experimentos antes mencionados, buscamos también evaluar otros elementos presentes en vías de señalización clave en un paradigma de neuroprotección. Logramos poner apunto los Wb para cuantificar niveles de EGR-1 en relación a la marca de β-actina (figura 4.3.a, a y b), y los niveles de fosforilación de pERK en relación a ERK total (figura 4.3.a, c y d).

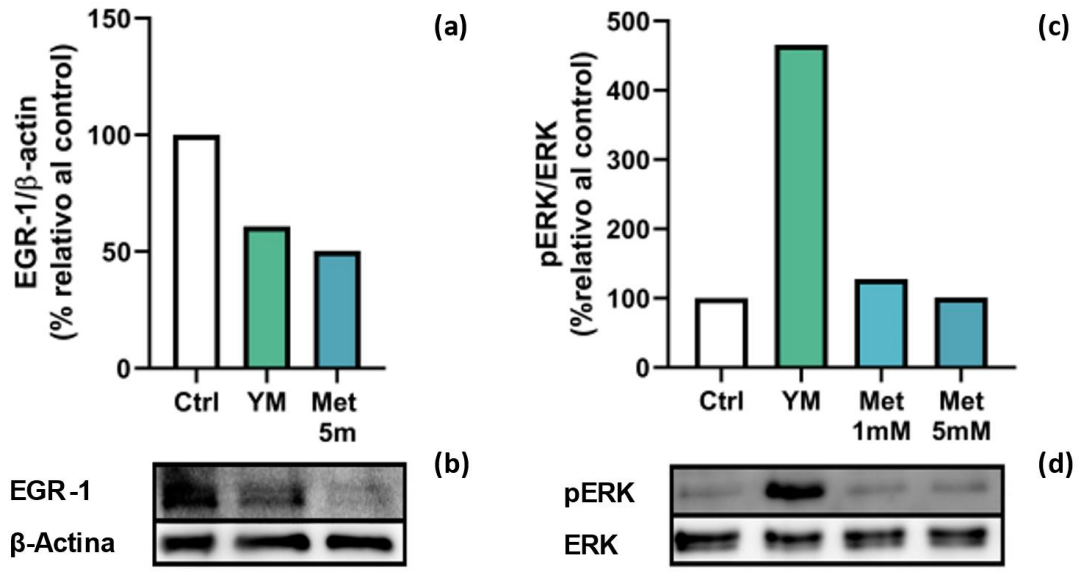

Figura 4.3.a: **Niveles de EGR-1 y ERK:** puesta a punto experimental de otros elementos a cuantificar en un paradigma de neuroprotección. **(a)** Niveles de EGR-1 en relación a la marca de β-Actina y **(b)** su respectivo inmnunoblot correspondiente. **(c)** Niveles de fosforilación de pERK (pERK/ERK) y **(d)** su inmunoblot correspondiente. En todos los casos las células fueron tratadas durante 30min. Met: metformina; Ctrl: células sin tratar (n=1).

Como ha sido mencionado, la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc es una de las características de la enfermedad de Parkinson (EP). Se ha propuesto que la neuroinflamación contribuye a la naturaleza progresiva de la enfermedad (Hirsch and Hunot,

2009). Se ha demostrado que EGR-1[5] (por sus siglas en inglés, *Early Growth Response-1*), un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo, tiene un papel crucial tanto en la muerte neuronal como en la respuesta inflamatoria (Yu *et al.*, 2018). Si bien ninguna conclusión puede desprenderse de un experimento con una única réplica, en la figura 4.3.a (a y b) puede observarse una disminución en sus niveles causados tanto por la exposición a YM como a metformina.

Las vías de MAPK/ERK o vía MAPK (por sus siglas en inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) es una vía de transducción de señales de células eucariotas que se sitúa corriente abajo de los receptores tirosín quinasas, así como la mayoría de receptores para citocina. La vía incluye muchas proteínas, incluidas ERK (por sus siglas en inglés, *Extracellular Signal-Regulated Kinases*). Cuando ERK esta activa (fosforilada) se transfiere al núcleo y fosforila elementos clave involucrados en la regulación de una gran variedad de procesos que incluyen la adhesión celular, progresión del ciclo celular, migración, diferenciación, proliferación, transcripción, supervivencia celular y apoptosis (Roskoski, 2012). En la figura 4.3.a (c y d) se observa un aumento en los niveles de fosforilación de ERK como consecuencia del tratamiento con YM, hecho que fue no acompañado por metformina en ninguna de las dos concentraciones empleadas. Si bien nuevamente, por tratarse de un experimento único no pueden esbozarse conclusiones contundentes, este resultado permitiría especular que la YM podría ejercer un efecto adicional por vías alternativas a la activación de AMPK no inducibles por metformina.

Por último, próximamente estaremos poniendo a punto la transfección de cultivos SH-SY5Y con un RNA de interferencia contra AMPK. Nuestro objetivo, será el de silenciar específicamente la expresión de este componente y comparar niveles proteicos frente a la exposición al extracto de YM (figura 4.3.b).

[5] también llamado NGFI-A, Krox24 o zif268.

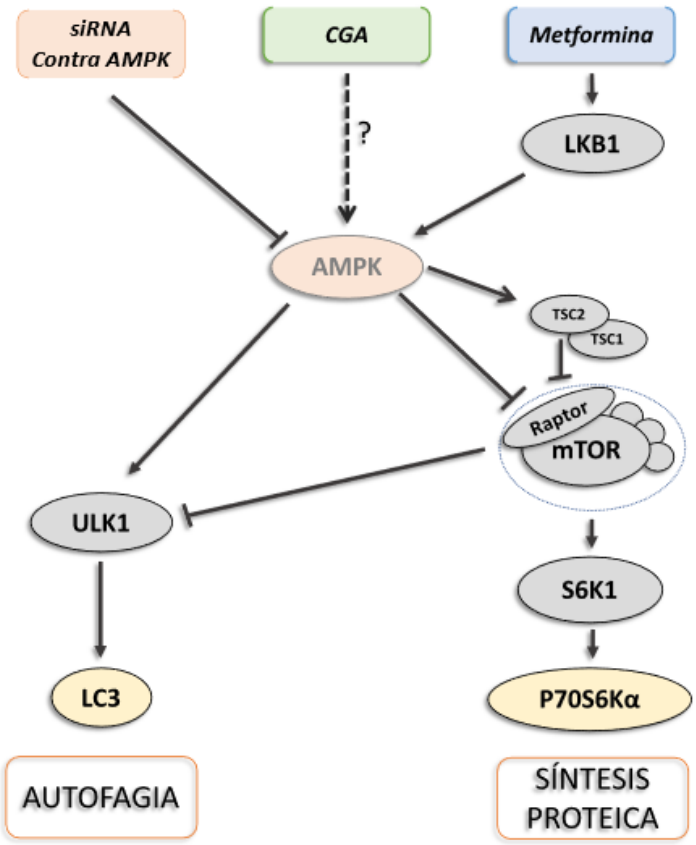

Figura 4.3.b: Futuras aproximaciones experimentales. Por medio de la transfección de cultivos de SH-SY5Y, se pretende silenciar la expresión de AMPK. En consecuencia, repitiendo el planteo experimental propuesto con YM y CGA, se evaluará la variación en los niveles proteicos de elementos clave en la vía, como ser los niveles de fosforilación de AMPK, evaluar autofagia midiendo LC3B (que ya hemos empezado a poner a punto) y evaluar activación de la mTORC midiendo el nivel de fosforilación de P70S6Kα.

5. CONCLUSIÓN

En el marco de un paradigma patológico complejo y progresivo, como es la enfermedad de Parkinson, la posibilidad de encontrar mecanismos de neuroprotección, que puedan ser blanco de futuras intervenciones terapéuticas, es fundamental para ralentizar el avance de la patología.

La yerba mate es un alimento nutraceútico (Heck and de Mejia, 2007), que desde tiempos remotos se le atribuyen propiedades medicinales aunque carece de validación científica. Esta tesis se enmarca dentro de una serie de investigaciones tendientes a darle fundamento científico a efectos biológicos asociados con la yerba mate.

La información que finalmente emerja de esta línea experimental, y de la cual esta Tesis generó las etapas primordiales, nos permitirá aportar valor agregado a un producto nacional clave, como lo es la yerba mate, del cual nuestro país es el principal productor y exportador. A su vez, el consumo de yerba mate aumenta paulatinamente en el mercado mundial, ya no por la relación nostálgica de los emigrantes argentinos, sino porque se inserta como un alimento con propiedades medicinales (Fuente: INYM).

La vía de señalización de AMPK tuvo un inicio temprano en la evolución de las células eucariotas, cuando parece haber estado involucrada en la respuesta a la escasez de glucosa y quizás también en el monitoreo de la producción de las mitocondrias recién adquiridas (Hardie, 2014). Es probable que este sistema se haya conservado en mamíferos fundamentalmente por su rol en el monitoreo de las proporciones celulares de AMP: ATP y ADP: ATP y equilibrar las tasas de catabolismo y consumo de ATP, mantenido así, la homeostasis energética a un nivel celular autónomo. Además, ha sido demostrado que AMPK promueve un proceso celular fundamental, como ser la autofagia (Wang et al., 2001; Egan et al., 2011; Hardie, 2014). AMPK es activado por dos fármacos de uso clínico ampliamente utilizados, metformina y aspirina, y también por muchos productos naturales de plantas que se derivan de medicamentos tradicionales o se promueven como "nutracéuticos" (Hawley et al., 2012; Hardie, 2014). Actualmente, la lista de productos naturales (o nutraceúticos) de herbarios medicinales tradicionales que han sido reportados como activadores de AMPK en células intactas o *in vivo* haciende a más de 50. Algunos de estos compuestos, como el resveratrol presente en el vino tinto, el galato de epigalocatequina del té verde y los ginsenósidos del *Panax ginseng*, se promocionan como "nutracéuticos", mientras que muchos otros se derivan de las hierbas utilizadas en las medicinas asiáticas tradicionales. Aunque algunos pueden clasificarse como polifenoles, sus estructuras son muy variadas, y un enigma ha sido cómo tantos compuestos de tal estructura variable podrían activar AMPK, una molécula con un número limitado de sitios de

unión para moléculas pequeñas. Se ha postulado que las mitocondrias serían el objetivo directo de muchos de ellos.

Varias enfermedades se han relacionado con una disfunción de AMPK. Dado que esta quinasa está involucrada en múltiples vías de señalización, su desregulación está asociada con una gran cantidad de patologías, por lo que el enfoque actual radica en encontrar activadores de AMPK. Las alteraciones en la señalización de AMPK disminuyen la biogénesis mitocondrial, aumentan el estrés celular e inducen inflamación, que son eventos típicos del proceso de envejecimiento y se han asociado a varios procesos patológicos. De acuerdo con esto, hoy en día se presta cada vez más atención a la posible capacidad preventiva de los compuestos nutracéuticos como un factor adicional para reducir la aparición de enfermedades mediante la modulación de la vía AMPK. Si bien no ha sido demostrado que ningún tratamiento desacelere o detenga la progresión de la EP, existe una creciente evidencia en modelos preclínicos de la EP de que la activación de AMPK puede tener amplios efectos neuroprotectores (Curry *et al.*, 2018). Como antes ha sido señalado, varios factores neuropatológicos parecen particularmente relevantes para el desarrollo y la progresión de la EP. Estos factores incluyen: disfunción mitocondrial que puede conducir a falla bioenergética y aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS), falla en el sistema de proteasomas y la acumulación de agregados de α-Syn y neuroinflamación. Varios enfoques de tratamiento experimental para la EP han tratado de abordar estos factores, a menudo de forma individual, pero los enfoques que los dirigen colectivamente pueden ser más eficaces. Cada uno de estos factores está regulado en cierta medida por AMPK. Además, la señalización de AMPK disminuye con la edad, y aumentar su actividad se asocia con una vida útil prolongada en los organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* (Salminen and Kaarniranta, 2012).

En neuronas, el activador dominante de AMPK posiblemente sea CaMKK2 (por sus siglas en inglés, *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*), quinasa activada por el aumento del calcio intracelular (Hawley *et al.*, 2005). El Calcio intracelular se incrementa como un segundo mensajero mediante la liberación de las reservas intracelulares y a través de la entrada mediada por canales iónicos desde el espacio extracelular en respuesta a una amplia variedad de estímulos. A través de esta cascada de señalización, la actividad de AMPK puede ser modulada tanto por la estimulación hormonal, como por la actividad neuronal (Hawley *et al.*, 2005; Marín-Aguilar *et al.*, 2017). Esto sumado a, como antes ha sido mencionado, que las neuronas dopaminérgicas de la SNpc presentan un fenotipo fisiológico, caracterizado por una elevada demanda energética, como consecuencia del mantenimiento de los gradientes iónicos electroquímicos necesarios para la excitabilidad neuronal, y en particular en lo que respecta a la homeostasis del Calcio, y que dicha carga metabólica contribuiría en ponerlas en una situación

de vulnerabilidad fisiológica (James Surmeier *et al.*, 2012), no es descabellado pensar que el Calcio regule también en estas neuronas a AMPK vía CaMKK2.

Si bien no está claro si la activación de AMPK utilizando los enfoques disponibles se traducirá en una estrategia de tratamiento viable para la EP (Arbeláez-Quintero and Palacios, 2017), en varios modelos experimentales, incluidos roedores, moscas y células cultivadas, la activación de AMPK puede producir una neuroprotección significativa. El aumento de la actividad de AMPK a través de su sobreexpresión mediante transfección en células SH-SY5Y disminuyó la pérdida celular inducida por MPP+ (el metabolito activo de MPTP), mientras que disminuir la actividad de AMPK con el compuesto C (inhibidor no especifico de AMPK) o induciendo la expresión de la forma negativa dominante de AMPK (AMPK-DN), repercutió en una pérdida celular exacerbada (Choi, Park and Jeong, 2010).

Los resultados obtenidos al momento de la publicación de esta Tesis de licenciatura son apenas primordiales como para poder afirmar con rigor científico el mecanismo neuronal disparado por la exposición a YM. Sin embargo, los resultados que obtuvimos en estos meses de trabajo, y a pesar de las distintas limitaciones y contratiempos experimentales, son sumamente alentadores y nos permitieron observar un efecto claro y reproducible sobre los niveles de fosforilación de AMPK, indicador de activación de dicha proteína de señalización.

Todos los experimentos de esta tesis fueron relativizando el valor de pAMPK con β-actina, pero el diseño experimental que pretendemos es hacerlo normalizando a AMPK total. Lamentablemente, nos fue imposible contar con el anticuerpo por cuestiones coyunturales de nuestro país. Somos conscientes de que varios son los puntos que deben mejorarse a futuro, contar con los insumos necesarios (anticuerpos, metformina con mayor grado de pureza) y poder realizar la cantidad de réplicas suficientes para reducir la dispersión en los resultados y consolidarlos de manera robusta y confiable. A su vez, es imperioso poder validar estos resultados en modelos más complejos como pueden ser los cultivos primarios de neuronas dopaminérgicas, o -mejor aún- en modelos animales de la EP bajo tratamiento con YM.

Realizar esta Tesis de Licenciatura fue un desafío para todos, ya que no se hizo sobre un proyecto marchando, sino que fue el inicio de una línea experimental novedosa. Mas aún, en un instituto nuevo y luego de una mudanza de laboratorio. Como toda instancia exploratoria, este trabajo ha demandado una considerable cantidad de tiempo y esfuerzo en la puesta a punto de los paradigmas experimentales planteados. No solo en lo inherente a los modelos en sí, sino también en la capacitación personal de quien escribe esta tesis. Buena parte de las dispersiones en los datos pueden y deben ser explicadas en parte al error procedimental que conlleva aprender una técnica nueva. Como trabajo final de licenciatura, no han sido pocas las

enseñanzas que me ha dejado el desarrollo de esta tesis, siendo, a mi consideración, una de las más importantes, aprender de nuestros errores. Atender el detalle que cada técnica requiere, para poder dar el siguiente paso con confianza. Buscar el punto clave que puede estar perjudicando un experimento. En definitiva, desarrollar un criterio crítico.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arbeláez-Quintero, I. and Palacios, M. (2017) 'To Use or Not to Use Metformin in Cerebral Ischemia: A Review of the Application of Metformin in Stroke Rodents', *Stroke Research and Treatment*. doi: 10.1155/2017/9756429.

Beck, K. D. *et al.* (1991) 'Tyrosine Hydroxylase mRNA Expression by Dopaminergic Neurons in Culture: Effect of 1 -Methyl-4-Phenylpyridinium Treatment', *Journal of Neurochemistry*. J Neurochem, 57(2), pp. 527–532. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03782.x.

Berg, D. *et al.* (2015) 'MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease', *Movement Disorders*. doi: 10.1002/mds.26431.

Bernardi, A. *et al.* (2019) ' Yerba mate (Ilex paraguariensis) favors survival and growth of dopaminergic neurons in culture ', *Movement Disorders*, (November 2018), pp. 2018–2020. doi: 10.1002/mds.27667.

Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M. (2003) ' L IGNIN B IOSYNTHESIS ', *Annual Review of Plant Biology*. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.

Bové, J. *et al.* (2005) 'Toxin-induced models of Parkinson's disease', *NeuroRx*. American Society for Experimental Neurotherapeutics, 2(3), pp. 484–494. doi: 10.1602/neurorx.2.3.484.

Bracesco, N. *et al.* (2011) 'Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview', *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), pp. 378–384. doi: 10.1016/j.jep.2010.06.032.

Burré, J. *et al.* (2010) 'α-Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro', *Science*, 329(5999), pp. 1663–1667. doi: 10.1126/science.1195227.

C. Jurado-Coronel, J. *et al.* (2016) 'Implication of Green Tea as a Possible Therapeutic Approach for Parkinson Disease', *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. doi: 10.2174/1871527315666160202125519.

Caruana, M. and Vassallo, N. (2015) 'Tea polyphenols in parkinson's disease', *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-3-319-18365-7_6.

CDC (2009) 'Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, quinta edición', *Central of Diseases Control and Prevention (CDC)*.

Choi, J. S., Park, C. and Jeong, J. W. (2010) 'AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.022.

Ci, Y. *et al.* (2014) 'ROS inhibit autophagy by downregulating ULK1 mediated by the phosphorylation of p53 in selenite-treated NB4 cells', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 5(11), p. e1542. doi: 10.1038/cddis.2014.506.

Curry, D. W. *et al.* (2018) 'Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in Parkinson's disease', *Journal of Parkinson's Disease*. IOS Press, pp. 161–181. doi: 10.3233/JPD-171296.

Datan, E. *et al.* (2014) 'MTOR/p70S6K signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection', *Virology*. NIH Public Access, 452–453, pp. 175–190. doi: 10.1016/j.virol.2014.01.008.

Dawson, T. M., Ko, H. S. and Dawson, V. L. (2010) 'Genetic animal models of Parkinson's

disease.', *Neuron*, 66(5), pp. 646–61. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.034.

Dextera, D. T. and Jenner, P. (2013) 'Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018.

Egan, D. F. *et al.* (2011) 'Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy', *Science*. doi: 10.1126/science.1196371.

Falkenburger, B. H., Saridaki, T. and Dinter, E. (2016) 'Cellular models for Parkinson's disease', *Journal of Neurochemistry*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 121–130. doi: 10.1111/jnc.13618.

Gatto, E. M. *et al.* (2015) 'Inverse association between yerba mate consumption and idiopathic Parkinson's disease. A case-control study', *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V., 356(1–2), pp. 163–167. doi: 10.1016/j.jns.2015.06.043.

Gibb, W. R. G. and Lees, A. J. (1988) 'The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. doi: 10.1136/jnnp.51.6.745.

Goetz, C. G. (2011) 'The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. doi: 10.1101/cshperspect.a008862.

Gonzalez de Mejia, E. *et al.* (2005) 'Effect of yerba mate (Ilex paraguariensis) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation.', *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), pp. 1966–73. doi: 10.1021/jf048158g.

Greenamyre, J. T. and Hastings, T. G. (2004) 'Parkinsons-divergent causes convergent mechanisms', *Science*. doi: 10.1126/science.1098966.

Guerreiro, S. *et al.* (2008) 'Paraxanthine, the primary metabolite of caffeine, provides protection against dopaminergic cell death via stimulation of ryanodine receptor channels', *Molecular pharmacology*, 74(4), pp. 980–989. doi: mol.108.048207 [pii]\r10.1124/mol.108.048207.

Hardie, D. G. (2014) 'AMP-Activated Protein Kinase: Maintaining Energy Homeostasis at the Cellular and Whole-Body Levels', *Annual Review of Nutrition*. Annual Reviews, 34(1), pp. 31–55. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161148.

Hardie, D. G., Ross, F. A. and Hawley, S. A. (2012) 'AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi: 10.1038/nrm3311.

Hawley, S. A. *et al.* (2005) 'Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.009.

Hawley, S. A. *et al.* (2012) 'The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 336(6083), pp. 918–922. doi: 10.1126/science.1215327.

Heck, C. I. and de Mejia, E. G. (2007) 'Yerba Mate Tea (Ilex paraguariensis): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations', *Journal of Food Science*, 72(9), pp. R138–R151. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x.

Heitman, E. and Ingram, D. K. (2017) 'Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid', *Nutritional Neuroscience*. Taylor and Francis Ltd., pp. 32–39. doi:

10.1179/1476830514Y.0000000146.

Hirsch, E. C. and Hunot, S. (2009) 'Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?', *The Lancet Neurology*, pp. 382–397. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70062-6.

Ito, H. *et al.* (2008) 'Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells', *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. doi: 10.1271/bbb.70670.

James Surmeier, D. *et al.* (2012) 'Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: 10.1101/cshperspect.a009290.

Jankovic, J., Rousseaux, M. W. C. and Shulman, J. M. (2017) 'Progress toward an integrated understanding of Parkinson's disease', *F1000Research*. doi: 10.12688/f1000research.11820.1.

Kalia, L. V. and Lang, A. E. (2015) 'Parkinson's disease', *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

Kim, C. Y. and Alcalay, R. N. (2017) 'Genetic Forms of Parkinson's Disease', *Seminars in Neurology*. Thieme Medical Publishers, Inc., pp. 135–146. doi: 10.1055/s-0037-1601567.

Kovalevich, J. and Langford, D. (2013) 'Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology', *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2.

Kremr, D. *et al.* (2016) 'UNREMITTING PROBLEMS WITH CHLOROGENIC ACID NOMENCLATURE: A REVIEW', *Quim. Nova*, 39(4), pp. 530–533. doi: 10.5935/0100-4042.20160063.

Krishna, A. *et al.* (2014) 'Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease', *BMC Genomics*, 15(1). doi: 10.1186/1471-2164-15-1154.

Maraki, M. I. *et al.* (2019) 'Mediterranean diet adherence is related to reduced probability of prodromal Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 34(1), pp. 48–57. doi: 10.1002/mds.27489.

Marín-Aguilar, F. *et al.* (2017) 'Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase: A new target for nutraceutical compounds', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms18020288.

Markowicz-Piasecka, M. *et al.* (2017) 'Metformin – a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases', *Pharmaceutical Research*. doi: 10.1007/s11095-017-2199-y.

Marques, V. and Farah, A. (2009) 'Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 113(4), pp. 1370–1376. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.08.086.

Marras, C. and Obeso, J. A. (2019) 'We are what we eat - editors' note on the role of diet in Parkinson's disease', *Movement Disorders*, 34(1), pp. 1–1. doi: 10.1002/mds.27613.

Michel, P. P. *et al.* (1999) 'Adenosine prevents the death of mesencephalic dopaminergic neurons by a mechanism that involves astrocytes', *Journal of Neurochemistry*. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722074.x.

Michel, P. P., Hirsch, E. C. and Hunot, S. (2016) 'Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease', *Neuron*, 90(4), pp. 675–691. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.038.

Milioli, E. M. *et al.* (2007) 'Effect of acute administration of hydroalcohol extract of Ilex paraguariensis St Hilaire (Aquifoliaceae) in animal models of Parkinson's disease.', *Phytotherapy research : PTR*, 21(8), pp. 771–6. doi: 10.1002/ptr.2166.

Mitchell, J. J. (2000) ' The Neuron in Tissue Culture . L. W. Haynes ', *The Quarterly Review of Biology*. doi: 10.1086/393343.

Montenegro, J. (1711) *Materia Médica Misionera*.

Moores, R. G., McDermott, D. L. and Wood, T. R. (1948) 'Determination of Chlorogenic Acid in Coffee', *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 20(7), pp. 620–624. doi: 10.1021/ac60019a007.

Morens, D. M. *et al.* (1995) 'Cigarette smoking and protection from parkinson's disease: False association or etiologic clue?', *Neurology*. doi: 10.1212/WNL.45.6.1041.

Naveed, M. *et al.* (2018) 'Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.064.

Noyce, A. J. *et al.* (2012) 'Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease', *Annals of Neurology*. doi: 10.1002/ana.23687.

Ong, K. W., Hsu, A. and Tan, B. K. H. (2012) 'Chlorogenic acid stimulates glucose transport in skeletal muscle via AMPK activation: A contributor to the beneficial effects of coffee on diabetes', *PLoS ONE*, 7(3). doi: 10.1371/journal.pone.0032718.

Parkinson, J. (1817) *An essay on shaking palsy*, *Journal of Neuropsychiatry Clinical Neurosciences*.

Parkinson, J. (1969) 'An essay on the Shaking Palsy', *Archives of Neurology*. doi: 10.1001/archneur.1969.00480100117017.

Parkinson, J. (2002) 'An essay on the shaking palsy. 1817.', *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*.

Poels, J. *et al.* (2009) 'Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy', *BioEssays*. Bioessays, pp. 944–952. doi: 10.1002/bies.200900003.

Pomilio, A. B., Trajtemberg, S. and Vitale, A. A. (2002) 'High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of Ilex paraguariensis using automated micellar electrokinetic capillary chromatography', *Phytochemical Analysis*, 13(4), pp. 235–241. doi: 10.1002/pca.647.

Rena, G., Hardie, D. G. and Pearson, E. R. (2017) 'The mechanisms of action of metformin', *Diabetologia*. Springer Verlag, pp. 1577–1585. doi: 10.1007/s00125-017-4342-z.

Ritz, B. *et al.* (2014) 'Parkinson disease and smoking revisited: Ease of quitting is an early sign of the disease', *Neurology*. doi: 10.1212/WNL.0000000000000879.

Rodríguez-Violante, M. *et al.* (2017) 'Two-hundred Years Later: Is Parkinson's Disease a Single Defined Entity?', *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. Instituto Nacional de la Nutricion Salvador Zubiran, 69(6), pp. 308–313. doi: 10.24875/RIC.17002291.

Roskoski, R. (2012) 'ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation', *Pharmacological Research*. Pharmacol Res, pp. 105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005.

Ross, G. W. *et al.* (2000) 'Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease', *Journal of the American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.283.20.2674.

Salminen, A. and Kaarniranta, K. (2012) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network', *Ageing Research Reviews*. doi: 10.1016/j.arr.2011.12.005.

Siderowf, A. and Lang, A. E. (2012) 'Premotor Parkinson's disease: Concepts and definitions', *Movement Disorders*. doi: 10.1002/mds.24954.

Tieu, K. (2011) 'A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease.', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), p. a009316. doi: 10.1101/cshperspect.a009316.

Wang, Z. *et al.* (2001) 'Antagonistic Controls of Autophagy and Glycogen Accumulation by Snf1p, the Yeast Homolog of AMP-Activated Protein Kinase, and the Cyclin-Dependent Kinase Pho85p', *Molecular and Cellular Biology*. doi: 10.1128/mcb.21.17.5742-5752.2001.

Weil, R. S. *et al.* (2017) 'Current concepts and controversies in the pathogenesis of Parkinson's disease dementia and Dementia with Lewy Bodies', *F1000Research*. doi: 10.12688/f1000research.11725.1.

Xicoy, H., Wieringa, B. and Martens, G. J. M. (2017) 'The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 10. doi: 10.1186/s13024-017-0149-0.

Xu, L. and Ash, J. D. (2016) 'The role of AMPK pathway in neuroprotection', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 425–430. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_56.

Yu, Q. *et al.* (2018) 'Early activation of Egr-1 promotes neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease', *Experimental Neurology*. Academic Press Inc., 302, pp. 145–154. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.01.009.