



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Efecto de extractos de yerba mate y principios activos sobre el metabolismo neuronal y su implicancia en enfermedades neurodegenerativas.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Hernán Ezequiel Hauché Pedernera

Director de tesis: Dr. Juan Esteban Ferrario

Consejera de Estudios: Dra. Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional (iB3), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Buenos Aires, 2025

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Ferrario, por su dirección y tutela, por sus consejos y su paciencia. Por ser un ejemplo, y por su forma de dirigir un grupo humano increíble. Por compartir todo lo que sabe, y siempre llegar al laboratorio con ganas de que hagamos la mejor ciencia posible. Por su crítica y por su aliento. Por las analogías con el fútbol, y por las infinitas anécdotas de la ciencia. Por sus clases magistrales en cultivo primario, y en mesada. Por darnos vuelta el laboratorio queriendo hacer las cosas como las hacía cuando era becario. Por los mates llenos de ciencia, y una ciencia llena de mates.

A la Dra. Melina Bordone, por sus enseñanzas, su técnica y su atención al detalle. Por sus palabras de aliento, por su profesionalismo y su dedicación. Por su compañía en cada protocolo, paso a paso, compartiendo los éxitos y los fracasos. Por ser una coach en la mesada, pero también del deporte. Por ser como una hermana mayor en la ciencia.

Al laboratorio de neurobiología de la enfermedad de Parkinson. A este grupo maravilloso que más que un grupo de investigación ya es una familia. A Tomi, un hermano de la ciencia con quien empecé esta aventura, por llenar los primeros años de este doctorado de risas, asados y mates. A Mica, que siempre está alegrando y descontracturando el laboratorio. A Gi, que no dejó mosca sin decapitar. A Barb, que ya es más argentina que el dulce de leche. A Lore por compartirnos toda su clínica y el amor por la neurología. A Pau por auspiciar los picos de glucemia. A Male por su sentido del humor cómplice y los bizcochitos para acompañar los mates.

Al iB3, que supo ser mi hogar dentro de exactas -mi otro hogar-. A su gente maravillosa que es un ejemplo innegable de la pasión por hacer y enseñar ciencia. A los becarios del iB3 (y de exactas), por los mates, las risas, los llantos y los afters. Por las catarsis, los consejos y los abrazos. Por enseñarme que quizás el verdadero doctorado, son los amigos que hacemos en el camino.

Al Prof Dr. Tiago Outeiro y a todo el equipo de Neurodeg en la UMG, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y hacerme sentir uno más durante mi estadía en Alemania.

A mis Viejos, que son los que me enseñaron todo. Me enseñaron que pase lo que pase, siempre hay que seguir adelante. Que, si algo no sale hoy, va a salir mañana. Me enseñaron lo lindo de aprender, lo lindo que es saber. Me enseñaron a enseñar. Me enseñaron el valor de la perseverancia. Y así, sin saberlo, me enseñaron también a hacer un doctorado. Cada página de esta tesis es de ustedes.

A mis hermanas, de quienes estoy inmensamente orgulloso. Con quienes comparto esta loca idea de querer entender cómo funciona lo que tenemos en la cabeza, y como podemos hacer para que este mejor cuando algo no anda bien. Porque somos la primera generación de universitarios de una familia, que lo dejó todo porque estemos donde estamos.

A mis Abuelos, que aunque hoy no puedan estar ni leer estas palabras, están.

A Milagros, por haber sido mi compañera durante esta aventura. Por sus consejos y por haberme apoyado a perseguir mis sueños. Porque no estaría donde estoy si no fuera por ella.

A la universidad pública, gratuita y no arancelada, y al CONICET. Porque estoy orgulloso de ser docente en la UBA y científico argentino.

RESUMEN

Efecto de extractos de yerba mate y principios activos sobre el metabolismo neuronal y su implicancia en enfermedades neurodegenerativas.

La neuroprotección es un objetivo clave en el estudio de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP), donde la pérdida paulatina y progresiva de neuronas dopaminérgicas causa graves trastornos motores y cognitivos. Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*, YM), así como de café y té verde, se asocia con un menor riesgo de desarrollar la EP. Estas bebidas contienen polifenoles, particularmente ácido clorogénico (CGA), compuesto que se ha asociado a efectos neuroprotectores. Previamente se ha publicado que la YM protege neuronas dopaminérgicas en cultivos primarios, pero los mecanismos subyacentes son desconocidos, especialmente aquellos que involucran la supervivencia neuronal y la homeostasis proteica.

En este trabajo se evaluó la capacidad de YM y CGA para modular vías celulares vinculadas con el metabolismo energético, la autofagia y la proteostasis. En células SH-SY5Y se observó que ambos tratamientos inducen la activación de AMPK, evidenciada por un aumento en la fosforilación de Thr172. De forma concomitante, se detectó un incremento en el número de vesículas LC3 positivas, lo que indica la inducción de estructuras autofágicas. En un modelo de agregación de α -Syn en células H4, YM y CGA redujeron significativamente tanto el número como el tamaño de los agregados.

En conjunto, estos resultados sugieren que la activación de AMPK y la estimulación de la autofagia constituyen mecanismos centrales mediante los cuales YM y CGA podrían ejercer efectos neuroprotectores, potencialmente favoreciendo la degradación de proteínas mal plegadas como α -Syn. El presente trabajo aporta evidencia experimental que refuerza la hipótesis de que compuestos naturales presentes en la YM pueden contribuir a la neuroprotección y destaca la potencialidad de estos compuestos como candidatos para futuros estudios exploratorios tanto para comprender mecanismos de neuroprotección, como complementos terapéuticos en el contexto de la EP.

Palabras clave: Parkinson, Neuroprotección, Yerba Mate, Ácido Clorogénico, AMPK, Autofagia, α -Sinucleína.

ABSTRACT

Effect of yerba mate extracts and active ingredients on neuronal metabolism and its implications for neurodegenerative diseases.

Neuroprotection is a key objective in the study of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD), where the gradual and progressive loss of dopaminergic neurons causes severe motor and cognitive impairments. Epidemiological studies suggest that the consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*, YM), as well as coffee and green tea, is associated with a lower risk of developing PD. These beverages contain polyphenols, particularly chlorogenic acid (CGA), a compound that has been associated with neuroprotective effects. YM has previously been reported to protect dopaminergic neurons in primary cultures, but the underlying mechanisms remain unclear, especially those involving neuronal survival and protein homeostasis.

In this study, we evaluated the ability of YM and CGA to modulate cellular pathways linked to energy metabolism, autophagy, and proteostasis. In SH-SY5Y cells, both treatments were observed to induce AMPK activation, evidenced by an increase in Thr172 phosphorylation. Concomitantly, an increase in the number of LC3-positive vesicles was detected, indicating the induction of autophagic structures. In a model of α -Syn aggregation in H4 cells, YM and CGA significantly reduced both the number and size of aggregates.

Together, these results suggest that AMPK activation and autophagy stimulation constitute central mechanisms through which YM and CGA exert neuroprotective effects, potentially promoting the degradation of misfolded proteins such as α -Syn. This work provides experimental evidence that reinforces the hypothesis that natural compounds present in YM may contribute to neuroprotection and highlights the potential of these compounds as candidates to understand the mechanisms of neuroprotection as well as a complimentary therapies in the context of PD.

Keywords: Parkinson's, Neuroprotection, Yerba Mate, Chlorogenic Acid, AMPK, Autophagy, α -Synuclein.

ABREVIATURAS

AMP: adenosín monofosfato.

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

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

BDNF: “*brain-derived neurotrophic factor*”.

BL: buffer de lisis.

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

CA: ácido cafeico.

cAMP: adenosín monofosfato cíclico.

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

CGA: Ácido Clorogénico (*chlorogenic acid*).

CoQ10: coenzima Q10.

CRYM: Comisión Reguladora de la Yerba Mate.

DA: Dopamina.

EP: Enfermedad de Parkinson.

ES: error estándar.

FA: ácido ferúlico.

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

GDNF: “*glial cell line-derived neurotrophic factor*”.

HDL: lipoproteínas de alta densidad (*High density lipoprotein*).

HPRT1: hipoxantina fosforribosil-transferasa 1

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

INYM: Instituto Nacional de la Yerba Mate.

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

LDL: lipoproteínas de baja densidad (*Low density lipoprotein*).

L-DOPA: Levodopa.

Met: Metformina.

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

p70S6K α : 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*).

TFEB: factor de transcripción EB (*Transcription factor EB*).

Theo: Teobromina.

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

Wb: Western blot.

YM: Yerba Mate.

α -Syn: α -Sinucleína.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS.....	6
ÍNDICE.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	8
1.1.1. Neurodegeneración Dopaminérgica.....	11
1.1.2. Terapéutica actual y limitaciones.	13
1.1.3. Incidencia de la dieta y principios activos sobre la EP y su potencialidad como estrategia neuroprotectora.	19
1.2. LA YERBA MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>).....	22
1.2.1. Composición química: polifenoles, metilxantinas y otros compuestos bioactivos.	25
1.2.2. Efectos sobre la salud: incidencia en la salud cardiovascular, metabólica y neurológica.....	28
1.2.3. Estudios previos sobre yerba mate en modelos neurodegenerativos.	33
1.3. MODELOS EXPERIMENTALES.....	35
1.3.1. SH-SY5Y.....	36
1.3.2. H4.....	37
1.4. PROCESOS CELULARES ASOCIADOS CON METABOLISMO ENERGÉTICO Y NEUROPROTECCIÓN.	39
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. EXTRACTO DE YM Y CGA.....	47
3.2. CULTIVOS CELULARES.	48
3.2.1. SH-SY5Y.....	49
3.2.2. Tratamientos experimentales en SH-SY5Y.....	50
3.2.3. H4.....	53
3.2.4. Transfecciones.	54
3.1. WESTERN BLOT.....	54
3.2. INMUNOCITOQUÍMICA.	58
3.3. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA.	60
3.4. RTqPCR.	61
3.5. ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA.	63
4. RESULTADOS	65
4.1. ACTIVACIÓN DE AMPK EN CÉLULAS SH-SY5Y TRATADAS CON EXTRACTO DE YERBA MATE Y ÁCIDO CLOROGÉNICO.	65
4.2. AUMENTO DE AUTOFAGIA EN CÉLULAS SH-SY5Y: INMUNODETECCIÓN DE LC3.....	74
4.3. REDUCCIÓN DE AGREGADOS DE A-SINUCLEÍNA EN CÉLULAS H4 COTRANSFECTADAS.....	78
5. DISCUSIÓN.....	82
6. CONCLUSIONES	92
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	94
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedad de Parkinson.

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo multifactorial, cuyo origen etiológico aún se desconoce (Patrick P. Michel, Hirsch y Hunot, 2016; Funayama *et al.*, 2023; Absalyamova *et al.*, 2025). Fue descrita 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). 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 (Patrick P. Michel, Hirsch y Hunot, 2016; Funayama *et al.*, 2023). Es el trastorno del movimiento neurodegenerativo progresivo más común, afectando a más de 10 millones de personas en todo el mundo. Su incidencia aumenta con la edad (Srivastav, Fatima y Mondal, 2017) y se ha reportado que su prevalencia mundial ha ido en aumento desde la década de 1980, sobre todo en los últimos veinte años (Zhu *et al.*, 2024). Como entidad patológica ha sido revisada y actualizada en numerosas ocasiones siendo aún hoy un tema de constante reinterpretación y reclasificación entre los especialistas (Parkinson, 1969, 2002; Goetz, 2011).

En esencia, es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte prominente y prematura de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Obeso *et al.*, 2008). Como resultado, la deficiencia de dopamina en los ganglios basales conduce a un trastorno del movimiento, que es la base de la sintomatología motora característica de la enfermedad (Kalia y Lang, 2015). Su diagnóstico se basa principalmente en la presencia de dichos síntomas motores, 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 y Lees, 1988; Patrick P. Michel, Hirsch y 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 y Lang, 2015; Jankovic, Rousseaux y Shulman, 2017; Weil *et al.*, 2017).

A pesar de que los mecanismos moleculares de la patogénesis de la enfermedad se han descrito ampliamente, aún no existe un panorama claro, ni consenso respecto de su etiopatogenia (Absalyamova *et al.*, 2025). Según la línea de pensamiento más aceptada, la neurodegeneración es inducida principalmente por una acumulación de factores que incluyen estrés oxidativo, neuroinflamación, desregulación de la proteostasis cerebral, desregulación apoptótica y alteración de la autofagia, sobre un *background* genético característico aunque muy poco conocido (Absalyamova *et al.*, 2025).

La principal característica patológica 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 EP (Absalyamova *et al.*, 2025). 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 y Lang, 2015).

A nivel histológico, la manifestación de la EP se caracteriza a por: (1) la presencia de los cuerpos de Lewy (LB)¹, que son agregados proteicos anormales enriquecidos en α -Sinucleína (α -Syn; SNCA); (2) la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc que proyectan al estriado; y (3) microgliosis, que es la acumulación de células microgliales activadas (Xicoy, Wieringa y Martens, 2017).

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).

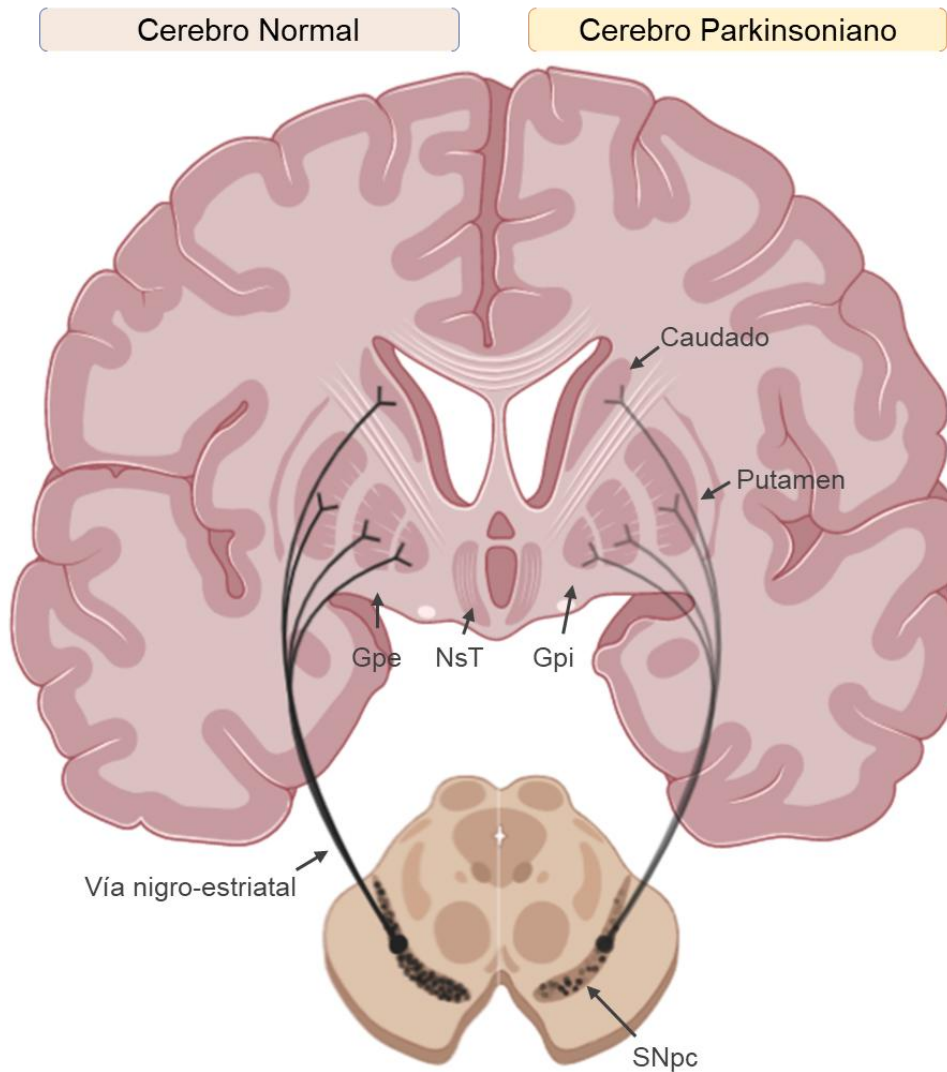


Figura 1.1.a: Representación esquemática de sección coronal de un cerebro normal y un cerebro parkinsoniano. Se destacan la SNpc, los Núcleos Caudados y Putamen (Núcleo estriado en humanos). Gpe: Globo pálido externo, NsT: Núcleo subtalámico, y Gpi: Globo pálido interno. Las flechas negras representan proyecciones de la SNpc, y su proporción disminuida en pacientes con Parkinson. Las figuras inferiores representan secciones transversales del cerebro medio. El moteado oscuro representa la característica coloración de la SNpc, debida a la presencia del pigmento neuromelanina en los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas. En la EP, la pérdida progresiva de estas neuronas produce un palidecimiento visible de esta región en comparación con un cerebro normal, reflejando la disminución de neuromelanina y dopamina. Este fenómeno es visible a simple vista en preparados de cerebros *post mortem*. Figura creada con BioRender.com (licencia educativa gratuita).

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.

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. (Patrick P. Michel, Hirsch y Hunot, 2016; Absalyamova *et al.*, 2025).

Si bien la EP es una enfermedad neuronal, no afecta de manera uniforme a todas las neuronas. Si tomamos como referencia la formación de cuerpos de Lewy 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 y Hastings, 2004). En cambio, otra corriente de pensamiento pone el énfasis en las demandas energéticas que acarrea su fenotipo fisiológico (Surmeier, 2007; Surmeier *et al.*, 2010; Sulzer y Surmeier, 2013). 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).

La neurodegeneración se ha vinculado a numerosos cambios moleculares y celulares, como la agregación de α -Syn, el manejo ineficiente de proteínas aberrantes o mal plegadas, la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la apoptosis y la disfunción mitocondrial. La agregación anormal de α -Syn es una de las hipótesis más importantes para explicar la muerte de neuronas nigroestriales en la EP (Maries *et al.*, 2003).

La α -Syn es una proteína pequeña de aproximadamente 140 aminoácidos, abundantemente expresada en las neuronas, particularmente en los terminales presinápticos. En condiciones fisiológicas, se localiza tanto en el citosol como asociada a membranas de vesículas sinápticas, mitocondrias y núcleo, donde cumple funciones relacionadas con la regulación del tráfico vesicular, la dinámica de las vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisores. Su papel como chaperona del complejo SNARE contribuye a la homeostasis sináptica y a la eficiencia de la neurotransmisión (Burré *et al.*, 2010; Vekrellis *et al.*, 2011; Burré, 2015; Patrick P. Michel, Hirsch y Hunot, 2016).

En condiciones patológicas, la α -Syn puede adoptar conformaciones anómalas que favorecen su mal plegamiento y consecuente agregación, originando estructuras insolubles que se acumulan en el soma neuronal (cuerpos de Lewy) o en los procesos neuríticos (neuritas de Lewy) (Kalia y Lang, 2015). La proteína monomérica soluble puede oligomerizarse, dando lugar a protofibrillas y posteriormente a fibrillas amiloides, proceso en el que las especies oligoméricas prefibrilares se consideran actualmente las más neurotóxicas por su capacidad de alterar la integridad de membranas, interferir con la función mitocondrial y perturbar la homeostasis proteica (Conway, Harper y Lansbury, 2000; Kim y Lee, 2008; Melki, 2015; Villar-Piqué, Lopes da Fonseca y Outeiro, 2016; Delenclos *et al.*, 2019).

La homeostasis intracelular de α -Syn depende de mecanismos de degradación como el sistema ubiquitina-proteasoma y la vía autofagia-lisosomal. La alteración de estos sistemas, junto con la actividad limitada de proteasas extracelulares que también contribuyen a su recambio, puede favorecer la acumulación y agregación de la proteína (Dong-Chen *et al.*, 2023).

El mal plegamiento conformacional, la consecuente agregación y la acumulación de α -Syn son rasgos distintivos de los trastornos relacionados con cuerpos de Lewy, como la EP, la demencia con cuerpos de Lewy y la atrofia multisistémica. En estos desórdenes, la disfunción proteostática derivada de la acumulación de α -Syn se asocia directamente con la pérdida neuronal progresiva (Delenclos *et al.*, 2019). Si bien, su papel patogénico está bien establecido, los mecanismos moleculares que determinan su toxicidad celular aún no se comprenden completamente.

En humanos, el gen SNCA (Synuclein Alpha) codifica para α -Syn. Multiplicaciones en este locus conducen a la sobreexpresión de α -Syn de tipo silvestre, suficiente para causar parkinsonismo, mientras que mutaciones puntuales raras (como A53T, A30P o E46K) aumentan su propensión a la agregación y generan neurodegeneración (Devine *et al.*, 2011).

1.1.2. Terapéutica actual y limitaciones.

La terapéutica actual de la EP se basa en el alivio de la sintomatología y las características motoras incapacitantes. El manejo de base de la patología es el tratamiento sintomático con fármacos que aumentan las concentraciones de dopamina (DA) o estimulan directamente sus receptores. Esta estrategia terapéutica se basa principalmente en restablecer el nivel óptimo de dopamina y sus vías de señalización asociadas, para lo cual el estándar terapéutico más empleado es la administración de Levodopa (L-DOPA; L-3, 4-dihidroxifenilalanina) (Factor, 2008; Yuan *et al.*, 2010; Pardo-Moreno *et al.*, 2023; Kim y Lee, 2025). La L-DOPA es el precursor metabólico de la dopamina y constituye el tratamiento más efectivo y utilizado para aliviar los síntomas motores de la EP, ya que atraviesa la barrera hematoencefálica y es convertida en dopamina en el cerebro, compensando parcialmente la pérdida neuronal dopaminérgica (Kalia y Lang, 2015; Poewe *et al.*, 2017).

No obstante, el tratamiento prolongado con L-DOPA está asociado con complicaciones importantes, como fluctuaciones de efecto (*“wearing-off”*) y sobre todo la aparición de discinesias. Las discinesias son movimientos involuntarios y anormales, de carácter coreico o distónico. Estas manifestaciones motoras fluctúan en intensidad y localización, y se relacionan principalmente con la estimulación intermitente y pulsátil de los receptores dopaminérgicos, que altera la plasticidad sináptica del cuerpo estriado y otras estructuras de los ganglios basales (Cenci y Konradi, 2010). De esta forma, esta terapéutica se limita al control sintomático, presenta complicaciones clínicas asociadas y no modifica de forma sustancial la progresión de la EP (Sivanandy *et al.*, 2021).

Además del tratamiento con L-DOPA, existen otras opciones farmacológicas que actúan sobre el sistema dopaminérgico mediante diferentes mecanismos de acción: por ejemplo, los agonistas de receptores D₂ como el Ropinirol o el Pramipexol, que imitan la acción de la DA en los receptores postsinápticos, y los inhibidores de la recaptación de dopamina o de su degradación por enzimas como la MAO-B o la COMT, que basan su acción en prolongar la duración de la señal dopaminérgica (Oertel y Schulz, 2016; Suski y Stacy, 2023).

Cabe destacar que la administración de L-DOPA requiere necesariamente de su combinación con inhibidores periféricos de la dopa-descarboxilasa, como la carbidopa o la benserazida, sin los cuales la L-DOPA sería metabolizada antes de alcanzar el sistema nervioso central. Antes de la introducción de carbidopa o benserazida, la L-DOPA administrada por vía sistémica era convertida en dopamina (DA) en los tejidos periféricos, principalmente en

intestino, hígado y corazón, por acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) o dopa descarboxilasa. Esa dopamina periférica no atravesaba la barrera hematoencefálica, pero sí era metabolizada localmente a noradrenalina (NA) por la dopamina β -hidroxilasa (DBH) en neuronas simpáticas y médula suprarrenal. En consecuencia, el tratamiento con L-DOPA sola aumentaba los niveles periféricos de catecolaminas (dopamina y noradrenalina), lo que generaba efectos adversos cardiovasculares graves: taquicardia, arritmias, hipertensión, vómitos y colapso circulatorio en algunos casos. Es por esto que, hasta principios de los años 70, el uso clínico de L-DOPA estaba limitado por su toxicidad periférica. La introducción de la carbidopa (y la benserazida) cambió el panorama representando un hito fundamental en el tratamiento de la EP (Hornykiewicz, 1966; Cotzias, Van Woert y Schiffer, 1967; Yuan *et al.*, 2010; Oertel y Schulz, 2016).

Como se mencionó anteriormente, las causas subyacentes de la enfermedad son heterogéneas y -a pesar de las pistas- permanecen desconocidas. Múltiples procesos celulares están involucrados en la neurodegeneración de manera variable en la EP ([ver sección 1.1.1.](#)). Así, una estrategia potencialmente más efectiva podría ser apuntar a las vías moleculares disfuncionales específicamente en cada paciente con un cóctel de compuestos químicos, o lo que se entiende hoy en día como medicina personalizada. Otras posibles intervenciones, no exentas de fuertes discusiones, incluyen terapia génica dirigida y estimulación cerebral profunda de núcleos subtalámicos (Kalia y Lang, 2015).

Como alternativas, recientemente se han propuesto terapias dirigidas específicamente a la agregación de α -Syn: la inmunoterapia (activa o pasiva²) destinada a eliminar o neutralizar agregados de α -Syn, y las terapias basadas en siRNA u oligonucleótidos antisentido, ambas orientadas a reducir la expresión de α -Syn (Menon *et al.*, 2022). Si bien estos enfoques han mostrado resultados alentadores en modelos preclínicos y en algunos ensayos clínicos iniciales, su traslación efectiva al tratamiento humano aún enfrenta grandes desafíos. Entre ellos, se incluyen la necesidad de una entrega eficiente y segura al sistema nervioso central, la heterogeneidad en las formas patológicas de α -Syn que podrían limitar la eficacia terapéutica, y el riesgo potencial de interferir con las funciones fisiológicas de la proteína. Además, la respuesta

² La inmunoterapia activa busca estimular el sistema inmune del propio paciente para que produzca anticuerpos endógenos dirigidos contra el antígeno de interés —en este caso, la α -sinucleína— mediante la administración de una vacuna o inmunógeno. En contraste, la inmunoterapia pasiva consiste en la administración directa de anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos exógenos, diseñados para reconocer y eliminar selectivamente las formas tóxicas o agregadas de α -sinucleína. Ambas estrategias persiguen reducir la carga proteica anómala y mitigar la neurodegeneración asociada (Brundin, Dave y Kordower, 2017b; Soto y Pritzkow, 2018).

inmunológica inducida por algunas vacunas o anticuerpos podría generar efectos secundarios no deseados, lo que mantiene abierto el debate sobre la seguridad y especificidad de estas terapias (Fields, Bengoa-Vergniory y Wade-Martins, 2019; Jankovic y Tan, 2020; Menon *et al.*, 2022).

Además, cabe destacar medicamentos en investigación que actúan sobre mecanismos poco convencionales en el abordaje de la EP, como ser el Nilotinib. Este es un inhibidor selectivo de la tirosina quinasa ABL/c-Abl que originalmente fue aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. Este compuesto ha demostrado en modelos experimentales efectos neuroprotectores y la capacidad de promover la autofagia, facilitando la eliminación de agregados de α -Syn ya formados y atenuando el daño dopaminérgico (Hebrón, Lonskaya y Moussa, 2013; Karuppagounder *et al.*, 2014; Tocci *et al.*, 2025). Además, se ha observado que el Nilotinib puede modular vías de señalización intracelular relacionadas con la actividad de AMPK y mTOR, que también constituyen ejes centrales en el metabolismo neuronal y en los mecanismos de neuroprotección abordados en esta tesis. Sin embargo, pese a su potencial terapéutico, la traslación clínica del Nilotinib aun enfrenta dificultades y falta de consenso. Algunos ensayos en pacientes con EP han mostrado resultados inconsistentes en cuanto a su eficacia clínica y han planteado preocupaciones sobre efectos adversos cardiovasculares y de seguridad a largo plazo, especialmente a dosis elevadas (Pagan *et al.*, 2020; Simuni *et al.*, 2021). Además, persiste la discusión sobre si los beneficios observados derivan de un efecto directo sobre la degradación de α -Syn o de una modulación más general del metabolismo celular.

Por otra parte, en los últimos años ha cobrado un creciente interés el estudio de intervenciones terapéuticas no farmacológicas basadas en modificaciones del estilo de vida como estrategias coadyuvantes en la EP. Estas aproximaciones buscan complementar los tratamientos farmacológicos tradicionales mediante acciones que ayudarían a la neuroplasticidad, reduzcan la inflamación sistémica y mejoren la función mitocondrial (Mak *et al.*, 2017; Amara y Memon, 2018; Janssen Daalen *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2023). Entre las estrategias más reportadas, el ejercicio físico regular —ya sea aeróbico, de fuerza, equilibrio o modalidades como danza, tai chi o yoga— ha demostrado beneficios sobre los síntomas motores, la calidad de vida y algunos síntomas no motores (Mak *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2020; Schootemeijer *et al.*, 2020; Ernst *et al.*, 2024; Park *et al.*, 2025). Diversos ensayos clínicos y metaanálisis muestran que la práctica deportiva sostenida puede estabilizar o mejorar la función motora, reducir la fatiga y favorecer el bienestar cognitivo y emocional (Amara y Memon, 2018; Folkerts *et al.*, 2023; Langeskov-Christensen *et al.*, 2024).

Además, las modificaciones en la dieta —como la adopción de una dieta mediterránea, rica en polifenoles, la restricción proteica o el uso de probióticos— también se han asociado con efectos beneficiosos al actuar sobre el metabolismo energético y la microbiota intestinal (Marras y Obeso, 2019; Lister, 2020; Van Der Berg *et al.*, 2024). En este contexto, el consumo habitual de infusiones como café, té y yerba mate, todas ellas fuentes naturales de compuestos fenólicos y metilxantinas con potencial modulador del metabolismo neuronal, ha despertado un interés creciente por su posible papel neuroprotector. Este aspecto, particularmente relevante en relación con el ácido clorogénico y otros polifenoles presentes en la yerba mate, será desarrollado en mayor profundidad en secciones posteriores de este trabajo. Otras estrategias, como la mejora del sueño, la reducción del estrés y el fortalecimiento de la interacción social, podrían también contribuir al manejo global de la enfermedad (Kip y Parr-Brownlie, 2022; Kola y Subramanian, 2023; Goltz, Van Der Heide y Helmich, 2024). En conjunto, la incorporación de estas estrategias modificadoras del estilo de vida al abordaje integral de la EP representa una tendencia creciente hacia una medicina multidimensional y centrada en el paciente, que contempla no solo la farmacoterapia sino también la promoción activa de la salud y la resiliencia neuronal (Janssen Daalen *et al.*, 2022; Park *et al.*, 2025).

A pesar de lo antes dicho, las estrategias de manejo clínico para los cuadros discapacitantes que aparecen en los estadios avanzados de la enfermedad son, al día de la fecha, 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.

En la actualidad no existe ningún fármaco o tratamiento disponible que sea capaz de enlentecer o detener la progresión o proporcione la cura completa para la EP (Srivastav, Fatima y Mondal, 2017). Tratamientos modificadores de la enfermedad que reduzcan la tasa de neurodegeneración o detengan este proceso han sido esquivos -o necesitan de mayor estudio- y son sin lugar a dudas la mayor necesidad terapéutica no satisfecha en la EP (James Surmeier *et al.*, 2012; Kalia y Lang, 2015). De esta forma, aunque la batería terapéutica actual ha logrado mejorar sustancialmente los síntomas de la EP, sus limitaciones motivan la búsqueda de estrategias más allá del sistema dopaminérgico clásico y la exploración de mecanismos celulares subyacentes, tal como se propone en el presente trabajo.

La evolución de la EP puede dividirse clínicamente en tres etapas principales (*figura 1.1.2.a*): la fase preclínica, la fase prodrómica y la fase clínica (Siderowf y Lang, 2012; Berg *et al.*, 2015; Kalia y Lang, 2015; Postuma y Berg, 2019). En la etapa preclínica ocurre la pérdida

progresiva de neuronas dopaminérgicas sin manifestación de síntomas. La etapa prodrómica se caracteriza por la aparición de síntomas no motores —como trastornos del sueño REM, hiposmia o estreñimiento— que suelen pasar desapercibidos o difícilmente son asociados a la EP en una primera evaluación neurológica. Finalmente, en la etapa clínica se expresan los síntomas motores característicos de la enfermedad (temblor en reposo, rigidez, bradicinesia), momento a partir del cual hoy en día es posible establecer un diagnóstico clínico certero.

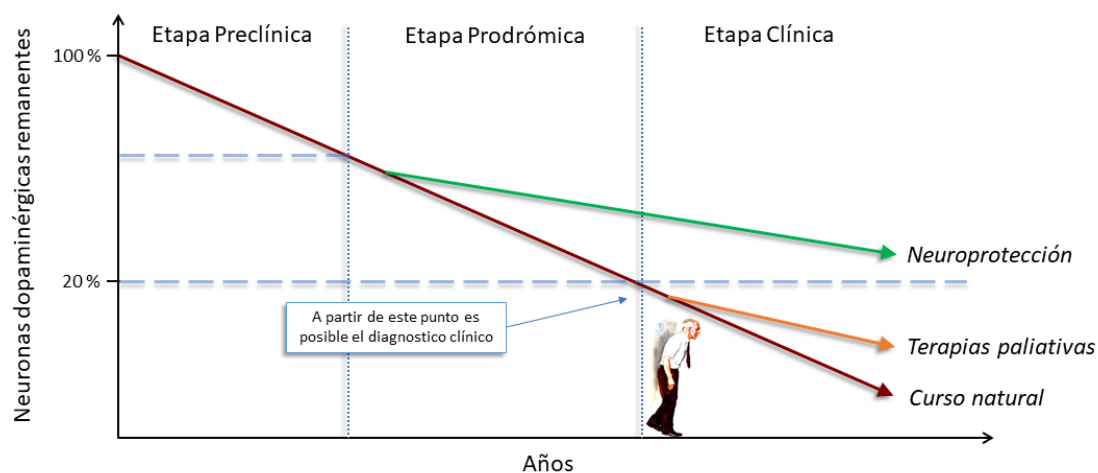


Figura 1.1.2.a: Evolución de la enfermedad de Parkinson. Representación esquemática del curso temporal de la patología. Se destacan la etapa preclínica (sin manifestación de síntomas, pero con paulatina degeneración dopaminérgica), prodrómica (con manifestación de síntomas no motores), y clínica (con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

Se estima que los síntomas motores se hacen evidentes cuando aproximadamente el 80 % de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc ya han degenerado (Fearnley y Lees, 1991). Como el daño neuronal es esencialmente irreversible, las terapias disponibles tienen un carácter fundamentalmente paliativo. En este contexto, surge la necesidad de identificar o desarrollar estrategias capaces de prolongar la fase prodrómica, retrasando la aparición de los síntomas motores o incluso -idealmente- evitando que lleguen a manifestarse. De esta forma, identificar y validar nuevos compuestos con potencial neuroprotector constituye un desafío central en la búsqueda de terapias modificadoras de la EP.

El concepto de neuroprotección en EP puede entenderse como la capacidad de preservar la viabilidad y funcionalidad neuronal -en particular de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc- frente a los procesos patológicos causados por el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la neuroinflamación y la acumulación anómala de proteínas. Procesos celulares estrechamente vinculados a la neurodegeneración dopaminérgica y la fisiopatología de la

enfermedad (Schapira y Olanow, 2004; Poewe *et al.*, 2017). En este sentido, se han evaluado múltiples estrategias que buscan interrumpir o ralentizar el curso de la degeneración dopaminérgica más allá del alivio sintomático.

Entre las aproximaciones más exploradas se destacan los antioxidantes, que intentan contrarrestar el daño oxidativo asociado a la pérdida neuronal en la SNpc. Un ejemplo paradigmático lo dio el uso de la coenzima Q10 (CoQ10). La CoQ10, también conocida como ubiquinona, es una molécula lipofílica cuyo rol principal es participar en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Además de su rol bioenergético, la CoQ10 cumple una función antioxidante clave, ya que protege a las membranas celulares y a las lipoproteínas frente a la peroxidación lipídica, y ayuda a regenerar otros antioxidantes como la vitamina E (Crane, 2001). En el contexto de enfermedades neurodegenerativas como la EP, la CoQ10 despertó interés debido a que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son procesos relacionados a la pérdida de neuronas dopaminérgicas. Aproximaciones experimentales mostraron que la suplementación con CoQ10 podía mejorar la función mitocondrial y reducir la neurodegeneración, aunque los ensayos clínicos en humanos no lograron confirmar un beneficio terapéutico significativo (Shults *et al.*, 2002; Flint Beal *et al.*, 2014). Estos resultados ponen de manifiesto las limitaciones de una aproximación a la neuroprotección basada en una estrategia netamente antioxidante. Si bien existe un potencial efecto protector, todo indica que debería ser un complemento a la terapia principal, pero no es suficiente como terapéutica *per se*.

Otro abordaje terapéutico emergente se centra en la modulación de la autofagia (proceso que será desarrollado en detalle más adelante [ver sección 1.4.](#)). La autofagia es un proceso celular altamente conservado mediante el cual las células degradan y reciclan sus propios componentes —como organelas dañadas o proteínas mal plegadas— a través de lisosomas, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia celular (Mizushima, 2011; Mizushima y Komatsu, 2011). En esta línea, ha destacado como se mencionó previamente el Nilotinib, que ha mostrado efectos alentadores al estimular la autofagia y promover la eliminación de agregados de α -Syn, sugiriendo un posible beneficio en la progresión de la enfermedad (Hebron, Lonskaya y Moussa, 2013; Karuppagounder *et al.*, 2014).

Además, la estimulación de vías tróficas representa otra aproximación neuroprotectora de interés que se han pensado como complementarias. Los factores neurotróficos como el GDNF (“*glial cell line-derived neurotrophic factor*”) o el BDNF (“*brain-derived neurotrophic factor*”) han mostrado la capacidad de promover la supervivencia y regeneración de neuronas

dopaminérgicas, aunque su principal limitante en la aplicación clínica radica en su biodisponibilidad y en su entrega (“*delivery*”) dirigida específicamente al sistema nervioso central (Lapchak *et al.*, 1997).

Estas aproximaciones, vistas en conjunto, ponen de manifiesto la complejidad del paradigma de la neuroprotección en la EP. Visto de esta forma, una estrategia superadora sería pensar que no existe un único blanco terapéutico, sino una red interconectada de procesos celulares cuya disfunción converge en la pérdida neuronal. Este marco fisiopatológico destaca entonces la necesidad de explorar nuevos compuestos, particularmente de origen natural, capaces de modular múltiples vías de supervivencia neuronal, entre ellas las vinculadas al metabolismo energético, la respuesta antioxidante y la autofagia.

1.1.3. Incidencia de la dieta y principios activos sobre la EP y su potencialidad como estrategia neuroprotectora.

En los últimos años ha incrementado el reconocimiento del papel que desempeña la alimentación y la dieta en la evolución de las enfermedades neurodegenerativas (Otaegui-Arrazola *et al.*, 2014; Marras y Obeso, 2019). En este contexto, numerosos estudios han explorado el potencial terapéutico de productos naturales derivados de plantas medicinales y de sus formulaciones, identificando compuestos capaces de modular procesos moleculares vinculados a la EP (Dong-Chen *et al.*, 2023). De manera particular, algunos alimentos de consumo habitual han mostrado una asociación inversa con el riesgo de desarrollar esta patología, lo que refuerza la importancia de la dieta como un factor modificador en la evolución de la enfermedad (Marras y Obeso, 2019).

La evidencia clínica y experimental convergente sugiere que el consumo elevado de café tiene un efecto protector convincente contra el desarrollo de la EP (Ross *et al.*, 2000; Limanaqi, Biagioni, Busceti, Ryskalin, Polzella, *et al.*, 2019). El efecto neuroprotector del café ha sido ampliamente estudiado y hoy en día es bien sabido que no se debe únicamente a la cafeína en sí misma, sino a otros polifenoles bioactivos, principalmente el ácido fenólico, es decir, el ácido cafeico (CA), el ácido ferúlico (FA), el ácido p-cumárico (p-COU), el ácido clorogénico (CGA) y el ácido quínico, es decir, el ácido 3-O-feruloilquínico (3-O-FQ) y el ácido 5-O-cafeoilquínico (5-O-CQA). Además, se ha reportado que estos polifenoles bioactivos mejoran el rendimiento motor y cognitivo en el envejecimiento y la depresión (Colombo y Papetti, 2020; Socała *et al.*, 2021).

El consumo de té, especialmente el té verde (*Camellia sinensis*), ha despertado un creciente interés en el campo de la neuroprotección. Se trata de una de las bebidas más consumidas a nivel mundial y es particularmente rica en polifenoles, entre los que destacan catequinas y flavonoides. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos son capaces de modular vías de señalización clave en las neuronas, lo que podría retrasar el inicio o idealmente limitar la progresión de la EP (Caruana y Vassallo, 2015; C. Jurado-Coronel *et al.*, 2016). Entre los mecanismos descritos, las catequinas de *Camellia sinensis* se han vinculado con la inducción de autofagia a través de la activación de TFEB (Siglas en inglés de “*Transcription factor EB*”, factor de transcripción EB), la inhibición de mTOR y la estimulación de AMPK (Kim, Quon y Kim, 2014; Trivedi *et al.*, 2016; Holczer *et al.*, 2018; Prasanth *et al.*, 2019).

La activación de la autofagia por estos polifenoles se asocia con múltiples beneficios: desde la neuroprotección frente a la toxicidad inducida por proteínas priónicas en neuronas primarias (Lee *et al.*, 2015), hasta la degradación de endotoxinas, la modulación de la inflamación (Li *et al.*, 2011) y la depuración lipídica (Kim *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014). Asimismo, las catequinas del té verde protegen frente al estrés oxidativo inducido por hipoxia y previenen la muerte celular mediante la inducción de esta vía (Li *et al.*, 2018). En modelos celulares como SH-SY5Y dopaminérgicas, también se ha demostrado que estos compuestos activan la autofagia y confieren protección frente al daño ocasionado por toxinas ambientales como la atrazina (Li *et al.*, 2018).

En línea con la creciente literatura vinculando a los polifenoles de la dieta con efectos benéficos sobre la salud, recientemente se asoció también la dieta mediterránea con una menor incidencia al desarrollo de EP (Maraki *et al.*, 2019). Este patrón alimentario, caracterizado por un alto consumo de frutas, verduras, legumbres, cereales integrales, aceite de oliva, pescado y frutos secos, provee una abundante fuente de polifenoles, además de ácidos grasos monoinsaturados y omega-3, compuestos con reconocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Individuos con mayor adherencia a este tipo de dieta presentarían una reducción significativa en la probabilidad de manifestar signos prodrómicos de EP ([figura 1.1.2.a](#)), como el estreñimiento, la hiposmia o los trastornos del sueño REM, sugiriendo que los componentes de esta dieta podrían modular mecanismos fisiopatológicos clave en la neurodegeneración. De esta forma, el consumo de dietas enriquecidas en polifenoles podría pensarse como una estrategia potencialmente preventiva o incluso modificadora del curso temprano de la EP, abriendo un campo prometedor para futuras investigaciones clínicas y nutricionales.

Aunque controversiales, se han reportado asociaciones protectoras entre ciertos hábitos de consumo y la EP. En el caso del tabaquismo, algunos estudios sugieren un efecto protector potencial (Morens *et al.*, 1995), aunque hallazgos más recientes indican que los pacientes con EP tienden a dejar de fumar con mayor facilidad que los controles. Esto plantea la hipótesis de que la aparente relación inversa podría deberse, en realidad, a una disminución de la respuesta a la nicotina durante la fase prodrómica de la enfermedad (Ritz *et al.*, 2014). De manera similar, un meta-análisis sobre factores de riesgo y manifestaciones no motoras tempranas identificó una asociación negativa significativa entre el consumo moderado de alcohol y la EP, lo que sugiere que estos hábitos podrían influir en la susceptibilidad a la enfermedad (Noyce *et al.*, 2012).

Diversos estudios experimentales y clínicos sugieren que la dieta y el uso de compuestos derivados de plantas medicinales pueden tener un impacto significativo en la evolución de la EP. Se ha demostrado que ciertos fitocompuestos, como la berberina, mejoran la supervivencia de neuronas dopaminérgicas en modelos animales tratados con MPTP, reducen los niveles de α -Syn y favorecen la autofagia mediante el aumento de LC3-II y la activación de AMPK, mecanismos estrechamente vinculados con la neuroprotección (Hou *et al.*, 2015; Deng y Ma, 2021). De manera similar, moléculas como la trehalosa o el resveratrol han mostrado atenuar la gravedad de los síntomas en modelos experimentales al estimular la autofagia y mejorar la homeostasis celular (Limanaqi, Biagioni, Busceti, Ryskalin, Polzella, *et al.*, 2019). Además, revisiones recientes han destacado a otros compuestos naturales, como la tanshinona o el andrografólido, por sus propiedades antiinflamatorias y su potencial terapéutico frente a procesos neurodegenerativos (Zhu *et al.*, 2022). En conjunto, estas evidencias respaldan la idea de que los productos naturales y los componentes de la dieta no solo contribuyen a la comprensión de los mecanismos celulares implicados en la EP, sino que también constituyen una valiosa fuente de estrategias complementarias para la prevención y tratamiento de esta enfermedad.

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 catatonía 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). Además, un trabajo epidemiológico realizado en nuestro país puso de manifiesto una asociación inversa entre el consumo de yerba mate (*Ilex paraguariensis*; YM) y el desarrollo de EP (Gatto *et al.*, 2015). Estos resultados llevaron

a plantear la hipótesis de que la YM 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). Estos resultados se desarrollarán más adelante ([ver sección 1.2.3.](#)).

Todas estas observaciones pusieron nuevamente en el centro de escena el impacto de la dieta sobre la evolución de la enfermedad (Marras y 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. La yerba mate (*Ilex paraguariensis*).

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 pequeñas ramas 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” o mas recientemente en bebidas envasadas, sobre todo en Europa y EEUU. 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 Sudamérica y muy utilizada como elemento para la vajilla popular por las civilizaciones locales. 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 y Misiones), Brasil (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Sao Paulo), y 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 Instituto Nacional de la Yerba Mate, 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 YM 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).

La YM no se consume directamente luego de su cosecha, sino que sufre un procesamiento previo a ser comercializada. A grandes rasgos se puede resumir su producción en las siguientes cinco etapas: (1) el sapecado, que consiste en una pasada rápida de las hojas al exponerlas a la llama directa; (2) el secado, que es la exposición a alta temperatura entre 12-24 h, (3) el canchado, que consiste en una primera molienda gruesa y (4) el estacionamiento, que puede llegar a 30 meses, para terminar con la (5) molienda y empaquetado. La principal consecuencia del sapecado es el de reducir al mínimo el porcentaje de humedad, evitando la fermentación, y el de inhibir la acción de enzimas como el polifenol oxidasa³.

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).

1.2.1. Composición química: polifenoles, metilxantinas y otros compuestos bioactivos.

Existen numerosos compuestos bioactivos identificados en extractos de YM, posibles responsables de sus potenciales efectos sobre la salud (*figura 1.2.1.a*). Entre ellos, los más abundantes son los polifenoles como el 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 y Vitale, 2002; Heck y de Mejia, 2007; Bracesco *et al.*, 2011).

³ 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).

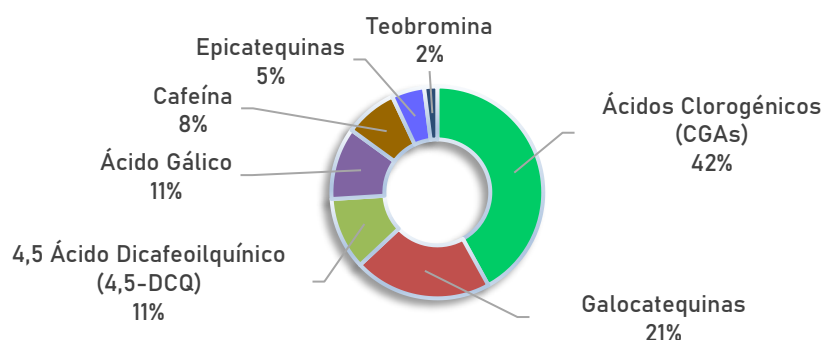


Figura 1.2.1.a: Principales compuestos orgánicos presentes en extractos de *Ilex paraguariensis*, según el relevamiento de Bracesco y colaboradores (2011). Además, en cada litro de extracto se encuentran habitualmente 5 g de polifenoles totales y 0,35 g de saponinas totales.

El ácido clorogénico (CGA) es un compuesto polifenólico perteneciente a la familia de los ésteres formados entre el ácido quínico (ácido 1-hidroxihexahidrogálico) y un ácido cinámico (como el ácido cafeico, ferúlico o p-cumárico) (*figura 1.2.1.c*). Estos compuestos son típicamente productos del metabolismo secundario vegetal, derivados de la vía del ácido shikímico, y participan como intermediarios en la biosíntesis de la lignina, una de las principales moléculas estructurales de las paredes celulares vegetales (Boerjan, Ralph y Baucher, 2003).

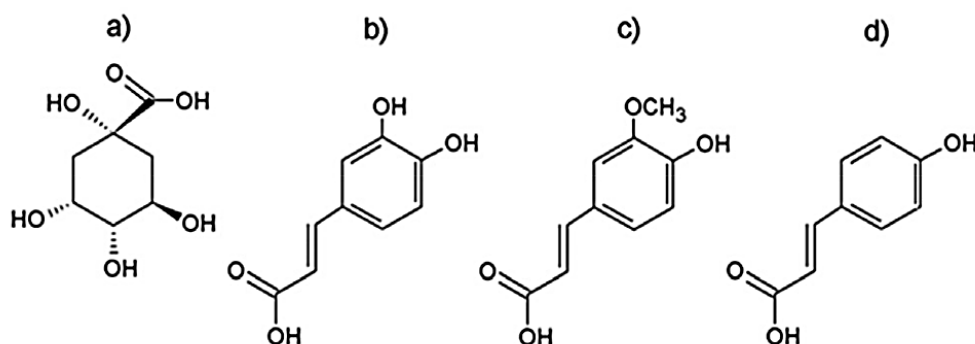


Figura 1.2.1.c: Formulas estructurales del ácido quínico (a) y tres de los más comunes ácidos trans-cinámicos de la familia de los CGAs: ácido cafeico (b), ácido ferúlico (c) y ácido p-cumárico. Modificado de Kremr y colaboradores (2016).

A pesar de lo que su nombre sugiere, los ácidos clorogénicos no contienen cloro; el término refiere al color verde (“*chloro-*”) que adquieren ciertas soluciones y extractos vegetales al oxidarse estos compuestos. Si bien el término “*ácido clorogénico*” fue introducido en 1846 (Moore, McDermott y Wood, 1948), la nomenclatura ha sido históricamente confusa debido a

la existencia de múltiples isómeros y derivados estructuralmente relacionados (Kremr *et al.*, 2016).

La familia de los ácidos clorogénicos (CGAs) incluye una variedad de moléculas estructuralmente emparentadas, entre ellas el ácido 1L-(–)-quínico, el ácido cafeico (CA), el ácido ferúlico y el grupo de los ácidos p-cumáricos (p-CoQAs), que abarca los ácidos cafeoilquínicos (CQAs) y feruloilquínicos (FQAs) (Clifford *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2024).

Dentro de esta familia, el ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) (*figura 1.2.1.d*) es el isómero más abundante en la naturaleza y el primero en ser aislado e identificado, en 1908 por Görter. Por esta razón, en la literatura el término “ácido clorogénico” suele utilizarse como sinónimo de 5-CQA. En el presente trabajo se mantendrá esta convención, salvo se indique lo contrario.

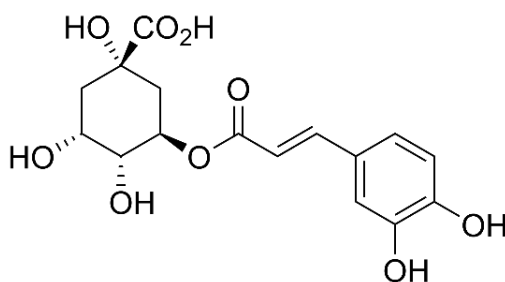


Figura 1.2.1.d: Estructura molecular del ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA) o ácido clorogénico (CGA), principal compuesto de la familia de los CGAs.

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 YM. 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).

Entre los isómeros mencionados, el 3-CQA (ácido neoclorogénico) y 5-CQA (ácido clorogénico) son los más estudiados y los más abundantes en la dieta. Representan la mayor

fracción del CGA total en los granos de café verde, donde el 5-CQA constituye aproximadamente la mitad del contenido total de CGAs seguido en mucha menor proporción por el 3-CQA (Heitman y Ingram, 2017). Además, estos compuestos se encuentran en cantidades significativas en frutas, verduras, té y especialmente en la YM, que destaca como una de las principales fuentes alimenticias de CGA (Marques y Farah, 2009). Nuevamente, en la YM es el 5-CQA el isómero más abundante en cuanto a proporción de CGAs.

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 té y el café. En particular, las principales fuentes de CGA son los granos de café y la YM (Marques y Farah, 2009; Heitman y Ingram, 2017).

1.2.2. Efectos sobre la salud: incidencia en la salud cardiovascular, metabólica y neurológica.

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, entre otras, propiedades para mitigar el cansancio (Montenegro, 1711). El interés científico por los efectos fisiológicos de la YM en la salud humana se remonta a mediados del siglo XX sobre todo en investigaciones realizadas en Argentina (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2005; Heck y de Mejia, 2007; Bracesco *et al.*, 2011). Entre los antecedentes más relevantes se encuentran los trabajos dirigidos por Bernardo Alberto Houssay, Premio Nobel de Fisiología o Medicina (1947), quien impulsó las primeras investigaciones sistemáticas sobre la acción biológica de la YM.

A fines de la década de 1930, Houssay fue convocado por la Comisión Reguladora de la Yerba Mate (CRYM) para desarrollar una serie de estudios experimentales destinados a determinar los efectos fisiológicos del consumo de YM, en un contexto en el que su ingesta era masiva pero carecía de una base científica comprobada. En palabras del propio Houssay, resultaba “*una vergüenza que se consumiera mate en grandes cantidades sin tener datos fidedignos sobre su acción fisiológica*” (Archivo Histórico FCEN-UBA, colección BHYM01, 1939-1944). Las investigaciones coordinadas por Houssay y su equipo —registradas en la colección Bernardo A. Houssay y la YM (BHYM01) del Archivo Histórico de la Facultad de Ciencias Exactas

y Naturales de la Universidad de Buenos Aires— abarcaron diversos aspectos de la acción del mate sobre el metabolismo, y los sistemas cardiovascular, excretor, digestivo y nervioso, además de la determinación de números compuestos presentes en extractos de yerba mate (Archivo Histórico FCEN-UBA, BHYM01; 0221.com.ar, 2020). Si bien desconocemos si estos trabajos derivaron en publicaciones científicas formales, constituyen un antecedente histórico significativo del estudio sistemático de la YM desde una perspectiva biomédica. En ese sentido, las investigaciones de Houssay pueden considerarse el primer intento institucional de comprender, bajo métodos experimentales, los posibles efectos fisiológicos y metabólicos de esta infusión, sentando un precedente para las aproximaciones contemporáneas que exploran su potencial antioxidante, antiinflamatorio y neuroprotector.

Entre los efectos fisiológicos más conocidos y documentados de la YM, destaca su acción estimulante sobre el sistema nervioso central (SNC). Este efecto, ampliamente reconocido tanto por su uso tradicional como por la evidencia experimental, se atribuye principalmente a su contenido en metilxantinas —particularmente cafeína y teobromina—, las cuales actúan como antagonistas de los receptores de adenosina en el cerebro. Al bloquear estos receptores, se incrementa la liberación de neurotransmisores excitatorios como dopamina, noradrenalina y acetilcolina, lo que se traduce en un aumento del estado de alerta, una disminución de la sensación de fatiga y una mejora general del rendimiento cognitivo y motor (Heck y de Mejia, 2007; E. C.S. Santos *et al.*, 2015; Lutomski, Goździewska y Florek-Łuszczki, 2020). Estudios en modelos animales han mostrado que estos efectos incrementan la actividad locomotora y la excitabilidad neuronal, con efectos comparables a los de la cafeína pura (E. C.S. Santos *et al.*, 2015). En ratones, la administración aguda de extracto de YM produce una mayor actividad motora espontánea y un aumento en la actividad colinérgica cerebral, sugiriendo una acción combinada sobre sistemas dopaminérgicos y colinérgicos. En humanos, los efectos estimulantes de la YM se manifiestan principalmente como una mejora en la atención, la concentración y la sensación de energía, lo que explica su consumo cotidiano como bebida revitalizante en gran parte de América del Sur y sobre todo en Argentina (Heck y de Mejia, 2007; Lutomski, Goździewska y Florek-Łuszczki, 2020). Además, se ha propuesto que la combinación natural de cafeína con teobromina y otros polifenoles en la infusión de yerba mate podría modular la respuesta estimulante, proporcionando un aumento más sostenido del estado de alerta sin generar el pico y la caída abrupta típicos de otras bebidas cafeinadas.

Por otra parte, otros efectos fisiológicos destacados de la YM son sus propiedades hipocolesterolémicas, al reducir los niveles séricos de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL), y aumentar las de alta densidad (HDL). Estudios clínicos y experimentales han

demostrado que el consumo regular de YM puede mejorar el perfil lipídico tanto en individuos sanos como en pacientes con dislipidemia o en tratamiento con estatinas, contribuyendo así a la prevención de enfermedades cardiovasculares (De Moraes *et al.*, 2009; De Moraes *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015; José *et al.*, 2023; Bravo *et al.*, 2025). Además, se ha observado que su ingesta mejora la función endotelial, disminuye la presión arterial y reduce marcadores inflamatorios circulantes, sugiriendo un efecto cardioprotector integral (Yu *et al.*, 2015; José *et al.*, 2023).

Otro campo de investigación activo es su papel en el manejo del peso corporal y del metabolismo energético. Ensayos clínicos han mostrado que la suplementación con extractos de YM contribuye a reducir la masa grasa corporal, el perímetro cintura-cadera y el peso total, favoreciendo la pérdida de peso y la regulación del metabolismo lipídico (Kang *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015; Bravo *et al.*, 2025). Estas propiedades suelen asociarse con la inhibición de la lipogénesis, el aumento de la β -oxidación de ácidos grasos y la activación de AMPK (Gawron-Gzella, Chanaj-Kaczmarek y Cielecka-Piontek, 2021). Además, se ha reportado que la YM mejora la sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa, lo que podría tener implicancias en la prevención o tratamiento de la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico (Correa *et al.*, 2018).

La YM posee también una alta capacidad antioxidante, atribuida principalmente a su alto contenido en polifenoles, especialmente el CGA. Diversos estudios *in vitro* han mostrado que los extractos de YM protegen al ADN frente al daño oxidativo y previenen la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Heck y de Mejia, 2007; da Silva *et al.*, 2008; Olate-Briones *et al.*, 2024). En modelos celulares y animales, se ha evidenciado además una reducción de marcadores inflamatorios como TNF- α , IL-6 y COX-2, lo que refuerza su potencial antiinflamatorio y citoprotector (Gawron-Gzella, Chanaj-Kaczmarek y Cielecka-Piontek, 2021; Herrada *et al.*, 2025).

En el ámbito neurológico, la YM ha sido asociada con efectos neuroprotectores y cognitivos positivos. Estudios epidemiológicos sugieren una reducción en el riesgo de desarrollar EP en consumidores habituales de mate (Gatto *et al.*, 2015; Medeiros *et al.*, 2021; Cubas Guillen *et al.*, 2023), mientras que investigaciones experimentales realizadas por nuestro laboratorio han demostrado que extractos de YM y sus componentes bioactivos, como el CGA, protegen a las neuronas dopaminérgicas en cultivo (Bernardi *et al.*, 2019).

Además, se han propuesto otros efectos benéficos, entre ellos una posible mejora en la densidad mineral ósea en mujeres posmenopáusicas (Conforti, Gallo y Saraví, 2012), efectos hepatoprotectores asociados con la reducción de daño oxidativo y la mejora de la función hepática (Gawron-Gzella, Chanaj-Kaczmarek y Cielecka-Piontek, 2021).

Por otra parte, aunque la mayoría de los estudios respaldan un perfil seguro de consumo moderado, se ha descrito cierta controversia respecto a la asociación entre el consumo excesivo o muy caliente de mate y el riesgo de cáncer del tracto aerodigestivo superior —incluyendo cáncer oral, esofágico y laríngeo—. Sin embargo, la evidencia actual sugiere que dicho riesgo se relaciona principalmente con la temperatura de ingestión más que con los componentes químicos de la infusión (Gonzalez de Mejia *et al.*, 2005; Heck y de Mejia, 2007; Lutomski, Goździewska y Florek-Łuszczki, 2020).

De esta forma, la evidencia disponible indica que la YM ejerce efectos benéficos en múltiples sistemas fisiológicos, destacándose sus propiedades cardiometabólicas, antioxidantes, antiinflamatorias y sobre todo neuroprotectoras. Estos efectos, mediados en gran parte por la modulación de vías metabólicas dependientes de AMPK y Nrf2, sitúan a la YM como una fuente natural de compuestos bioactivos con potencial terapéutico en el contexto de la salud metabólica y neurodegenerativa.

Como se mencionó previamente, el principal polifenol presente en la YM es el CGA, y su consumo también ha sido asociado con múltiples efectos benéficos para la salud. Estos abarcan propiedades cardioprotectoras, antiinflamatorias, antioxidantes, antidiabéticas y neuroprotectoras (Wang *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2024). Además, numerosos estudios epidemiológicos han reportado correlaciones entre una mayor ingesta de CGA y una reducción en el riesgo de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y neurodegenerativas (Heitman y Ingram, 2017).

A nivel molecular, el CGA actuaría a diferentes niveles abarcando la regulación del metabolismo energético, la modulación de la respuesta inflamatoria y la protección frente al estrés oxidativo (Nguyen *et al.*, 2024). Estos efectos se explicarían parcialmente por su capacidad para inhibir la vía proinflamatoria NF- κ B, reducir la producción de citoquinas proinflamatorias y, simultáneamente, activar la vía Nrf2, aumentando la expresión de enzimas antioxidantes endógenas (Wang *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2024). Además, se ha demostrado que el CGA promueve la activación de AMPK en modelos no neuronales, un sensor metabólico clave que regula la homeostasis de glucosa y lípidos (Yan *et al.*, 2020; Xue, Wei y Ji, 2023). La activación de esta quinasa contribuye a mejorar la sensibilidad a la insulina, reducir la lipogénesis y favorecer la β -oxidación de ácidos grasos, lo que explica los efectos observados sobre el control glucémico y la mitigación de síndromes metabólicos como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (Tsuda *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2024). En el sistema cardiovascular, el CGA ejerce efectos protectores sobre el endotelio y el miocardio, asociados con la reducción del estrés oxidativo, la

atenuación de la inflamación vascular y la mejora de la función de las células endoteliales (Nguyen *et al.*, 2024). De forma similar, en modelos hepáticos y renales, el CGA ha mostrado propiedades hepatoprotectoras y nefroprotectoras, mediadas por la inhibición de la activación de NF- κ B y la estimulación de AMPK y Nrf2, previniendo la apoptosis inducida por tóxicos o estrés metabólico (Xue, Wei y Ji, 2023). También se han descrito efectos antitumorales atribuibles a su capacidad para inducir apoptosis, frenar la proliferación celular y alterar el metabolismo energético de células cancerosas (Gupta *et al.*, 2022). En el ámbito dermatológico, el CGA protege frente al fotoenvejecimiento, mejora la función de barrera de la piel y reduce la hiperpigmentación, mientras que su actividad antimicrobiana incluye efectos inhibitorios sobre bacterias grampositivas y gramnegativas, así como sobre virus y hongos patógenos (Wang *et al.*, 2022).

La activación de AMPK por CGA ha sido reportada en diversos modelos celulares y tisulares -más ninguno neuronal-, incluyendo hepatocitos, adipocitos, macrófagos y células musculares, y ocurre mediante mecanismos múltiples y complementarios. Entre ellos, destacan la activación de quinasas río arriba de AMPK, el aumento de los niveles intracelulares de calcio (Ca^{2+}) y AMP cíclico (cAMP), la reducción del estrés oxidativo y la modulación de vías metabólicas relacionadas con el metabolismo lipídico y glucídico (Ong, Hsu y Tan, 2012; Ma *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2024). Uno de los principales mecanismos consiste en la activación de CaMKK2 (por sus siglas del inglés “*calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*”), una quinasa reguladora que fosforila y activa AMPK en respuesta al aumento de Ca^{2+} intracelular. El CGA incrementa tanto los niveles de Ca^{2+} como de cAMP, promoviendo la activación de CaMKK2 y, en consecuencia, causando la fosforilación de AMPK. Este proceso conduce a un aumento de la β -oxidación de ácidos grasos y a una mejora del metabolismo energético mediante la regulación positiva de sus blancos río abajo, como ACC (acetil-CoA carboxilasa) y CPT-1 (carnitina palmitoiltransferasa-1) (Ong, Hsu y Tan, 2012; Ma *et al.*, 2023; Nguyen *et al.*, 2024). Además, el CGA tiene un efecto indirecto sobre la activación de AMPK a través de la modulación del estrés oxidativo y la inflamación celular. En macrófagos y células endoteliales, por ejemplo, regula el eje CD36/AMPK/PGC-1 α , promoviendo una respuesta antiinflamatoria y antioxidante (Tsai *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2023). En modelos hepáticos y musculares, la activación de AMPK inducida por CGA se asocia con una mayor captación de glucosa, una mejor utilización de lípidos y la estimulación de la autofagia, todos procesos fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis metabólica (Ong, Hsu y Tan, 2013; Yao *et al.*, 2025). Por otra parte, estudios de acoplamiento molecular (“*molecular docking*”) y de expresión génica sugieren que el CGA podría interactuar directamente con AMPK o con sus proteínas reguladoras, potenciando su activación

(Vasileva *et al.*, 2020). Asimismo, el CGA puede actuar de manera sinérgica con otros compuestos naturales, como el ácido cafeico y la cafeína, lo que amplifica su efecto sobre la activación de AMPK y mejora los resultados metabólicos y antioxidantes (Xu *et al.*, 2019; Vasileva *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2021).

El CGA emerge como un compuesto multifuncional con un amplio potencial terapéutico, capaz de modular múltiples vías celulares vinculadas al metabolismo, la inflamación y el estrés oxidativo. Su acción integradora sobre vías como AMPK, Nrf2 y NF- κ B proporcionaría una base bioquímica prometedora para su potencial aplicación en la prevención y el tratamiento de enfermedades metabólicas, cardiovasculares y sobre todo neurodegenerativas. 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 y Ingram, 2017). En este sentido, el consumo habitual de café —una de las principales fuentes dietarias de CGA— se asocia de manera consistente con un menor riesgo de deterioro cognitivo, demencia y enfermedad de Parkinson, respaldando su efecto neuroprotector demostrado en múltiples estudios poblacionales y experimentales (Heitman y 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).

1.2.3. Estudios previos sobre yerba mate en modelos neurodegenerativos.

La YM, como se ha mencionado previamente, es una infusión natural rica en compuestos bioactivos —principalmente polifenoles como el CGA, xantinas como la cafeína y la teobromina, y diversos metabolitos secundarios— capaces de influir en procesos celulares relevantes para la neurodegeneración. En las últimas dos décadas, se ha acumulado un cuerpo creciente de evidencia que sugiere que la YM podría ejercer efectos neuroprotectores, tanto en modelos experimentales como en estudios poblacionales, particularmente en el contexto de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer.

En el ámbito experimental, distintos estudios han mostrado que los extractos de YM poseen un efecto protector sobre las neuronas dopaminérgicas. En modelos *in vitro* de cultivo primario de mesencéfalo de ratón, nuestro grupo demostró que la YM promueve la supervivencia y el desarrollo dendrítico de las neuronas dopaminérgicas, un efecto también observado -aunque en menor escala- al tratar los cultivos únicamente con CGA o teobromina

(Theo) (Bernardi *et al.*, 2019). En línea con estos hallazgos, en modelos animales de EP, como el de ratones tratados con MPTP o reserpina, los extractos de YM mostraron un perfil antiparkinsoniano, atenuando la pérdida neuronal dopaminérgica y mejorando la conducta motora (Milioli *et al.*, 2007; Tribbia *et al.*, 2019). Dichos efectos se han vinculado con un aumento de la actividad antioxidante y una posible interacción con receptores de adenosina A₂A, cuya modulación se asocia con beneficios en la función motora y la neuroprotección dopaminérgica.

A nivel celular y molecular, la YM ha demostrado reducir el estrés oxidativo, preservar la actividad de enzimas antioxidantes y disminuir la apoptosis neuronal inducida por distintos agentes tóxicos (Branco *et al.*, 2013; de Lima *et al.*, 2017). Además, estudios en modelos de epilepsia inducida químicamente han evidenciado que la YM ejerce efectos anticonvulsivantes y neuroprotectores, probablemente mediados por sus polifenoles, entre ellos la rutina y el CGA (Branco *et al.*, 2013; de Lima *et al.*, 2017).

Además, en modelos de enfermedades neurodegenerativas no dopaminérgicas se ha descrito que los extractos de YM pueden reducir la neuroinflamación, disminuir la desmielinización y limitar la infiltración de células inmunes en el sistema nervioso central, efectos observados en modelos murinos de esclerosis múltiple (Herrada *et al.*, 2025). En paralelo, trabajos en modelos de Alzheimer y estudios epidemiológicos en humanos sugieren que su consumo habitual podría proteger contra el deterioro cognitivo y la acumulación de péptidos amiloides, presumiblemente gracias a su acción antioxidante y antiamiloide (E C S Santos *et al.*, 2015; Bortoli *et al.*, 2018; Cubas Guillen *et al.*, 2023).

Desde una perspectiva epidemiológica, investigaciones realizadas en Argentina y Brasil han identificado una asociación inversa entre el consumo de YM y la incidencia de EP (Gatto *et al.*, 2015; Medeiros *et al.*, 2021; Cubas Guillen *et al.*, 2023). Este hallazgo ha sido interpretado como una evidencia indirecta de que los componentes bioactivos de la YM podrían ejercer un efecto preventivo o modulador de la neurodegeneración, reforzando las observaciones experimentales.

De esta forma, la evidencia experimental y epidemiológica indicaría que la YM ejerce efectos neuroprotectores prometedores, particularmente sobre las neuronas dopaminérgicas, y que estos efectos se extenderían a procesos de neuroinflamación, estrés oxidativo, autofagia y metabolismo energético. Los compuestos bioactivos del mate, como el CGA y sus metilxantinas -principalmente la cafeína y la teobromina-, emergen así como candidatos relevantes en la modulación de vías celulares dependientes de AMPK y, posiblemente Nrf2, que podrían explicar

parte de los beneficios observados. Así, el conjunto de resultados previos refuerza la idea de que la YM y sus componentes constituyen una fuente prometedora de agentes naturales neuroprotectores, y justifican la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes, abordaje que se desarrolla en el presente trabajo.

1.3. Modelos Experimentales.

Si bien los modelos experimentales distan considerablemente de lo que representa la EP desde el punto de vista clínico (síntomatología motora y no motora), histológico o fisiológico, sin lugar a dudas son de gran utilidad para el estudio de aspectos como el 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 conocimiento actual de la enfermedad y la oferta de modelos animales, la investigación en EP permite optar por modelos simplificados que se adapten a la o las hipótesis específicas de trabajo. Algunas líneas experimentales relacionadas con la muerte y sobrevida de las neuronas dopaminérgicas pueden estudiarse en modelos *in vitro* -como los modelos celulares-, como instancia previa a la validación de resultados en modelos con mayor capacidad traslacional como ser los modelos *in vivo*. Por lo general, estos modelos simplificados buscan reproducir dos cambios clave encontrados en el cerebro de los pacientes: la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y/o la presencia de agregados proteicos compuestos principalmente de α -Syn.

La aproximación *in vitro* que proporcionan los modelos celulares ofrece numerosas ventajas por sobre el estudio en modelos animales e incluso por sobre el estudio directo en pacientes. Estos modelos se desarrollan con mayor rapidez, son menos costosos y no requieren aprobación ética. Las manipulaciones genéticas o farmacológicas y la obtención de imágenes es relativamente más sencilla y confiable. Estas propiedades permiten realizar pruebas a mayor escala en menos tiempo. Además, se pueden estudiar tipos celulares específicos – como las neuronas dopaminérgicas- de forma aislada, lo cual puede ser importante para determinar su contribución a la patogénesis de la EP. De todas formas, no puede hacerse caso omiso de que muchos pasos importantes de la patogénesis y la fisiopatología de la EP requieren la interacción de diferentes tipos celulares y, por lo tanto, solo pueden estudiarse en modelos animales.

Algunos ejemplos incluyen el papel de las células gliales y la inflamación, así como los cambios en las propiedades sinápticas y de la red neuronal (Falkenburger y Schulz, 2006; Falkenburger, Saridaki y Dinter, 2016).

Entre los modelos celulares más empleados en neurociencias y en particular en investigación relacionada con la EP se destacan las líneas humanas inmortalizadas SH-SY5Y (neuroblastoma) y H4 (neuroglioma). Estas líneas constituyen herramientas experimentales ampliamente validadas para analizar procesos neurodegenerativos, tales como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, la alteración del metabolismo energético y la formación de agregados de α -sinucleína, características centrales de la fisiopatología de la EP (McLean, Kawamata y Hyman, 2001; Winner y Winkler, 2015; Xicoy, Wieringa y Martens, 2017). En este contexto, resultan particularmente adecuadas para realizar exploraciones iniciales de mecanismos celulares y moleculares asociados a la neuroprotección mediada por compuestos naturales, como los presentes en la YM. Aunque la distancia entre estos modelos *in vitro* y la complejidad de la enfermedad en sistemas *in vivo* es considerable, su reproducibilidad, bajo costo y facilidad de manipulación los convierten en un paradigma experimental eficiente para estudios preliminares de alta resolución, que pueden luego complementarse con aproximaciones en modelos con mayor valor traslacional o incluso en pacientes.

Las ventajas de los cultivos en general es que ofrecen la posibilidad de probar una variedad de manipulaciones en simultáneo, en un intervalo temporal relativamente breve, minimizando 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. En definitiva, estos sistemas reducidos nos permiten responder a preguntas específicas rápidamente, explorar vías de señalización y resolver detalles sobre mecanismos moleculares (Falkenburger, Saridaki y Dinter, 2016). Todo esto, sin perder de vista que cada modelo tiene el potencial de ser una herramienta poderosa, siempre que se consideren las limitaciones y desventajas de estos modelos simplificados (Delenclos *et al.*, 2019).

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 y Langford, 2013; Xicoy, Wieringa y 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 acarrearán 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 y Langford, 2013).

Por otra parte, si bien las células SH-SY5Y muestran una serie de aberraciones genéticas debido a su origen tumoral, la mayoría de los genes y vías desreguladas en la patogénesis de la EP se mantienen intactas (Krishna *et al.*, 2014; Xicoy, Wieringa y 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 y Jenner, 2013; Kovalevich y Langford, 2013; Xicoy, Wieringa y 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 y Martens, 2017). En nuestro laboratorio somos conscientes de las limitaciones de las líneas celulares, pero creemos que podemos valernos de ellas para obtener información primaria sobre mecanismos de acción.

1.3.2. H4.

La línea celular H4 (ATCC®; HTB-148™), es una línea derivada de un neuroglioma humano aislada del cerebro de un hombre de 37 años. Se emplea comúnmente en neurociencias y ha

sido utilizada como modelo para estudiar los mecanismos asociados a la agregación de proteínas en enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EP.

Dado que la α -Syn desempeña un papel central en la patogénesis de la EP y otras sinucleinopatías ([ver sección 1.1.1.](#)), se han desarrollado numerosos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* que reproducen los rasgos patológicos asociados a esta proteína, como su oligomerización, citotoxicidad y capacidad de propagación intercelular. En este contexto, los modelos celulares basados en la sobreexpresión de α -Syn se han convertido en herramientas esenciales para desentrañar cómo su acumulación altera procesos clave como la autofagia, el tráfico vesicular y la función mitocondrial.

Entre los modelos celulares empleados para estudiar los mecanismos de agregación de α -Syn, uno de los más ampliamente utilizados y validados es el modelo basado en la línea de neuroglioma humano H4, debido a su facilidad de cultivo, alta transfectabilidad y reproducibilidad experimental. Estas células, sin embargo, no poseen un fenotipo dopaminérgico ni neuronal, y presentan niveles endógenos limitados de α -Syn (Delenclos *et al.*, 2019). Por ello, los modelos que utilizan H4 se basan en la sobreexpresión de α -Syn, ya sea en su forma silvestre o mutada, para inducir la formación de agregados intracelulares que recapitulan aspectos de las sinucleinopatías humanas.

Pese a sus ventajas experimentales, este modelo presenta algunas limitaciones. La sobreexpresión de α -Syn en H4 genera una baja citotoxicidad, lo que restringe su utilidad para evaluar directamente la degeneración neuronal. Además, las inclusiones producidas en estos sistemas no siempre reproducen completamente las características bioquímicas de los LB humanos: muchas son resistentes a la digestión con proteasas o presentan una fluorescencia limitada con tioflavina S, lo que sugiere un grado de maduración menor (Delenclos *et al.*, 2019). Para superar estas limitaciones, se han introducido modificaciones en los plásmidos que contienen las construcciones moleculares empleadas, como la coexpresión con proteínas accesorias o el uso de mutaciones específicas que favorecen la formación de agregados más grandes y maduros, de mayor relevancia patológica (Lashuel, 2021).

El modelo clásico entonces, consiste en la cotransfección de células H4 con construcciones que expresan una forma truncada de α -Syn (SynT) y Synphilin-1, una proteína que interactúa con α -Syn y favorece su agregación (McLean, Kawamata y Hyman, 2001; Outeiro y Lindquist, 2003). SynT presenta una delección en el extremo C-terminal que aumenta la propensión a la agregación, mientras que Synphilin-1 estabiliza los agregados formados, promoviendo la formación de inclusiones citoplasmáticas visibles que imitan la morfología y

composición de los LB observados en cerebros de pacientes con EP (Masaracchia *et al.*, 2020). Este sistema, denominado modelo SynT/Synphilin-1 (SynT/SPH1), genera inclusiones positivas para α -Syn que pueden detectarse y cuantificarse mediante inmunocitoquímica o microscopía de fluorescencia, representando una herramienta robusta para evaluar procesos de agregación, mecanismos de toxicidad y estrategias terapéuticas (Wu *et al.*, 2019; Dominguez-Meijide *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022).

El modelo H4-SynT/Synphilin-1 es uno de los paradigmas más reproducibles y versátiles para explorar el efecto de drogas de diseño, o bien de extractos de compuestos naturales, sobre la agregación de α -Syn. Su uso ha permitido identificar compuestos con potencial efecto neuroprotector y modulador del plegamiento proteico, así como comprender con mayor precisión las vías celulares involucradas en la autofagia y degradación de α -Syn, procesos críticos en la fisiopatología de la EP (Delenclos *et al.*, 2019; Masaracchia *et al.*, 2020). Pese a sus limitaciones —entre ellas, la ausencia de características neuronales y de redes sinápticas propias del tejido dopaminérgico—, este modelo ha demostrado un excelente poder predictivo inicial, sirviendo como plataforma para identificar moduladores de la proteostasis cuya eficacia luego fue confirmada en modelos animales. Por ejemplo, el Nilotinib ([ver sección 1.1.2.](#)), redujo significativamente los agregados de α -Syn en células H4 cotransfectadas (Hebron, Lonskaya y Moussa, 2013) y posteriormente mostró efectos neuroprotectores y promotores de la autofagia en modelos murinos de EP (Karuppagounder *et al.*, 2014). Estos antecedentes respaldan el uso del modelo H4-SynT/Synphilin-1 como una herramienta experimental de alta sensibilidad para detectar moduladores tempranos de la agregación de α -Syn y para explorar los mecanismos celulares subyacentes (Delenclos *et al.*, 2019; Masaracchia *et al.*, 2020).

En resumen, las características del modelo H4-SynT/Synphilin-1, lo posicionan como una herramienta experimental adecuada para los objetivos del presente trabajo. Por ello, se lo seleccionó como modelo principal para analizar el potencial modulador de la YM y del CGA sobre la agregación de α -Syn.

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 (Ventruti y Cuervo, 2007). 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*) (Hardie, Ross y Hawley, 2012; Curry *et al.*, 2018; Herzig y Shaw, 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 ($\alpha 1$ o $\alpha 2$, con función catalítica), β ($\beta 1$ o $\beta 2$, con función de andamiaje o estructural) y γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 3$, 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 y Hawley, 2012; Xu y Ash, 2016; Herzig y Shaw, 2018).

En condiciones normales, las células mantienen niveles bajos de AMP, y AMPK se mantiene en un estado predominantemente 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 y Hawley, 2012; Xu y Ash, 2016; Herzig y Shaw, 2018).

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; Hardie, Ross y Hawley, 2012; Herzig y Shaw, 2018; Parekh *et al.*, 2022). Estos procesos son regulados respectivamente por los sustratos de AMPK, mTORC1 y mTORC2. El blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR, por sus siglas 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, promoviendo y reprimiéndola respectivamente (Xu y Ash, 2016). Además, P70S6K α (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 p70S6K α 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).

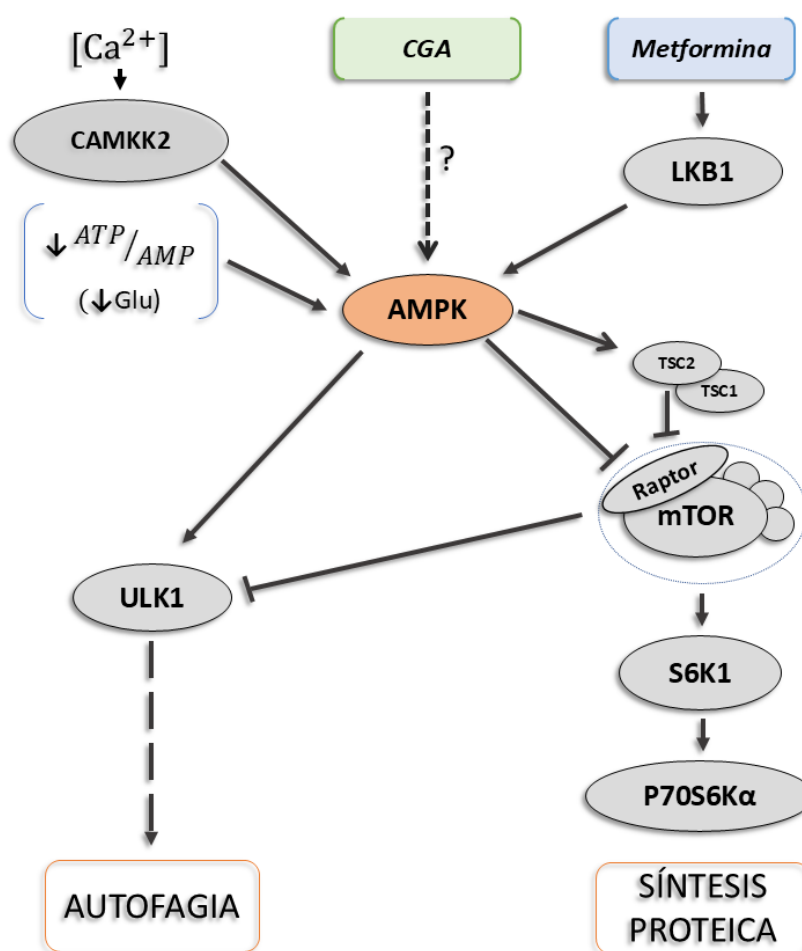


Figura 1.4.a: Posible vía molecular involucrada en el efecto neuroprotector de la yerba mate, y en particular del CGA. Aquí se propone que el CGA induciría la fosforilación de AMPK también en modelos neuronales y en consecuencia la formación del complejo de iniciación (fosforilación de ULK1) que finalmente 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 los mecanismos regulados por AMPK puedan ejercer un rol clave en la neuroprotección se ve reforzado tanto por evidencia clínica como experimental de su activación farmacológica. Recientemente se ha destacado en este aspecto la activación de AMPK por parte de la Metformina (Met). La metformina es un fármaco utilizado desde hace décadas como tratamiento de primera línea para la diabetes mellitus tipo 2 (Rena, Hardie y Pearson, 2017). Su principal acción terapéutica consiste en disminuir la gluconeogénesis hepática y mejorar la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos, lo que ayuda a mantener niveles normales de glucemia sin causar hipoglucemia significativa (Zhou *et al.*, 2001; Rena, Hardie y Pearson, 2017).

La evidencia clínica reciente muestra que tanto pacientes diabéticos como pacientes con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y EP, tratados con metformina han mostrado mejoras cognitivas y funcionales (Markowicz-Piasecka *et al.*, 2017). Además, en modelos celulares de células SH-SY5Y intoxicadas con MPTP/MPP⁺, y en modelos animales de ratones lesionados con MPTP, el tratamiento con metformina produjo un aumento en la fosforilación de AMPK, acompañado de activación de la autofagia, reducción del estrés oxidativo mitocondrial y disminución de la apoptosis neuronal (Bayliss *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016).

La creciente evidencia sobre el papel neuroprotector de la metformina, destaca su acción sobre AMPK, y además sobre mTOR y las vías relacionadas con la autofagia, la homeostasis mitocondrial, el estrés oxidativo y la agregación proteica (Mehraban *et al.*, 2024; Kruczkowska *et al.*, 2025). Incluso mediante su accionar, la metformina podría interferir en la agregación de α -Syn, reducir la neuroinflamación y mantener la función mitocondrial, contribuyendo así a la supervivencia neuronal (Paudel *et al.*, 2020).

De esta forma, esta evidencia respaldaría la hipótesis de que la activación farmacológica -o natural- de AMPK es un punto de convergencia clave en la regulación del metabolismo energético y la supervivencia neuronal. Así, estimular la activación de AMPK emerge como una estrategia terapéutica prometedora para promover la neuroprotección en diversos contextos neurodegenerativos y como complemento de la terapia de restauración dopaminérgica.

Como se mencionó previamente ([Ver sección 1.2.2.](#)), la activación de AMPK por CGA ha sido demostrada en diversos modelos celulares no neuronales, incluyendo hepatocitos, adipocitos y células musculares, donde promueve la β -oxidación de ácidos grasos, mejora la sensibilidad a la insulina y favorece la autofagia (Ong, Hsu y Tan, 2012; Ma *et al.*, 2023; Yao *et al.*, 2025). Este efecto ocurre mediante mecanismos convergentes, como el aumento de Ca²⁺ y cAMP intracelular —que activa la quinasa CaMKK2—, la reducción del estrés oxidativo y la modulación de vías metabólicas asociadas al control de lípidos y glucosa (Nguyen *et al.*, 2024).

El CGA activa AMPK y regula vías antioxidantes e inflamatorias, contribuyendo así a mejorar el metabolismo energético y la resiliencia celular frente al daño oxidativo. Estas propiedades explican sus efectos beneficiosos reportados en trastornos metabólicos, cardiovasculares y hepáticos, y sustentan su potencial rol como modulador neuroprotector en contextos de estrés metabólico y neurodegeneración. Sin embargo, la regulación de AMPK por CGA o YM en neuronas -y modelos neuronales- es aún desconocida, y en este punto se centra el objetivo de esta tesis.

En la búsqueda de vías convergentes descendentes implicadas en la neurobiología de la EP y el parkinsonismo experimental, no son pocos los estudios que asignan un rol clave a los sistemas de reciclaje y limpieza celular (Srivastava y Yadav, 2016). La primera descripción de una alteración de la maquinaria de autofagia en el cerebro de pacientes con EP fue realizada a finales de los años 90 por Anglade et al. (1997) (Anglade *et al.*, 1997), quienes demostraron en la SNpc la concomitancia de células apoptóticas y neuronas donde la autofagia parecía estar alterada.

En eucariotas, las vías de reciclaje y limpieza celular se agrupan en dos sistemas principales: el sistema ubiquitina-proteasoma y la autofagia (Ferrucci *et al.*, 2018; Limanaqi, Biagioni, Busceti, Ryskalin, Soldani, *et al.*, 2019). Ambos sistemas son fundamentales para la actividad sináptica de DA y la proteostasis neuronal, pero destaca predominantemente la autofagia porque es la vía que degrada sustratos específicos como mitocondrias y grandes agregados de proteínas que no pueden ser procesados por el proteasoma (Limanaqi, Biagioni, Busceti, Ryskalin, Polzella, *et al.*, 2019).

La autofagia es esencial para la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, ya que participa en la regulación de la liberación de DA, la homeostasis mitocondrial y la degradación de proteínas mal plegadas, oxidadas y agregadas. En modelos experimentales, la pérdida de esta vía produce neurodegeneración similar a la EP (Sato *et al.*, 2018). Además, las disfunciones de la autofagia se relacionan con la EP familiar (Pasquali *et al.*, 2009). De hecho, alteraciones de varias proteínas codificadas por genes relacionados con la EP, como la α -Syn, LRRK2, endofilina-A, PINK1 y parkina, pueden afectar la maquinaria autofágica a diversos niveles (Pasquali *et al.*, 2009; Lynch-Day *et al.*, 2012; Limanaqi *et al.*, 2018; Obergasteiger *et al.*, 2018).

La autofagia se divide en macroautofagia (en adelante, autofagia), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (Ferrucci *et al.*, 2018). Además, se utilizan otros términos para describir la depuración de compartimentos celulares específicos, realizada por la autofagia (Okamoto, 2014). Por ejemplo, la eliminación de mitocondrias alteradas se denomina mitofagia. Otros ejemplos incluyen la depuración dependiente de la autofagia de patógenos, ribosomas,

porciones del retículo endoplasmático o vesículas sinápticas, que se denominan convencionalmente xenofagia, ribofagia, reticulofagia o vesiculofagia, respectivamente (Okamoto, 2014; Limanaqi *et al.*, 2018).

La autofagia puede ocurrir como un proceso no selectivo o involucrar proteínas adaptadoras/receptoras como p62 (también llamada SQSTM1) y optineurina, que transportan cargas ubiquitinadas al autofagosoma en formación (Tooze y Schiavo, 2008; Mizushima, 2011; Limanaqi, Biagioni, Busceti, Ryskalin, Soldani, *et al.*, 2019). Una variedad de componentes celulares que abarcan proteínas, lípidos, azúcares, ácidos nucleicos, orgánulos completos o compartimentos citoplasmáticos son secuestrados en una vacuola naciente de doble membrana llamada fagóforo, que luego madura para sellarse en una vesícula llamada autofagosoma (Mizushima, 2011). El autofagosoma madura mediante la fusión con vesículas endomembranas (endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares), dando origen al anfisoma. Este último finalmente se fusiona con el lisosoma, que proporciona las hidrolasas ácidas necesarias para la degradación de sustratos. Una vez engullida dentro del lisosoma del autofagosoma, la carga se degrada mientras que algunos subproductos metabólicos se reciclan (*figura 1.4.b*).

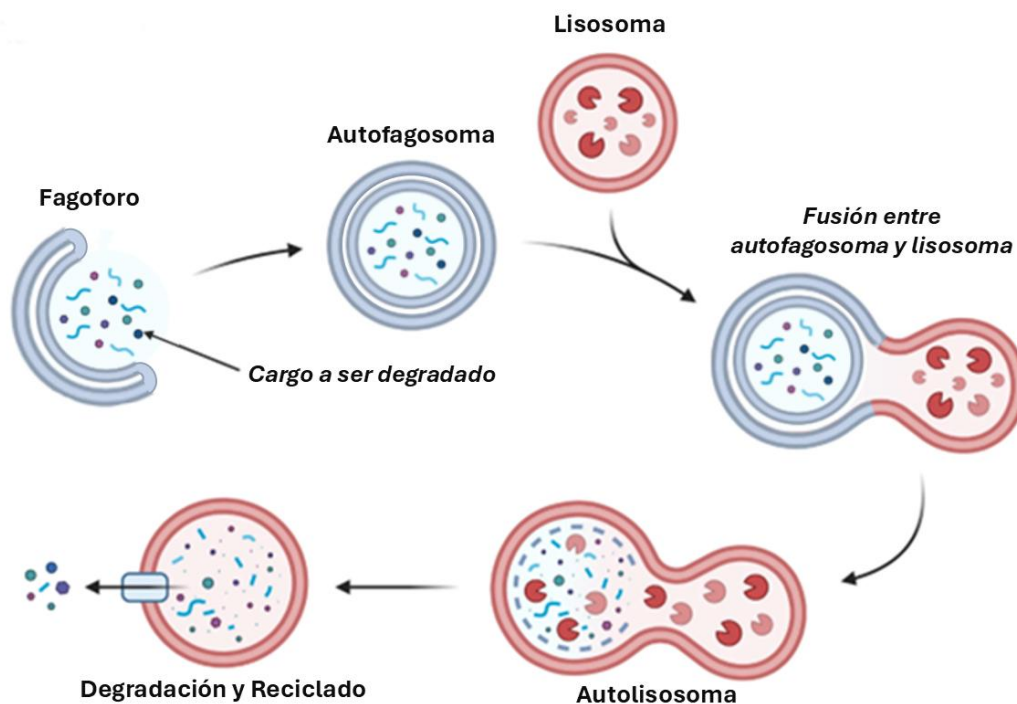


Figura 1.4.b: Representación esquemática del flujo autofágico. Figura creada con BioRender.com (licencia educativa gratuita).

Una compleja maquinaria, que incluye el producto de más de 30 genes relacionados con la autofagia -muchos de los cuales reciben el nombre de Atg-, rige las etapas clave de la progresión de la autofagia, desde la biogénesis y maduración de los autofagosomas hasta la fusión con los lisosomas (Xie y Klionsky, 2007; Yu, Chen y Tooze, 2018). Uno de los principales mecanismos que regulan negativamente la autofagia se basa en la fosforilación de Atg13 dependiente del complejo mTOR1 (mTORC1) y la inhibición de ULK1, ambos pertenecientes a un complejo molecular, fundamental para la inducción temprana de la autofagia (Kamada *et al.*, 2010). Asimismo, la conversión de LC3 (ATG8 en *Drosophila*) en LC3I, la lipidación enzimática de LC3I a la isoforma LC3II, similar a la ubiquitinación, y finalmente la incorporación de LC3II a la membrana del fagóforo son pasos críticos para la expansión y el sellado de la vacuola, permitiendo así la correcta absorción de los elementos citoplasmáticos. En consonancia con esto, LC3 se emplea ampliamente como marcador para la monitorización de la autofagia a nivel morfológico, ultraestructural y bioquímico. Sin embargo, otras proteínas involucradas estrechamente con la autofagia, desde Atg3 a Atg7, son clave en la progresión de la misma, ya que participan en el procesamiento y la conjugación de LC3 con los lípidos de la membrana del autofagosoma en crecimiento (Xie y Klionsky, 2007; Yu, Chen y Tooze, 2018).

Frente a este panorama, el presente trabajo desarrolla una primera aproximación en el estudio de los cambios celulares y moleculares regulados por la exposición a YM y CGA en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y su potencial efecto sobre la agregación de α -Syn.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es caracterizar la o las vías de señalización molecular reguladas por la yerba mate (YM) y/o el ácido clorogénico (CGA) en modelos celulares e investigar la correlación de dichas vías con la progresión de enfermedades neurodegenerativas.

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

Hipótesis: La yerba mate y/o uno de sus principales polifenoles, el ácido clorogénico, activan la vía de señalización de AMPK, lo cual induce el proceso de autofagia, y a su vez promueven la neuroprotección.

Con este fin, para esta tesis se plantaron los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Determinar si la YM y/o el CGA modulan la activación de AMPK en el modelo celular de SH-SY5Y.

Objetivo específico 2: Determinar si la YM y/o el CGA estimulan la autofagia en el modelo celular de SH-SY5Y.

Objetivo específico 3: Determinar el efecto de la YM y/o el CGA sobre el número y tamaño de agregados de α -Syn en un modelo simplificado de agregación en células H4.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Extracto de YM y CGA.

Para el desarrollo de los experimentos planteados en el presente trabajo se utilizó el extracto de YM desarrollado y caracterizado por nuestro laboratorio en un trabajo previo (Bernardi *et al.*, 2019). El extracto fue obtenido a partir de 2 g de hojas secas canchadas, concordante cualitativa y cuantitativamente con los reportes de composición previamente publicados (Bracesco *et al.*, 2011). En la [figura 3.1.a](#) puede observarse el perfil por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) del mismo (Bernardi *et al.*, 2019).

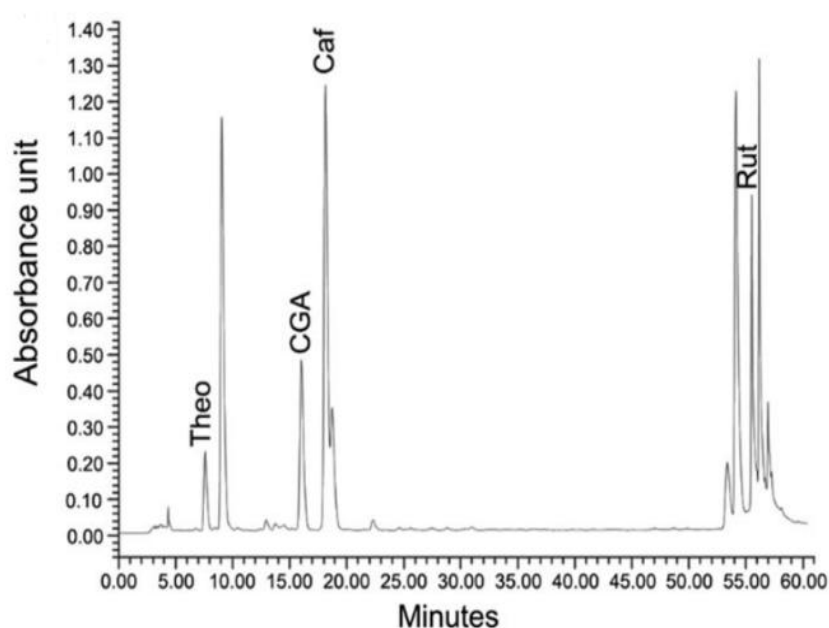


Figura 3.1.a: Perfil cromatográfico de HPLC del extracto de yerba mate empleado en nuestro laboratorio. El mismo fue caracterizado por $0,51 \pm 0,21$ mg de GAE/ml de compuestos fenólicos en $1\mu\text{L}$ de extracto. Las concentraciones determinadas por HPLC fueron: Theo (teobromina): $0,56 \pm 0,01$ mM (101,2 2,5 ppm), CGA: $1,05 \pm 0,05$ mM (317,7 18,5 ppm), Caf (cafeína): $2,66 \pm 0,08$ mM (515,8 16,5 ppm), y Rut (rutina): $1,79 \pm 0,09$ mM (1091,4 53,4 ppm). Modificado de Bernardi *et al.*, 2019.

Para evaluar el efecto del CGA se empleó la droga comercial (Sigma Aldrich®; CAS n°: 327-97-9; Cat n°: C3878) disuelta en agua destilada estéril a una concentración de 1,05 mM. Esta concentración se corresponde con la presente en el extracto de YM en base a lo establecido por HPLC ([figura 3.1.a](#)).

Tanto el extracto de YM como el CGA, una vez disueltos, fueron filtrados en condiciones de esterilidad mediante filtros de 0,22µm (Biofil®; Cat n°: PTF205013), alícuotados en eppendorfs opacos (resguardo de la luz) y conservados a -20°C para su posterior uso. Una vez descongeladas, las alícuotas se conservaron a 4°C como máximo por 3 semanas, luego de lo cual fueron descartadas.

3.2. Cultivos celulares.

Para el desarrollo de este trabajo se emplearon cultivos celulares de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC®; CRL-2266™) y de la línea celular de neuroglioma humano H4 (ATCC®; HTB-148™).

Los cultivos de la línea celular SH-SY5Y fueron empleados en el abordaje del OE1 y OE2. Las H4 para abordar el OE3. En todos los casos, las células fueron sometidas a una serie de tratamientos experimentales con el objeto de inducir cambios a nivel molecular, atribuibles al efecto de la YM y/o CGA.

En todos los casos las células se incubaron en una estufa de cultivo humidificada con 5% de CO₂ a 37°C. Para el mantenimiento y subcultivo, se emplearon *flask's* de tipo T25 y T75 (botellas horizontales con tapa con filtro de 25 o 75 cm² de superficie) para células adherentes y con superficie tratada para tal fin (Biofil®; Cat n°: TCF012050 / TCF012250). Para el desarrollo de tratamientos experimentales se plaquearon las células en placas de 6, 12 y 24 pocillos con fondo plano y tratadas para células adherentes (Biofil®; Cat n°: TCP011006 / TCP01102412 / TCP01102424). Las superficies, densidades de siembra y volúmenes de medio empleados se resumen en la [tabla 3.2.a](#). En los casos en que los cultivos se emplearon para experimentos que fueron analizados por Inmunocitoquímica (OE2 y OE3) las células se plaquearon sobre cubreobjetos estériles ubicados en el fondo de los pocillos de placas de 12 y 24 pocillos ([ver sección 3.4.](#)).

<i>Soporte</i>	<i>Área (cm²)</i>	<i>Densidad de siembra</i>	<i>Volumen de medio (ml)</i>	<i>Uso principal</i>
<i>T25 Flask</i>	25	$0,7 \times 10^6$	3 – 5 ml	Mantenimiento y subcultivo
<i>T75 Flask</i>	75	$2,1 \times 10^6$	8 – 15 ml	Mantenimiento y subcultivo
<i>Placa de 6 pocillos</i>	9,6	$0,6 \times 10^6$	3 ml	Tratamientos experimentales
<i>Placa de 12 pocillos</i>	3,8	$0,2 \times 10^6$	1 – 2 ml	Tratamientos experimentales
<i>Placa de 24 pocillos</i>	1,9	$0,1 \times 10^6$	0,5 - 1 ml	Tratamientos experimentales

Tabla 3.2.a: Soportes utilizados para el cultivo celular in vitro. Se detallan el tipo de soporte, área de cultivo, densidades de siembra, volúmenes de medio completo empleado y uso principal en cada caso.

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 5 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 este trabajo se usaron en todos los casos células de un pasaje menor a 25.

En cuanto a la conservación de las líneas celulares 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 resuspendiendo las células en FBS con el agregado de DMSO 10%.

3.2.1. SH-SY5Y

El cultivo de la línea SH-SY5Y fue realizado en las condiciones previamente mencionadas ([ver sección 3.2.](#)) en medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12; 1:1) suplementado con FBS 10% (Suero Fetal Bovino 10%; Internegocios® Argentina), L-Glutamina 2 mM (Gibco®; Cat n°: 25030-081) y antibiótico-antimicótico Gibco 1%

(10.000 unidades/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B; Gibco®, Cat n° 15240062). Además, cuando se sometieron las células a protocolos de hambreado se las mantuvo exclusivamente en medio EBSS (solución salina equilibrada de Earle; Thermo Scientific®; Cat n°: 14155063).

3.2.2. Tratamientos experimentales en SH-SY5Y

Con el fin de abordar los OE1 y OE2 se emplearon células SH-SY5Y y se trataron con YM y CGA.

AMPK en células SH-SY5Y.

Para esta aproximación experimental y con el fin de abordar el OE1 se emplearon cultivos de células SH-SY5Y. Las aproximaciones experimentales se resumen en dos abordajes: (I) ensayos destinados a ser analizados por *Western blot*, y (II) ensayos destinados a ser analizados por RTqPCR.

Validación de la activación de AMPK con metformina.

Con el objeto de establecer control positivo de activación de AMPK se empleó metformina clorhidrato (Supelco®, cat. n° PHR 1084-500MG), disuelta en agua destilada, filtrada y almacenada a 4 °C (Rena, Grahame y Pearson, sin fecha; Zhou *et al.*, 2001). Las células fueron sembradas a una densidad de 6×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos (9,6 cm²). 24hs post sembrado y a una densidad menor a la confluencia, fueron incubadas con distintas concentraciones de metformina (1–250 mM) para validar su efecto sobre la fosforilación de AMPK ([ver sección 4.1.](#)). Los pocillos sin tratamiento fueron utilizados como controles negativos en todos los ensayos experimentales. Al finalizar los tratamientos, todas las condiciones fueron lisadas en paralelo para evitar sesgos derivados de diferencias en el tiempo de procesamiento ([ver sección 3.3.1.](#)). Las proteínas extraídas fueron cuantificadas, resueltas por SDS-PAGE y analizadas mediante inmunotransferencia (*Western blot*) empleando anticuerpos específicos contra AMPK total y fosforilado (Thr172). La activación de AMPK se definió como el aumento en la relación pAMPK/AMPK total respecto de la condición control ([ver sección 3.3.4.](#)).

Activación de AMPK con YM y CGA.

Nuevamente, sobre cultivos sembradas a una densidad de 6×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos. 24hs post sembrado y a una densidad menor a la confluencia, fueron expuestas a extracto de YM o CGA en concentraciones determinadas previamente en ensayos exploratorios

(Hauché P., 2020). El extracto de YM fue administrado en una dilución equivalente a 1 µl de extracto por cada 500 µl de medio de cultivo (condición denominada YM 1X), mientras que el CGA (Sigma®, cat. n° C3878) se aplicó en concentraciones equivalentes a la presente en el extracto (1,01mM, denominada 1X) en base a la caracterización del extracto por HPLC. Como control positivo de activación de AMPK se empleó metformina clorhidrato (Supelco®, cat. n° PHR 1084-500MG), disuelta en agua destilada, filtrada y almacenada a 4 °C (Rena, Grahame y Pearson, sin fecha; Zhou *et al.*, 2001). Los pocillos no tratados fueron utilizados como controles sin tratamiento en todos los ensayos experimentales.

Tratamiento		Concentración / Dilución	Medio	Tiempo de Exposición	Técnica asociada
YM	Yerba Mate	1X = 1ul de extracto por cada 500ul de medio.	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	30 min	Western blot (pAMPK/AMPK)
	Ácido Clorogénico	1X = 1,01 mM en agua destilada.	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	30 min	Western blot (pAMPK/AMPK)
Met	Metformina (Control de activación de AMPK)	50mM en agua destilada	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	30 min	Western blot (pAMPK/AMPK)
Ctrl	Control sin tratamiento	-	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	-	Western blot (pAMPK/AMPK)

Tabla 3.1.2.a: Resumen de los tratamientos experimentales.

Al finalizar los tratamientos, todas las condiciones de cada placa fueron lisadas en paralelo para evitar sesgos derivados de diferencias en el tiempo de procesamiento ([ver sección 3.3.1.](#)). Las proteínas extraídas fueron cuantificadas, resueltas por SDS-PAGE y analizadas mediante inmunotransferencia (*Western blot*) empleando anticuerpos específicos contra AMPK total y fosforilado (Thr172). La activación de AMPK se definió como el aumento en la relación pAMPK/AMPK total respecto de la condición control ([ver sección 3.3.4.](#)).

Niveles de expresión de AMPK con YM y CGA.

Para el desarrollo de los ensayos de cuantificación de la expresión génica se emplearon cultivos de SH-SY5Y sembrados en placas de 12 pocillos (3,5 cm²) a una densidad de aproximada de 4×10⁵ células/pocillo. 24hs post sembrado y a una confluencia menor al 100% se incubaron por 30 minutos con YM, CGA y Metformina de manera análoga a lo realizado en la sección previa ([tabla 3.1.2.b](#)). Inmediatamente después de completado en ensayo se continuó con el protocolo de extracción de RNA y análisis vía RTqPCR ([ver sección 3.6](#)).

Tratamiento		Concentración / dilución	Medio	tiempo de exposición	Técnica asociada
YM	Yerba Mate	1X = 1ul de extracto por cada 500ul de medio.	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	30 min	RTqPCR (AMPK y HPRT1)
	Ácido Clorogénico	1X = 1.01 mM en agua destilada.	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	30 min	RTqPCR (AMPK y HPRT1)
Met	Metformina (Control de activación de AMPK).	50mM en agua destilada	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	30 min	RTqPCR (AMPK y HPRT1)
Ctrl	Control sin tratamiento.	-	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	-	RTqPCR (AMPK y HPRT1)

Tabla 3.1.2.b: Resumen de los tratamientos y condiciones experimentales empleadas en la aproximación por RTqPCR. HPRT1 fue utilizado como gen de referencia.

Evaluación de la autofagia mediante LC3 en SH-SY5Y.

Para esta aproximación experimental y con el fin de abordar el OE2 se emplearon cultivos de células SH-SY5Y tratados con YM y CGA, destinados a ser analizados por inmunocitoquímica (ICC). Para dicho fin, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos redondos y estériles de 12 mm de diámetro (Heinz Herenz, Cat N°1051204) en placas de 24 pocillos (1,9 cm²) a una densidad de aproximada de 2×10⁵ células/pocillo. Como conclusión de ensayos exploratorios no mostrados en este trabajo, se determinó que el ensayo se realice 24hs post sembrado y a una confluencia menor al 100%, con incubaciones de 2 horas con YM y CGA ([tabla 3.1.2.c](#)).

Como control positivo de la activación de la autofagia se realizó un protocolo de hambreado (“*starving*” en inglés) comúnmente empleado y aceptado en la disciplina (Mizushima, Yoshimori y Levine, 2010). El mismo se basa en remover el medio completo de cultivo e incubar las células en EBSS por 2hs. Como control sin tratamiento se utilizaron pocillos con medio completo sin tratar.

Tratamiento		Concentración / dilución	Medio	tiempo de exposición	Técnica asociada
YM	Yerba Mate	1X = 1ul de extracto por cada 500ul de medio.	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	2h	ICC (LC3 y DAPI)
CGA	Ácido clorogénico	1X = 1,01 mM en agua destilada.	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	2h	ICC (LC3 y DAPI)
S	Hambreado o Starving, Control positivo	-	Medio EBSS	2h	ICC (LC3 y DAPI)
Ctrl	Control sin tratamiento	-	Medio de cultivo completo (DMEM/F12)	-	ICC (LC3 y DAPI)

Tabla 3.1.2.c: Resumen de los tratamientos y condiciones experimentales empleadas en la aproximación por ICC contra LC3.

Inmediatamente después de completado el ensayo se continuo con el protocolo de ICC ([ver sección 3.4.1.](#)). Luego, a partir de las muestras obtenidas se obtuvieron imágenes mediante microscopia confocal de fluorescencia ([ver sección 3.5.1.](#)). A partir de dichas imágenes, se cuantificó el número de *foci* LC3 positivos por área neuronal.

3.2.3. H4

El cultivo de la línea H4 fue realizado en las condiciones previamente mencionadas ([ver sección 3.2.](#)) en medio de suero reducido Opti-MEM™ I, suplementado con GlutaMAX™ (Gibco®, Cat. n° 51985-025), con FBS 10% (Suero Fetal Bovino 10%; Anprotec® Alemania; Cat n°: S00402000K), L- Glutamina 2 mM (Gibco®, Cat n° 25030-081) y con Penicilina-Estreptomicina sulfato 1% (stock: 10,000 UI/ml Penicilina G sódica, 10,000 µg/ml Estreptomicina Sulfato, Gibco®, Cat n° 15140-122).

3.2.4. Transfecciones.

Con el objeto de desarrollar el modelo de agregación de α -Syn (α -synuclein-T/V5-synphilin-1) se desarrolló la cotransfección de células H4 con los plásmidos pcDNA3.1-SynT y pcDNA3.1-Synphilin-1 (V5-Synphilin-1). El plásmido pcDNA3.1-SynT codifica la variante artificial SynT de α -sinucleína, diseñada para potenciar la agregación *in vitro* (Lázaro *et al.*, 2016; Lage *et al.*, 2025). El plásmido pcDNA3.1-Synphilin-1 (V5-Synphilin-1) es la versión con etiqueta V5 de la proteína synphilin-1, y actúa facilitando la formación de inclusiones junto con SynT (Lage *et al.*, 2024). En este contexto se forman inclusiones celulares similares a los cuerpos de Lewy (Guerreiro *et al.*, 2013; Delenclos *et al.*, 2019).

Para la cotransfección, las células H4 fueron sembradas en placas de 12 pocillos (3,5 cm²) sobre cubreobjetos estériles de 15mm de diámetro (Heinz Herenz, Cat N°1051206) a una densidad de aproximada de 1×10^5 células/pocillo. Se cotransfectaron con plásmidos pcDNA3.1-SynT y pcDNA3.1-Synphilin-1 (V5-Synphilin-1) en proporción equimolar (1:1), utilizando FuGENE® HD (Promega®, Cat n°: E2311) como reactivo transfeccional con una relación ADN:FuGENE de 1:3, según protocolos previamente publicados (Lázaro *et al.*, 2016). Brevemente, se mezclaron 1 μ g de cada plásmido con el reactivo de transfección (1:3 ADN:FuGENE) en medio Opti-MEM™ libre de suero y antibióticos, incubando por 30 min a RT antes de añadir a las células. 24 hs post-transfección las células se expusieron a extracto de YM o CGA por el agregado directo de estos en el medio de cultivo. 48 hs post-transfección (24hs post-tratamiento) fueron fijadas para análisis por inmunocitoquímica de α -Syn ([ver sección 3.4.2.](#)).

3.1. Western blot.

3.1.4. Obtención de las muestras.

Luego de los tratamientos experimentales, las células se resuspendieron con tripsina 0,05% (Trypsin 1:250 powder, Gibco®; cat n°: 27250018), se colectaron en eppendorfs estériles y se centrifugaron a 800g 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 fosfatasa 0,1 M (Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail EDTA-Free; Thermo Scientific®; Cat n°: 78441). Luego de agitar en frío para disolver el pellet, se centrifugó a 4°C, 9,300g por 15 min. Se descartó el pellet (*debris* celular) y se conservó el sobrenadante obtenido, correspondiente al contenido celular. Luego, se

desarrolló el dosaje de proteínas totales presente en las muestras mediante el método de Bradford, o bien se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

3.1.5. Cuantificación de proteínas: método de Bradford.

El dosaje de proteínas de cada muestra se realizó mediante el método de Bradford. Para este fin, en cada oportunidad se desarrolló la correspondiente curva de calibración con BSA (SigmaAldrich®; Cat n°: A-3912) en BL, por 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. Las concentraciones de proteína fueron inferidas mediante el uso de la Ley de Lambert Beer.

3.1.6. SDS-PAGE e inmunotransferencia.

Dado que en las proteínas analizadas se encuentran en el rango de 70 - 40 kDa se emplearon geles de poliacrilamida con 1mm de espesor y 12% de acrilamida/bisacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1; Cat n°: #1610158). 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 30 min. Los geles armados se montaron dentro de la cuba de electroforesis (Mini-PROTEAN® Tetra cel; BioRad Laboratories inc.®; Cat n°: #1658004).

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 desnaturalizaron a 95 °C por 10 min. Luego, las muestras fueron sembradas en los geles con el uso en paralelo de un marcador de peso molecular (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker-Full Range; Amersham®; Cat n°: RPN800E).

La corrida electroforética 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 , Bio-Rad Laboratories inc.[®]; Cat n°: 162-0112). Para esto, se dispuso del *cassette* de transferencia (Mini Trans-Blot[®] Module; Bio-Rad Laboratories inc.[®]; Cat n°: 1703935) siguiendo las indicaciones del fabricante, habiendo equilibrado 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 todo el proceso. 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 10 y 15 minutos para visualizar las proteínas y chequear la transferencia. Después, se lavó con agua destilada el colorante. Por otra parte, y con el mismo fin, los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie (Coomassie Blue R250 o Coomassie Blue G, 10%, metanol 50%, ac. Acético 10%) y diferenciados con solución desteñidora (metanol 40% y ácido acético 7%).

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.

La incubación con anticuerpo primario se realizó durante la noche a 4° C en agitación. Luego, la incubación anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano picante (HRP) se realizó a temperatura ambiente y agitación por 2 horas ([tabla 3.2.6](#)).

ANTICUERPOS PRIMARIOS (Ac1°)	FABRICANTE	DILUCIÓN
<i>pAMPK: Anti-AMPK alpha 1 (phospho T183) + AMPK alpha 2 (phospho T172)</i>	<i>Abcam®, cat n°: ab133448</i>	<i>1/3000</i>
<i>AMPK total: AMPK alpha 1/2</i>	<i>Santa Cruz®; Cat n°: sc-74461</i>	<i>1/1000</i>
<i>Actina: Anti-β-actina</i>	<i>Sigma-Aldrich®; cat n°: A2066, RRID: AB_476693</i>	<i>1/1000</i>

ANTICUERPOS SECUNDARIOS (Ac2°)	FABRICANTE	DILUCIÓN
<i>anti-rabbit IgG (H + L) conjugado a HRP</i>	<i>Invitrogen®, cat no° A16035</i>	<i>1/3000</i>
<i>anti-mouse IgG (H + L) conjugado a HRP</i>	<i>Invitrogen®, cat no° A16017</i>	<i>1/3000</i>

Tabla 3.2.6: Resumen de los anticuerpos primarios y secundarios empleados en la aproximación experimental por *Western blot*.

3.1.7. Obtención de imágenes y análisis densitométrico.

La inmunotransferencia se reveló por quimioluminiscencia con solución ECL (Amersham ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent; Cytiva®; Cat n°: RPN2235), en el equipo GeneGnome XRQ (Syngene®). Las imágenes fueron obtenidas en formato “.TIFF” cuidando en todos los casos obtener una señal no saturada. La densitometría de las bandas obtenidas se realizó mediante el análisis de las imágenes con el software Fiji/ImageJ y AlphaEase®FC (FluorChem® versión 4.1.0; Alpha innotech Corporation®). El análisis de datos y los gráficos presentados se realizaron con el software Graphpad Prism (GraphPad® Software, versión 8.0). Para la preparación de figuras y paneles, se empleó Adobe Photoshop (Adobe Inc.®), exclusivamente para el ensamblado de imágenes y ajustes globales de brillo y contraste, sin modificar la información original.

Como se mencionó previamente, la activación de AMPK depende de la fosforilación en el residuo treonina 172 (Thr172) de su subunidad catalítica α ([ver sección 1.4.](#)). Por este motivo, en aproximaciones experimentales la activación de AMPK suele evaluarse mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos frente a la forma fosforilada (p-AMPK Thr172). Sin

embargo, dado que la cantidad total de AMPK puede variar entre muestras, la interpretación más confiable se obtiene al calcular la relación p-AMPK/AMPK total. Esta normalización permite discriminar si los cambios observados corresponden a una mayor activación de la quinasa y no simplemente a diferencias en la expresión basal de la proteína (Jeon, 2016).

Los resultados se expresaron como la relación pAMPK/AMPK normalizada por β -actina y posteriormente relativizada al tratamiento control. Esta estrategia permite corregir posibles variaciones en la cantidad total de proteína cargada en el *Western blot* y, al mismo tiempo, expresar la activación de AMPK de manera proporcional a su nivel total en cada muestra. La normalización respecto a β -actina asegura la comparabilidad entre réplicas y condiciones experimentales, mientras que la relativización al control facilita la interpretación de los cambios relativos en la fosforilación de AMPK inducidos por los tratamientos.

3.1.8. Pseudostripping.

Para lograr revelar las señales de pAMPK y AMPK total de manera independiente se realizó un protocolo de *pseudostripping* entre revelados. Primero se incubó y reveló la proteína fosforilada, luego se incubaron las membranas durante 90 minutos con una solución de H_2O_2 30 volúmenes en TBS a temperatura ambiente. El *pseudostripping* inactiva la peroxidasa del anticuerpo secundario previamente empleado. Como control de técnica se verificó que la señal de la membrana fuera nula ante el agregado de ECL. Luego, se desarrolló la incubación y revelado de la proteína total.

3.2. Inmunocitoquímica.

3.2.4. Células SH-SY5Y para evaluar autofagia mediante detección de LC3.

Luego de los tratamientos experimentales, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente, seguido de permeabilización con Triton X-100 0,2% (SigmaAldrich®). Las células fueron bloqueadas en FBS 10% (Internegocios®) /1xPBS (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 101,4 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 16,7 mM KH_2PO_4), y luego incubadas con anticuerpo primario durante la noche. Luego fueron incubadas con anticuerpo secundario por 2 hs a temperatura ambiente, incubadas con el marcador nuclear DAPI (Sigma®; D9542; 1/1000) disuelto en PBS y Finalmente fueron montadas con PVA-DABCO® (Supelco®, Cat n° 10981) para su posterior análisis por microscopía ([ver sección 3.5.1.](#); [tabla 3.3.4.](#)).

REACTIVO		FABRICANTE	DILUCIÓN
Anticuerpo 1°	LC3B	Cell Signaling Technology: #2775S	1/500
Anticuerpo 2°	Anti-Rb (IgG) Alexa-Fluor 488.	Molecular probes: #A-11034	1/1000
Marcador nuclear:	DAPI	Sigma: #D9542	1/1000

Tabla 3.3.4: Resumen de los anticuerpos y marcadores empleados en las inmunocitoquímicas contra LC3 en células SH-SY5Y.

3.2.5. Células H4 cotransfectadas con pcDNA3.1-SynT y pcDNA3.1-Synphilin-1 para evaluar agregados de α -Syn.

Luego de la cotransfección las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente, seguido de permeabilización con Triton X-100 0,5% (SigmaAldrich®). Las células fueron bloqueadas en BSA 3% (SigmaAldrich®; Cat n°: A-3912) /1xPBS, y luego incubadas con anticuerpo primario durante la noche. Luego fueron incubadas con anticuerpo secundario por 2 hs a temperatura ambiente, incubadas con el marcador nuclear DAPI (Sigma®; D9542; 1/1000) disuelto en PBS y Finalmente fueron montadas con PVA-DABCO® (Supelco®, Cat n° 10981) para su posterior análisis por microscopía ([tabla 3.3.5](#)).

REACTIVO		FABRICANTE	DILUCIÓN
Anticuerpo 1°	Anti- α -Synuclein	BD Transduction Laboratories: #610787	1/1000
Anticuerpo 2°	Anti-Ms (IgG) Alexa-Fluor 488.	Invitrogen: #A-21202	1/1000
Marcador nuclear:	DAPI	Sigma: #D9542	1/1000

Tabla 3.3.5: Resumen de los anticuerpos y marcadores empleados en las inmunocitoquímicas en células H4 para evaluar agregados de α -Syn.

3.3. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía.

3.3.4. Células SH-SY5Y para evaluar autofagia.

Adquisición de imágenes:

Las imágenes fueron capturadas en un microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM980 Axio Observer.Z1 / 7 (Centro de Microscopía de Fluorescencia “Gregorio Weber”), con objetivo C Plan-Apochromat 63X para aceite de inmersión (NA=1.42). La adquisición fue hecha con el software de microscopía ZEN®, y las imágenes fueron visualizadas y analizadas utilizando el software ImageJ.

Criterio de cuantificación:

Para la cuantificación de *focis* positivos de LC3, se utilizó la función de búsqueda de máximos del software Fiji/ImageJ, que permite detectar focos de pixeles de máxima señal en un canal determinado. Se delimitó el contorno celular mediante segmentación manual y/o automática, para asegurar que los *focis* cuantificados correspondieran exclusivamente a cada célula analizada. La variable cuantificada fue la cantidad de *focis* positivos de LC3 por célula. Para cada condición experimental, se analizaron imágenes correspondientes a un mínimo de 20 células individuales, obtenidas a partir de al menos 3 réplicas experimentales independientes.

3.3.5. Células H4 cotransfectadas con pcDNA3.1-SynT y pcDNA3.1-Synphilin-1 para evaluar agregados de α -Syn.

Adquisición de imágenes:

Las imágenes fueron captadas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Observer.Z1/7 con objetivo EC-Plan-Neofluar 100X/1,30 Oil M27. La adquisición fue hecha con el software de microscopía ZEN®, y las imágenes fueron visualizadas y analizadas utilizando el software ImageJ.

Criterio de cuantificación:

Para cada condición experimental, se analizaron las siguientes variables:

- Número de agregados de α -Syn por célula: se contabilizó el total de agregados visibles por célula, considerando como agregado cualquier señal de fluorescencia positiva y discreta correspondiente a α -Syn (Alexa 488), segmentada de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación.
- Tamaño de agregados de α -Syn por célula: se midió el área de cada agregado identificado dentro del contorno celular, expresada en área en pixeles, utilizando la función de análisis de partículas en Fiji/ImageJ.

Para la delimitación de las regiones de interés (ROI), se aplicaron los siguientes criterios:

- Contorno celular: se definió manualmente utilizando un enfoque combinado de umbralización y la herramienta *Magic Wand* de Fiji/ImageJ, sobre el canal correspondiente. Como α -Syn tiene además una distribución citoplasmática se pudo usar para este fin la señal del canal correspondiente a Alexa 488 sin necesidad de emplear un marcador citoplasmático.
- Contorno de agregados: los agregados de α -Syn se segmentaron empleando el método de umbral automático de Otsu, aplicado al canal específico de fluorescencia correspondiente a la proteína α -Syn (Alexa 488).

Para cada condición experimental, se analizaron imágenes correspondientes a un mínimo de 50 células individuales, obtenidas a partir de al menos 3 réplicas experimentales independientes.

3.4. RTqPCR.

Células SH-SY5Y para evaluar niveles de expresión de AMPK y genes vinculados a la autofagia.

Para el desarrollo de los ensayos de expresión génica diferencial se emplearon cultivos de SH-SY5Y. Las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos (3,5 cm²) a una densidad de aproximada de 4×10^5 células/pocillo.

Extracción de RNA

Luego de los tratamientos experimentales propuestos se continuo con la extracción de RNA. Se desarrollo una extracción de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo con el reactivo TRIzol® (Sigma Aldrich®; Cat n°: 93289) /Bio-Zol® (Productos Bio-Logicos®; Cat n°: RA02). Brevemente el protocolo de extracción se desarrolló de la siguiente manera: al finalizar los tratamientos experimentales se descartó el medio de cultivo y se adicionaron 750 μ l de TRIzol® por pocillo. Las células fueron resuspendidas mediante pipeteo repetido (“*up and down*”) y transferidas a tubos Eppendorf estériles y libres de DNAsas y RNAsas. Las muestras pudieron conservarse a -80 °C hasta su procesamiento o bien ser procesadas en el mismo momento. Para continuar con el aislamiento, las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente (RT), tras lo cual se adicionaron 200 μ l de cloroformo (CHCl₃). Luego de agitar enérgicamente durante 15 segundos y dejar reposar 2-3 minutos a RT, se centrifugaron a 12.000 g durante 20 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior (aproximadamente 300-400 μ l) fue cuidadosamente transferida a un nuevo tubo estéril, evitando la interfase rica en ADN genómico. A continuación, se agregó una cantidad de volumen equivalente de 500 μ l de isopropanol frío (aproximadamente a 0°C), mezclando por inversión. Las muestras se incubaron a -20 °C durante la noche o por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron nuevamente a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C. El pellet de ARN fue lavado con 1 ml de etanol al 75 % en agua DEPC, seguido de una nueva

centrifugación a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. Finalmente, el sobrenadante fue descartado, y el pellet se secó a temperatura ambiente durante 45-60 minutos, antes de su resuspensión en 10 µl de agua DEPC. La calidad y concentración del ARN fueron evaluadas mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000®; Thermo Fisher Scientific®) y por electroforesis en gel de agarosa. Las muestras fueron o bien inmediatamente empleadas para la obtención de cDNA o bien almacenadas a -80 °C hasta su utilización.

Control de calidad del ARN.

La pureza e integridad del ARN extraído fueron evaluadas mediante métodos espectrofotométricos y electroforéticos. Para determinar la pureza y la concentración, se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop 2000® (Thermo Fisher Scientific®). Se registraron las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 para cada muestra. Una relación A260/A280 entre 1,8 y 2,1 se consideró indicativa de ARN puro libre de contaminación proteica, mientras que una relación A260/A230 superior a 1,8 se consideró aceptable en términos de ausencia de contaminantes como fenoles, sales o compuestos orgánicos (Manchester, 1995). La integridad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Las muestras se visualizaron bajo luz UV para verificar la presencia de las bandas ribosomales 28S y 18S. La integridad se consideró adecuada cuando ambas bandas eran nítidas y la banda 28S presentaba una intensidad aproximadamente dos veces mayor que la de 18S, sin presencia de “smearing” o degradación, y sin presencia de ADN genómico evidenciado como bandas intensas a la altura de la línea de siembra.

Síntesis de cDNA (Retrotranscripción).

La síntesis de cDNA se realizó empleando el kit comercial Taq Man Reverse Transcription® (Applied Biosystems; Cat n°: N8080234) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

qPCR.

Para la PCR cuantitativa se utilizó una dilución 1/25 del cDNA obtenido, empleando el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix® (Bio-Rad®, Cat n°: 1725121) siguiendo las indicaciones del fabricante. Como soporte se emplearon placas de 96 pocillos para PCR (SSIbio®; Cat n°: 3426-00) selladas con films UltraClear Sealing Films® (Axigen®; Cat n°: UC-500). El equipo empleado fue un termociclador en tiempo real StepOnePlus™ real time PCR® (Applied Biosystems®). Cada muestra fue corrida por triplicado técnico. En la [tabla 3.6.a](#) se detallan los primers específicos empleados, en todos los casos específicos para humanos.

El protocolo de ciclado térmico fue: 1 ciclo de desnaturalización inicial: 95 °C por 10 min; 40 ciclos de: 95 °C por 15 s y 59 °C por 1 min; finalmente se realizó una curva de melting (o curva de disociación final) para verificar la especificidad del amplicón.

Gen	Forward	Reverse
AMPK alfa1	5'-AGGAAGAATCCTGTGACAAGCAC-3'	5'-CCGATCTCTGTGGAGTAGCAGT-3'
ATG7	5'-TGAGTTGACCCAGAAGAAGCT-3'	5'-CCCAGCAGAGTCACCATTGT-3'
ATG14	5'-CAATCGAGGAAGTAAAGACGG-3'	5'-TCGTCCTGAGAGGTAAGTTG-3'
NBR1	5'-GGTATCCATCAACAGTCAAGG-3'	5'-CGTTTTGCTCCTACAACCTGG-3'
ULK1	5'-ACAAGAAGAACCTCGCCAAG-3'	5'-TTCCTTCAGGATTTTGATTTC-3'
HPRT1	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'

Tabla 3.6.a: Secuencia de los primers utilizados para el presente trabajo, tomados de Bordi *et al.*, 2021.

Análisis de datos

Los niveles relativos de expresión génica se calcularon utilizando el método $\Delta\Delta C_t$, normalizando con respecto al gen de referencia (HPRT1). Los resultados se expresaron como las veces de cambio ("*fold change*") respecto del grupo control. Se en todos los casos realizaron al menos tres réplicas biológicas independientes salvo se indique lo contrario.

3.5. Análisis de datos y estadística.

Análisis de los datos de densitometría obtenidos por Western blot.

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/AMPK/ β -actina. Dichas relaciones fueron a su vez normalizadas 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.

El análisis estadístico de los niveles proteicos se efectuó mediante un ANOVA de una vía, previa verificación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. Las comparaciones post hoc se realizaron utilizando los test de Tukey o Dunnett, según correspondiera. En todos los casos, se consideró un umbral de significancia de $p < 0,05$. El procesamiento y análisis de los datos se efectuó utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad® Software, versión 8.0).

Análisis de expresión génica por RT-qPCR

Los niveles relativos de expresión génica se cuantificaron mediante RT-qPCR. Cada muestra fue analizada en triplicado técnico, y el gen HPRT1 se empleó como gen de referencia por su estabilidad reportada en este modelo celular y en estudios previos (Bordi *et al.*, 2021). El análisis cuantitativo se realizó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001), expresando los resultados como niveles relativos de expresión génica normalizados respecto a HPRT1 y relativizados al grupo control (células sin tratar). Para cada punto experimental se consideraron tres réplicas biológicas independientes, obtenidas en días distintos.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, verificando los supuestos de normalidad y homocedasticidad con los test de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante pruebas post hoc de Tukey o Dunnett, según correspondiera. En todos los casos se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism (GraphPad® Software, versión 8.0).

4. RESULTADOS

4.1. Activación de AMPK en células SH-SY5Y tratadas con extracto de yerba mate y ácido clorogénico.

Con el fin de evaluar si la yerba mate (YM) y/o el ácido clorogénico (CGA) inducen la activación de AMPK, se analizaron los niveles de fosforilación de esta quinasa en células SH-SY5Y tratadas con extracto de YM o con CGA, tal y como se detalló previamente ([ver sección 3.1.2.](#)). Brevemente, la activación de AMPK depende principalmente de la fosforilación en el residuo treonina 172 (Thr172) de su subunidad catalítica α ([ver sección 1.4.](#)). Es principalmente por este motivo que en aproximaciones experimentales la activación de AMPK suele evaluarse mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos contra la forma fosforilada (p-AMPK Thr172, [tabla 3.2.6](#)).

En base a la metodología que se describió previamente ([Ver sección 3.2.7.](#)), para medir los niveles de p-AMPK y poder atribuir los cambios observados únicamente a modificaciones postraduccionales y no a un aumento neto en la expresión de AMPK, se cuantificó la relación p-AMPK/AMPK (Jeon, 2016). Además, se utilizó β -actina como control de carga interno. Los resultados se presentan entonces como la razón pAMPK/AMPK, relativizada por β -actina y normalizada en relación con el tratamiento control (*células sin tratar*). Este criterio permite controlar variaciones en la carga total de proteína y cuantificar de forma más precisa la activación relativa de AMPK en cada condición experimental. La normalización frente a β -actina garantiza la consistencia entre réplicas, mientras que la relativización al control facilita la comparación e interpretación de los cambios en la fosforilación de AMPK inducidos por los distintos tratamientos.

Como control positivo de activación de AMPK se trató con metformina clorhidrato (Met; [ver sección 1.4.](#); [ver sección 3.1.2.](#)). Como se introdujo previamente, la metformina se acepta como un activador farmacológico de esta quinasa. Activa indirectamente AMPK mediante la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que conduce a un aumento en la relación AMP/ATP y, en consecuencia, a la fosforilación de AMPK en la Thr172, reflejando su activación funcional (Zhou *et al.*, 2001; Hardie, Ross y Hawley, 2012). Diversos estudios han demostrado que este mecanismo se encuentra conservado en distintos modelos y tipos celulares, incluyendo la línea SH-SY5Y (Zhou *et al.*, 2001; Kalender *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2016; Paudel *et al.*, 2020).

De esta forma, las células SH-SY5Y fueron incubadas con Metformina disuelta en el medio de cultivo durante 30 minutos. En línea con lo antes dicho, se observa que la metformina produjo un aumento significativo en los niveles de pAMPK/AMPK/ β -actina en las células SH-SY5Y (*figura 4.1.a.(a)*). En nuestro modelo experimental, dicho aumento no se asoció a modificaciones detectables en la cantidad total de AMPK (*figura 4.1.a.(b)*), lo que indica que el efecto observado se debe principalmente a un cambio en el estado de fosforilación de la proteína, más que a una alteración en su expresión o estabilidad. Esta distinción resulta fundamental, ya que permite atribuir la respuesta directamente a la activación postraducciona de AMPK y no a un cambio transcripcional o traduccional inespecífico.

Confirmar que la metformina activa AMPK en las condiciones de cultivo planteadas constituye un resultado relevante por varios motivos. En primer lugar, valida el funcionamiento de la vía de señalización en las células SH-SY5Y, en particular en el clon de SH-SY5Y empleado en nuestro laboratorio. Si bien la activación de AMPK por metformina ha sido reportada extensamente en hepatocitos, adipocitos y células musculares, su demostración en células neuronales humanas es menos frecuente y requiere ser verificada en cada paradigma experimental, dada la heterogeneidad en la respuesta metabólica entre tipos celulares (Musi *et al.*, 2002; Stephenne *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2016). En este sentido, estos resultados confirman que la maquinaria de activación de AMPK se encuentra funcional en nuestro clon de las SH-SY5Y y responde adecuadamente al estímulo farmacológico.

Por otro lado, establecer la capacidad de metformina para inducir la activación de AMPK en este modelo permitió disponer de un control positivo consistente y reproducible, frente al cual comparar el efecto de los tratamientos posteriores con extracto de YM y con CGA. Si bien se observó cierta variabilidad y las diferencias no alcanzaron significancia estadística en todos los casos, la tendencia fue consistente a lo largo de las réplicas experimentales, de modo que este control positivo se consolidó con la repetición de los ensayos.

En términos metodológicos, esta replicación experimental constituyó un paso clave para validar la sensibilidad del sistema de detección empleado (*Western blot*) y asegurar que los cambios observados en las condiciones posteriores pudieran ser interpretados con confianza como modulaciones reales de la actividad de AMPK. Así, el tratamiento con metformina funcionó no sólo como referencia funcional, sino también como punto de anclaje conceptual para explorar la hipótesis de que compuestos naturales presentes en la YM podrían inducir una respuesta similar.

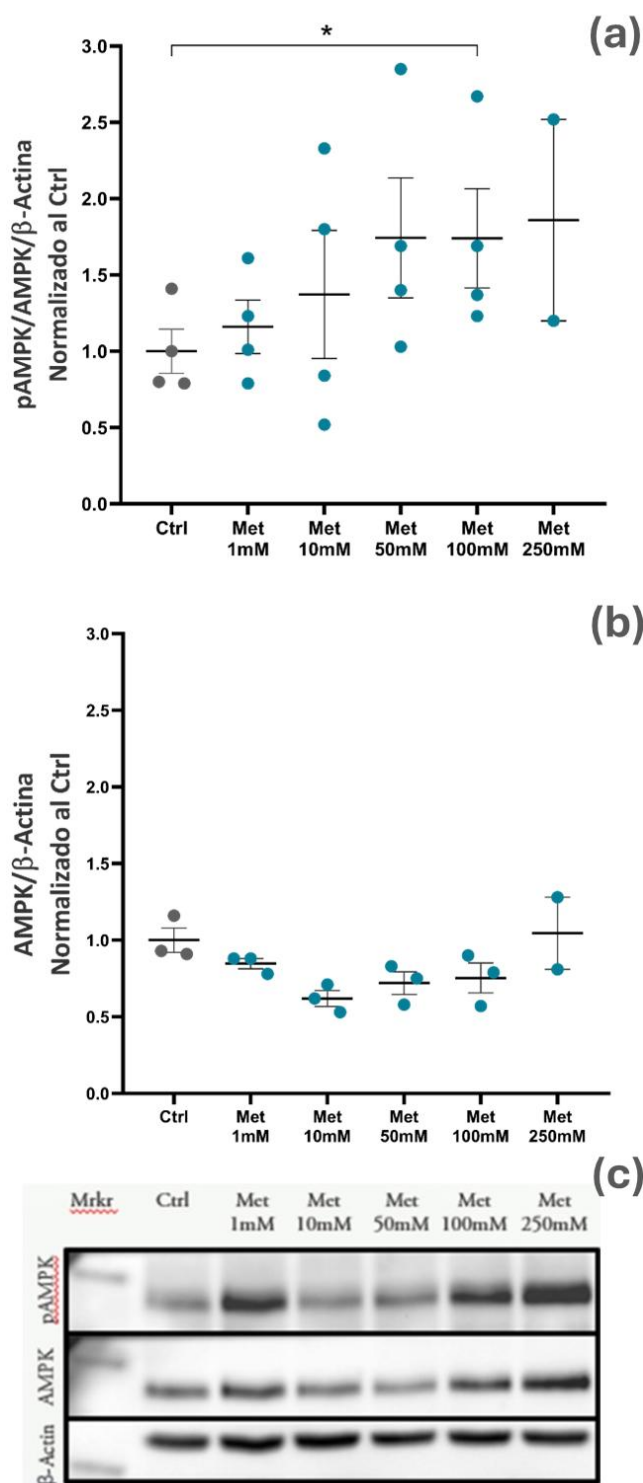


Figura 4.1.a: Validación experimental de que la metformina promueve la activación de AMPK en células SH-SY5Y. Células SH-SY5Y tratadas con Metformina comercial a distintas concentraciones. (a) Cuantificación de la relación pAMPK/AMPK/β-Actina normalizada al tratamiento control. (b) Niveles de AMPK relativizados respecto al control de carga interno, en este caso β-Actina, normalizados al tratamiento control. (c) Western blot representativo mostrando las bandas correspondientes a pAMPK, AMPK y β-Actina. Los valores representan el promedio ± SEM de al menos tres experimentos independientes (salvo en el caso de Met 250mM donde n=2). Met: metformina; Ctrl: control de células sin tratar. (*) ANOVA de una vía, $p < 0,05$, (ns) sin diferencias significativas.

De esta forma y teniendo en consideración lo antes dicho, estos resultados iniciales refuerzan la pertinencia de utilizar este sistema experimental para evaluar la capacidad moduladora de otros compuestos sobre la vía de señalización de AMPK. Haber replicado exitosamente esta observación representó, por lo tanto, el puntapié inicial que dio sustento a la siguiente etapa del trabajo: la caracterización comparativa de la activación de AMPK inducida por YM y/o CGA.

Tal como fue introducido previamente, AMPK es un regulador central del metabolismo energético celular y es un nodo de integración entre señales metabólicas y mecanismos de supervivencia neuronal ([ver sección 1.4.](#)). Diversos compuestos naturales de origen vegetal — como el resveratrol, la quercetina y las catequinas del té verde— han mostrado la capacidad de activar AMPK y promover efectos neuroprotectores y antioxidantes ([ver sección 1.1.3.](#)). Además, se ha demostrado que el CGA promueve la activación de AMPK en modelos no neuronales ([ver sección 1.2.2.](#)). Sin embargo, no existe evidencia reportada sobre estos efectos en modelos neuronales, y en particular en la línea SH-SY5Y.

En este contexto, se planteó que la YM y/o el CGA, podrían modular la vía de AMPK en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Con este objetivo se realizaron ensayos de *Western blot* para evaluar los niveles proteicos relativos de AMPK total y su forma fosforilada (*pAMPK Thr172*). Nuevamente se empleó el criterio de cuantificación previamente descrito (ver comentarios previos de esta sección y [ver sección 3.2.7.](#)). Los resultados se representaron entonces como la razón *pAMPK/AMPK* relativizado por la marca de β -actina y normalizado en relación con el tratamiento control (células sin tratar).

Al tratar los cultivos de las células SH-SY5Y por 30 minutos con extracto de YM a una concentración de 1 μ l de extracto por cada 500 μ l de medio de cultivo (YM) se observó un aumento significativo en la marca de *pAMPK/AMPK*/ β -actina con respecto al control no tratado, y por lo antes dicho, un consecuente aumento en su activación ([figura 4.1.b.\(a\)](#)). Este resultado va en línea con la hipótesis de que ciertos compuestos presentes en la YM tienen el potencial de modular vías metabólicas relevantes en el contexto de la supervivencia neuronal. Dado que la activación de AMPK constituye un evento temprano de señalización intracelular frente a distintos estímulos metabólicos y de estrés celular, el cambio detectado tras un breve período de exposición sugiere que la YM ejerce un efecto rápido sobre esta vía de señalización.

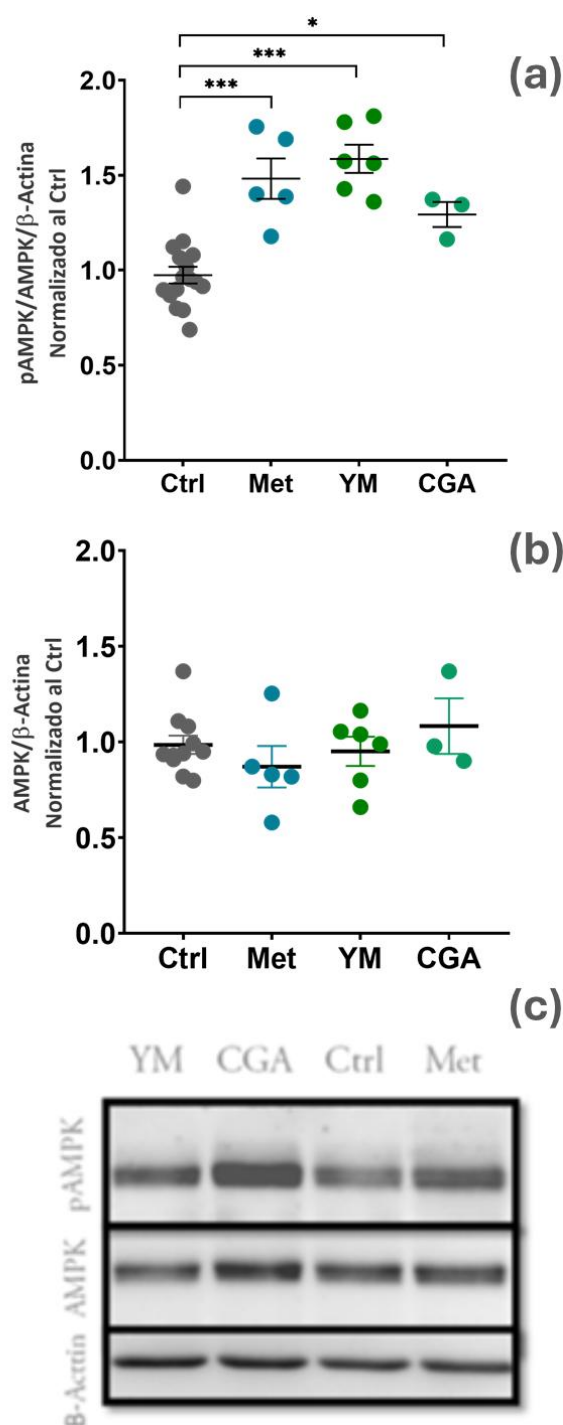


Figura 4.1.b: La yerba mate y el ácido clorogénico activan AMPK. Células SH-SY5Y incubadas con extracto de yerba mate y/o ácido clorogénico por 30min. (a) Cuantificación de la relación pAMPK/AMPK/β-Actina normalizada al tratamiento control. (b) Niveles de AMPK relativizados respecto al control de carga interno β-Actina, normalizados al tratamiento control. (c) *Western blot* representativo mostrando las bandas correspondientes a pAMPK, AMPK y β-Actina. YM: extracto de yerba mate en relación 1ul cada 500ul de medio de cultivo completo; CGA: ácido clorogénico en concentración equivalente a la presente en el extracto (1,05mM); Met: Metformina 100mM; Ctrl: control experimental de células sin tratar. Los valores representan el promedio $\pm$ SEM de al menos tres replicas experimentales independientes. Tanto en (a) como en (b): ANOVA de una vía, (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0,0001$, (ns) sin diferencias significativas.

De manera similar, el tratamiento con ácido clorogénico (CGA), también indujo un aumento significativo en la relación pAMPK/AMPK/ β -actina, en comparación con las células control no tratadas cuando se utilizó a una concentración equivalente a la presente en el extracto (1,05 mM; [Ver sección 3.1.](#) y [figura 4.1.b.\(a\)](#)). Este resultado, apoya la idea de que el CGA podría ser, al menos en parte, responsable del efecto observado con el extracto completo. La coincidencia en la respuesta entre el extracto de YM y el CGA puro va en el mismo sentido que la hipótesis de que los polifenoles presentes en la YM actúan como moduladores de AMPK, posiblemente a través de mecanismos similares a los descritos en los modelos no neuronales ([Ver sección 1.2.2.](#)). La interpretación de que este aumento refleja una activación postraducciona de AMPK y no una variación en el contenido proteico preexistente, se sustenta en que el análisis de los niveles totales de AMPK no muestra diferencias aparentes entre las condiciones experimentales planteadas ([figura 4.1.b.\(b\)](#)).

Si bien estos resultados respaldan la hipótesis de una activación rápida y postraducciona de AMPK, resultó pertinente validar esta observación por una técnica complementaria. Con este fin, se analizaron los niveles de ARN mensajero de AMPK mediante RT-qPCR ([ver sección 3.5.](#)) bajo las mismas condiciones experimentales ([figura 4.1.c](#)). Tras 30 minutos de exposición no se observaron cambios significativos en la expresión de AMPK con ninguno de los tratamientos experimentales planteados, validando que los cambios observados previamente se explican exclusivamente debido a un aumento en la marca de fosforilación.

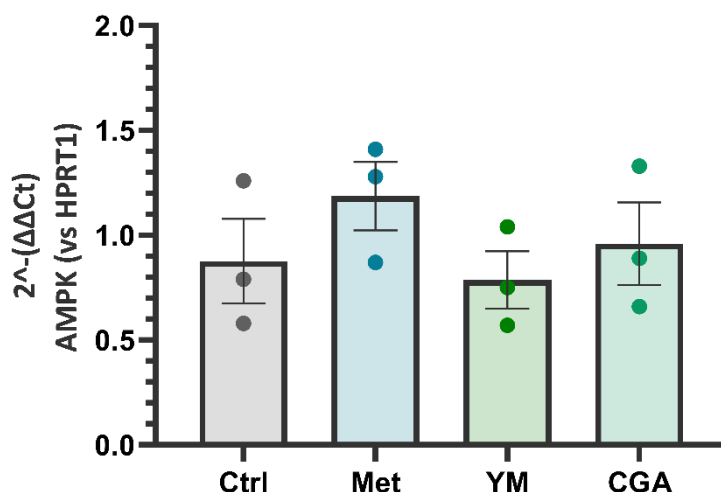


Figura 4.1.c: El tratamiento agudo con yerba mate y ácido clorogénico no cambia los niveles de expresión de AMPK. Niveles relativos de expresión de AMPK determinados por RT-qPCR en células SH-SY5Y tratadas con extracto de yerba mate (YM) o ácido clorogénico (CGA), relativizados respecto al gen de referencia HPRT1 y expresados como valores de $\Delta\Delta C_t$. El gráfico representa la media $\pm$ SEM de tres réplicas experimentales independientes (barras con puntos individuales). No se observaron diferencias significativas entre las condiciones analizadas (ANOVA de una vía, $p < 0,05$, no se observan diferencias significativas). Tratamientos: Ctrl, células sin tratamiento (grupo control); Met, metformina 100 mM; YM, extracto de yerba mate 1X (1 μ l por 500 μ l de medio); CGA, ácido clorogénico 1,01 mM (equivalente a YM 1X). Todas las condiciones se incubaron durante 30 minutos.

De forma conjunta, estos resultados apuntan a que el tratamiento agudo (30 minutos) es insuficiente para inducir cambios apreciables en la síntesis o degradación de AMPK, procesos que operan normalmente en escalas temporales de horas. De esta forma, el aumento en la relación pAMPK/AMPK/ β -actina observado puede interpretarse como una activación postraduccional rápida de esta quinasa y por tanto de las vías que modula. Esto es coherente con resultados previamente reportados para AMPK y otras proteínas reguladas postraduccionalmente por marcas de fosforilación (Cohen, 2000; Hunter, 2007; Hardie, 2015).

Con el objetivo de determinar si la activación de AMPK inducida por la YM podía acompañarse de una regulación transcripcional dependiente del tiempo, se procedió con un ensayo exploratorio empleando condiciones de hambre celular (S, por *starving*), en un paradigma clásico para inducir estrés metabólico y evaluar vías relacionadas con la autofagia. Este experimento formó parte de un bloque de ensayos exploratorios en los que comenzamos a abordar la posibilidad de que la activación de AMPK estuviera viéndose reflejada en una activación de la autofagia. Por este motivo, se cuantificaron los niveles relativos de ARNm de AMPK mediante RT-qPCR en células SH-SY5Y incubadas en medio completo (DMEM/F12) o bajo

condiciones de hambre (Strv), en presencia o ausencia del extracto de YM (*figura 4.1.d*). Los resultados obtenidos indican que, aunque la exposición aguda (30 minutos) no modifica de manera significativa la expresión de AMPK, tratamientos prolongados podrían inducir un ajuste transcripcional compensatorio. Aunque los cambios observados no alcanzaron significancia estadística —probablemente debido a la dispersión de los datos y al hecho de que se priorizó avanzar en otras aproximaciones experimentales, por lo que estos ensayos no se repitieron—, la tendencia detectada podría reflejar una respuesta biológica incipiente. De confirmarse mediante un mayor número de réplicas o con tiempos experimentales extendidos, esta tendencia fortalecería la hipótesis de un posible efecto modulador de la YM sobre la expresión de AMPK.

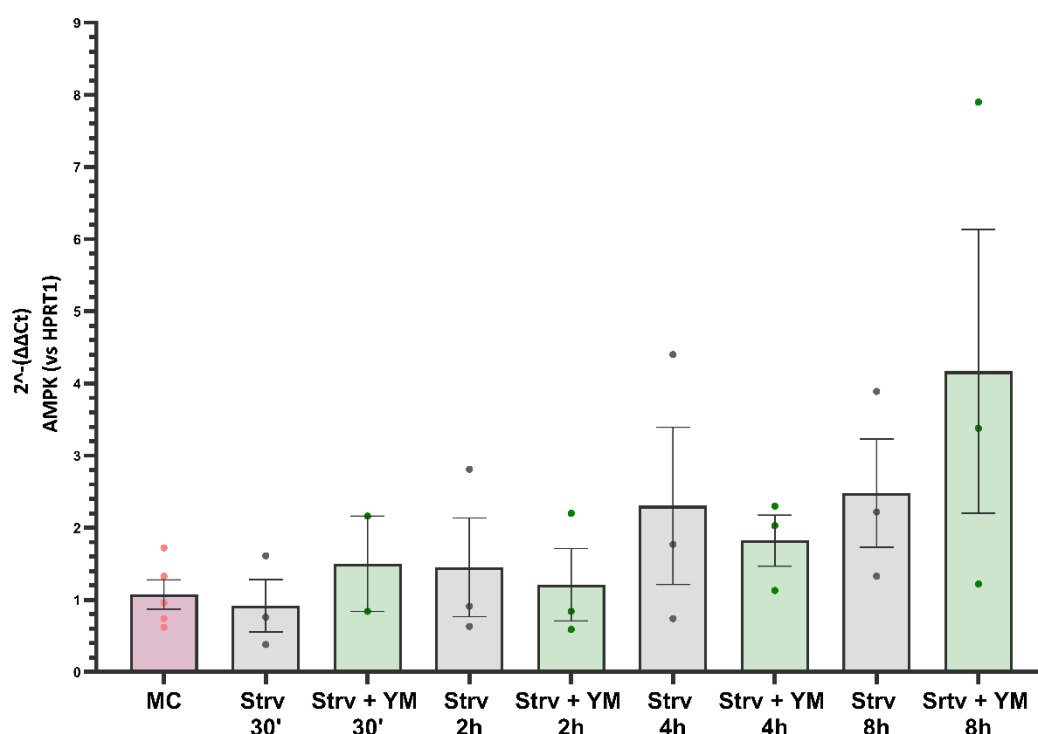


Figura 4.1.d: El hambre crónico junto a la exposición prolongada a extracto de yerba mate podría modificar los niveles de expresión de AMPK en células SH-SY5Y. Niveles relativos de expresión génica determinados por RT-qPCR, relativizados al gen de referencia HPRT1 y expresados como valores de $\Delta\Delta Ct$. Tratamientos: MC, células cultivadas en medio completo; Strv, células en condición de hambre (starving); y “Strv + YM”, células en hambre suplementado con extracto de YM 1X (1 μ l cada 500 μ l de medio). Las condiciones de hambre (Strv y Strv + YM) fueron evaluadas en distintos tiempos de incubación (30 min, 2 h, 4 h y 8 h). El gráfico representa la media $\pm$ SEM de tres réplicas experimentales independientes (barras con puntos individuales). No se observaron diferencias significativas entre las condiciones analizadas ((*) ANOVA de una vía, $p < 0,05$, no se observan diferencias significativas).

En un abordaje previo de nuestro laboratorio -trabajo en el que se basó la tesis de licenciatura de la Lic. Gisela Decurgez (Decurgez, 2024)-, se observó en un modelo de *Drosophila melanogaster* parkinsonianas (moscas que expresan α -Syn silvestre humana) que al ser expuestas de manera crónica a YM, la expresión de AMPK aumento de manera significativa (alrededor de 3 veces en la expresión de la subunidad AMPK α).

De esta forma, tratamientos prolongados podrían inducir un ajuste transcripcional compensatorio, sugiriendo así una regulación multifásica de AMPK en respuesta a los compuestos de la YM. De todas formas, los resultados en este modelo no son suficientes para asegurar esto último de manera concluyente.

En suma, los resultados expuestos en esta sección demuestran que tanto la YM como el CGA promueven la activación de AMPK en células SH-SY5Y, reforzando la hipótesis de que estos compuestos tienen el potencial de modular vías metabólicas reguladas por esta quinasa, asociadas a la supervivencia neuronal (Hardie, 2014b; Herzig y Shaw, 2018). Destacando por su rol fundamental en el paradigma de la neuroprotección, la modulación de la autofagia.

4.2. Aumento de autofagia en células SH-SY5Y: inmunodetección de LC3

Dado que en los experimentos anteriores se observó un aumento en la fosforilación de AMPK y por tanto su activación en células SH-SY5Y tratadas con YM o con CGA ([ver sección 4.1.](#), [figura 4.1.b](#)), se continuó otro paso bajo la hipótesis de que este efecto podría estar vinculado con la inducción de la autofagia, un proceso en el cual AMPK cumple un rol central en la activación de ULK1 y el inicio de la formación de autofagosomas (Kim *et al.*, 2011; Hardie, 2014b).

Para evaluar esta hipótesis se implementaron distintas aproximaciones experimentales complementarias. En primer lugar, con el propósito de analizar la formación de vesículas LC3 positivas (*foci*), se realizaron ensayos de inmunocitoquímica (ICC) dirigidos contra LC3 ([ver sección 3.2.2](#)). En paralelo, y de manera exploratoria, se iniciaron dos abordajes exploratorios: (i) análisis por *Western blot* para cuantificar los niveles relativos de LC3-I/LC3-II y p62, y (ii) determinación por RT-qPCR de la expresión de un conjunto de genes cuya regulación positiva se ha asociado con la inducción de la autofagia (Bordi *et al.*, 2021). Ambos ensayos no arrojaron resultados técnicos concluyentes por lo que preferimos priorizar la ICC y retomar con la puesta a punto y optimización de alguna de estas aproximaciones con el fin de obtener resultados consistentes que complementen y fortalezcan las observaciones presentadas en este trabajo.

De los abordajes propuestos, se priorizó la ICC contra LC3 como método principal para cuantificar vesículas autofágicas. Tal y como se detalló previamente ([ver sección 3.1.2.](#)) se realizó ICC contra LC3, en células SH-SY5Y tratadas por 2hs tanto con extracto de yerba mate (YM; 1 µl de extracto cada 500 µl de medio) como con ácido clorogénico (CGA; 1,05 mM, misma concentración en referencia a YM 1X) ([figura 4.2.a](#), [figura 4.2.b](#)). Siguiendo lineamientos previamente publicados en el área de la autofagia (Ventruti y Cuervo, 2007; Mizushima, Yoshimori y Levine, 2010; Klionsky *et al.*, 2012) se utilizó como control positivo de activación de la autofagia un protocolo de hambreado en medio EBSS durante 2hs (Strv, por *starving*), y como grupo control indicador de los niveles de autofagia basal, células sin tratar en medio completo (Ctrl). Como se mencionó previamente ([ver sección 3.3.4.](#)), la cuantificación de vesículas LC3 positivas se realizó mediante el conteo automático de *foci* de máxima intensidad en el canal verde utilizando el software Fiji/ImageJ. Para cada célula, el área de interés fue delimitada de forma manual o semiautomática, asegurando que los *foci* cuantificados correspondieran exclusivamente al citoplasma de la célula analizada. Los resultados se expresan como el número promedio de *foci* LC3 positivos por célula, calculado a partir del análisis de -al menos- 20 células por condición experimental, obtenidas de -al menos- tres réplicas biológicas independientes.

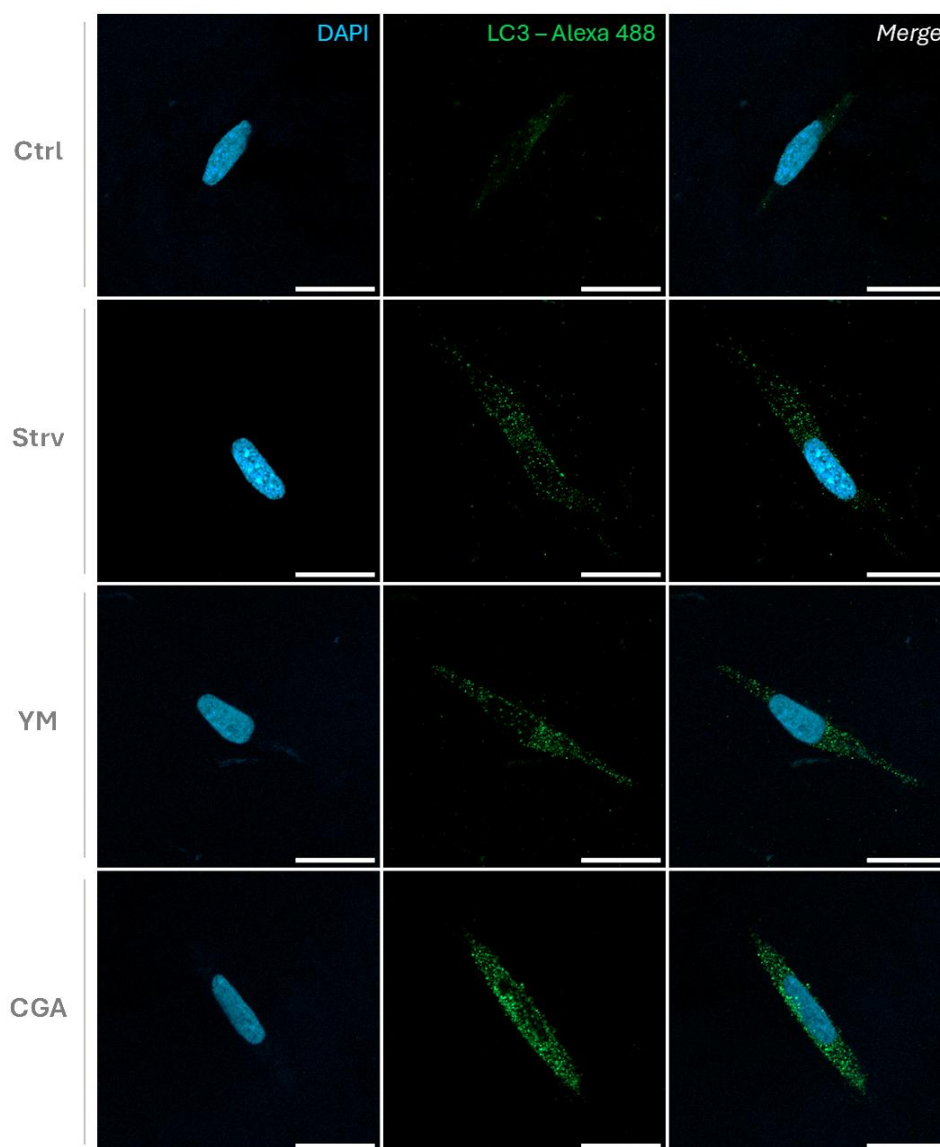


Figura 4.2.a: La yerba mate y el ácido clorogénico promueven la autofagia (Imágenes de microscopia). Imágenes de microscopia confocal representativas de inmunocitoquímica contra LC3 en células SH-SY5Y. Las células fueron tratadas por 2hs tanto con extracto de yerba mate (YM; 1 μ l/500 μ l de medio) como con ácido clorogénico (CGA; 1,05 mM, concentración equivalente a la presente en YM). Como control positivo de activación de la autofagia se siguió un protocolo de hambreado con medio EBSS durante 2 h (Strv). Como control de referencia de autofagia basal se emplearon células cultivadas en medio completo sin tratar (Ctrl). La detección de LC3 se realizó mediante anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 488 (verde) y los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Barra de escala: 20 μ m.

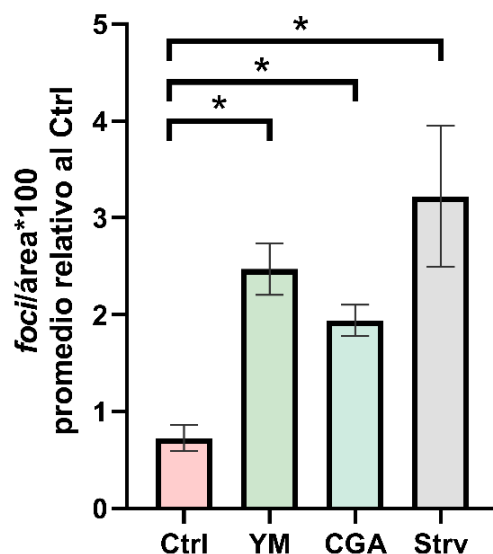


Figura 4.2.b: La yerba mate y el ácido clorogénico promueven la autofagia (Cuantificación). Se muestra la cuantificación del número de *puncta* LC3 positivos normalizados al área celular (*100) y expresados como promedio normalizado a la condición control sin tratar (Ctrl). Condiciones experimentales: YM, extracto de yerba mate 1X; CGA, ácido clorogénico 1,05 mM (equivalente a YM 1X); Strv, condición de hambre (starving); y Ctrl, células control sin tratamiento. En todos los casos se emplearon incubaciones de 2hs. Los valores representan el promedio $\pm$ SEM de al menos cuatro replicas experimentales independientes ($n \geq 4$). (*) ANOVA de una vía, $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos muestran un incremento en el número promedio de vesículas LC3 positivas por célula tanto en los tratamientos con extracto de yerba mate (YM) como con ácido clorogénico (CGA), en comparación con el grupo control sin tratar. Este aumento se observó tanto de manera cualitativa, a partir de la distribución de los *foci* en las imágenes de ICC ([figura 4.2.a](#)), como de forma cuantitativa en el análisis de recuento de *puncta* ([figura 4.2.b](#)). El patrón de fluorescencia mostró una mayor cantidad de *foci* discretos de LC3 en el citoplasma de las células tratadas, con una morfología y tamaño comparables a los observados bajo la condición de hambre (Strv). En contraste, las células del grupo control (Ctrl, es decir en medio completo sin tratar) presentaron una menor cantidad de *foci* LC3 positivos, reflejando el nivel de autofagia basal característico de este tipo celular. Este fenómeno ha sido previamente reportado en líneas neuronales humanas, incluidas las SH-SY5Y, donde la autofagia constituye un proceso constitutivo necesario para el mantenimiento proteico y mitocondrial (Kroemer, Mariño y Levine, 2010; Mizushima, Yoshimori y Levine, 2010; Huang *et al.*, 2015).

Estos resultados sugieren que los compuestos presentes en la YM son capaces de estimular mecanismos asociados a la formación de autofagosomas, en concordancia con la activación de AMPK vista en esta línea celular ([ver sección 4.1.](#)). Dado que LC3 se asocia a las

membranas de los autofagosomas a través de su forma conjugada LC3-II, el aumento en el número de *foci* fluorescentes puede interpretarse como un marcador indirecto de la inducción del proceso autofágico o de una alteración en el flujo vesicular (Klionsky *et al.*, 2012).

Si bien esta aproximación experimental no permite establecer de manera concluyente si los tratamientos promueven la activación o la inhibición del flujo autofágico completo —ya que la acumulación de vesículas LC3 positivas puede deberse tanto a un aumento en su formación como a un bloqueo en su degradación—, los resultados obtenidos indican una modulación activa del sistema autofágico. En este sentido, el aumento en la marca LC3 sugiere la participación de la YM y el CGA en etapas tempranas del proceso, potencialmente a través de la activación de AMPK y la regulación de quinasas río abajo como ULK1, que controlan la iniciación de la autofagia (Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011).

Además, el hecho de que el CGA reproduzca el efecto observado con el extracto completo de YM sugiere que este polifenol podría explicar, al menos de manera parcial, la respuesta observada. Sin embargo, dado el carácter complejo del extracto de YM —que incluye otras xantinas, polifenoles y saponinas ([ver sección 1.2.1.](#))— no puede descartarse un posible efecto conjunto entre sus distintos componentes bioactivos.

Cuando se analizan conjuntamente los resultados de esta sección y de la sección previa, la observación simultánea de la activación de AMPK y el incremento en la marca LC3 sugieren una conexión funcional entre ambas vías, coherente con el rol regulador de AMPK sobre el inicio de la autofagia. Estos resultados constituyen, por tanto, una primera evidencia experimental de que la YM y el CGA modulan procesos celulares asociados con la neuroprotección y podrían actuar como moduladores metabólicos en células neuronales humanas. Considerando que la activación de AMPK y la estimulación de la autofagia constituyen rutas centrales en el control de la proteostasis neuronal, y que la disfunción de estos mecanismos se asocia estrechamente con la acumulación patológica de α -sinucleína, se planteó como siguiente paso experimental evaluar el posible impacto de la YM y el CGA sobre la formación de agregados de esta proteína.

4.3. Reducción de agregados de α -sinucleína en células H4 cotransfectadas

La agregación de α -sinucleína (α -Syn) constituye una de las principales alteraciones patológicas de la EP, participando en la disfunción sináptica, el estrés oxidativo y la muerte neuronal selectiva ([ver sección 1.1.1.](#)). Dado que los resultados previos indicaron que la yerba mate (YM) y el ácido clorogénico (CGA) inducen la activación de AMPK y promueven la formación de vesículas autofágicas, se analizó el impacto del tratamiento con extracto de YM o CGA en la acumulación de agregados de α -sinucleína (α -Syn). Esta hipótesis se cimienta en la estrecha relación entre los mecanismos de autofagia y la eliminación de proteínas mal plegadas.

Para abordar esta hipótesis, y en el marco de una colaboración establecida entre nuestro grupo de trabajo y el *Experimental Neurodegeneration Group* dirigido por el Prof. Dr. Tiago Outeiro en el University Medical Center Göttingen (Alemania), los experimentos presentados en esta sección fueron realizados durante una estancia de investigación en dicho laboratorio, bajo su supervisión. De esta forma, se utilizó el modelo de células neuronales H4 cotransfectadas con los plásmidos SynT y Synphilin-1 (modelo H4 - SynT/SPH1; [ver sección 1.3.2.](#); [ver sección 3.1.4.](#)), ampliamente utilizado para el estudio de la formación de inclusiones similares a cuerpos de Lewy (McLean *et al.*, 2002; Outeiro y Lindquist, 2003).

Como se detalló previamente ([ver sección 3.1.3.](#)), 24hs post cotransfección las células fueron tratadas con extracto de yerba mate (YM) o con ácido clorogénico (CGA) a tres concentraciones distintas: 0,5 μ l, 1 μ l y 5 μ l de extracto de YM y su equivalente en CGA, 0,5mM, 1mM y 5mM, respectivamente. 24hs después (48hs post transfección), las muestras fueron procesadas para inmunodetección fluorescente de α -sinucleína (α -Syn), permitiendo evaluar la carga de agregados intracelulares formados bajo las diferentes condiciones experimentales ([figura 4.3.a](#)).

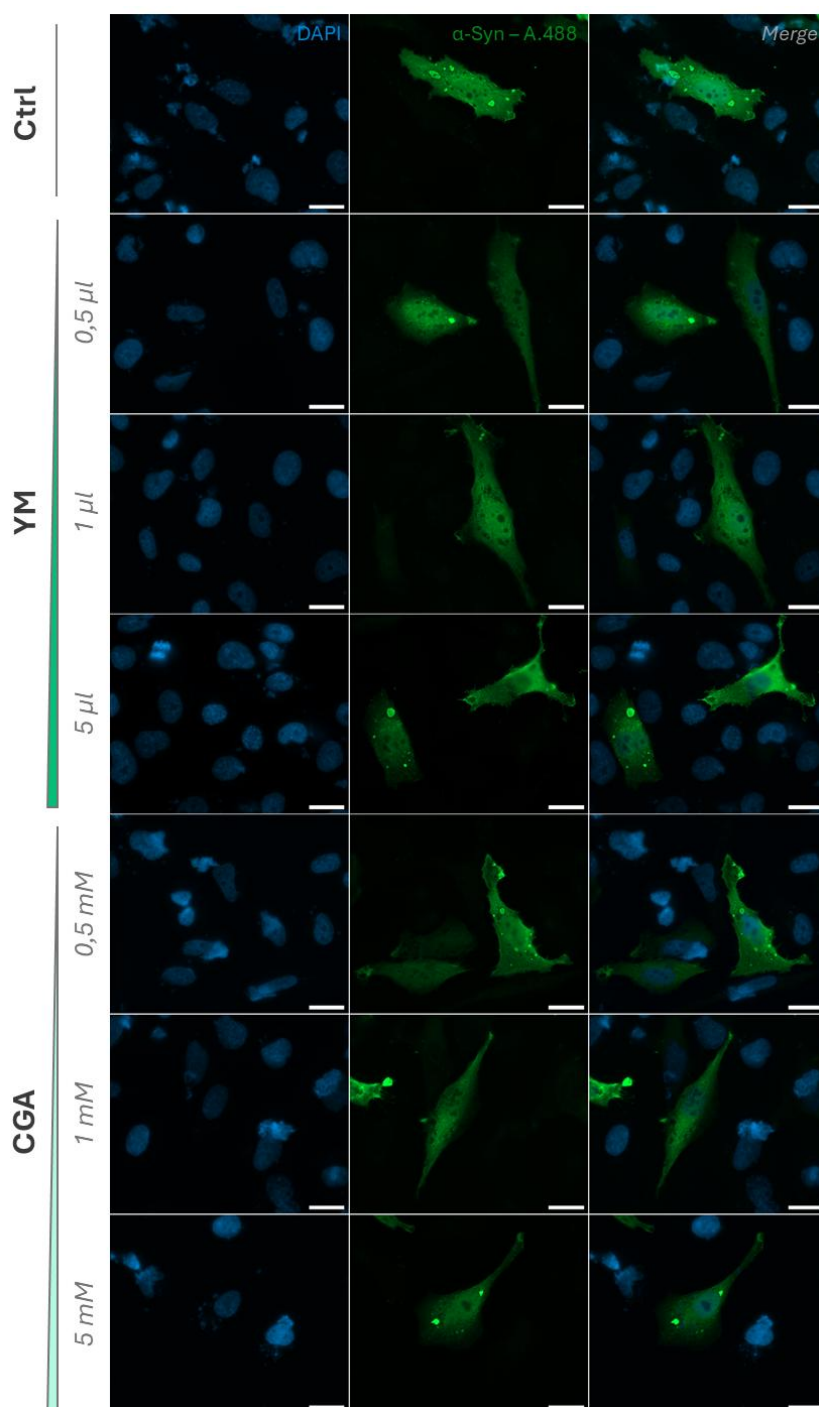


Figura 4.3.a: Efecto de la yerba mate y el ácido clorogénico sobre los agregados α -Syn en células H4.

Imágenes de microscopia de fluorescencia representativas de ICC contra α -Syn en células H4 co-transfectadas con SynT y Synphilin-1 para inducir agregación. Las células fueron tratadas durante 24 h con extracto de yerba mate (YM) o con ácido clorogénico (CGA) en distintas concentraciones. La ICC se realizó utilizando anticuerpos contra α -Syn total (verde), y los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). Las imágenes muestran el patrón de agregación de α -Syn en cada condición experimental. Tratamientos: YM 0,5 μ l; 1 μ l y 5 μ l por cada 500 μ l de medio, respectivamente ($n = 7$, >50 células por réplica); CGA 0,5 mM, 1 mM y 5 mM, concentraciones equivalentes a YM 0,5 μ l; 1 μ l y 5 μ l por cada 500 μ l de medio, respectivamente ($n = 4$, >50 células por réplica). Control (Ctrl): células co-transfectadas sin tratamiento ($n = 7$, >50 células por réplica). Barra de escala: 20 μ m.

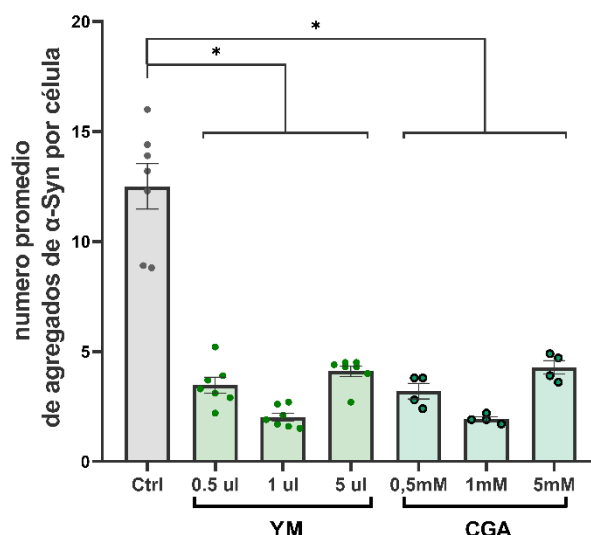


Figura 4.3.b: La yerba mate y el ácido clorogénico reducen el número de agregados α -Syn en células H4. Cuantificación del número promedio de agregados de α -Syn por célula en cultivos de H4 co-transfectadas con SynT y Synphilin-1 y tratadas durante 24 h con extracto de yerba mate (YM) o ácido clorogénico (CGA). Los resultados se expresan como promedio de agregados por célula, considerando más de 50 células analizadas por réplica experimental. Condiciones experimentales: YM 0,5 μ l; 1 μ l y 5 μ l/500 μ l de medio ($n = 7$), CGA 0,5 mM, 1 mM y 5 mM (equivalentes a YM 0,5 μ l; 1 μ l y 5 μ l/500 μ l de medio respectivamente; $n = 4$), y Control (Ctrl), células co-transfectadas sin tratamiento ($n = 7$). Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. (*) ANOVA de una vía, $p < 0,0001$.

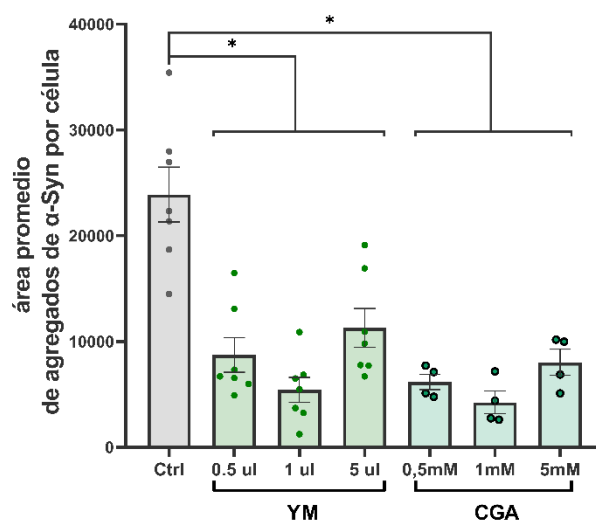


Figura 4.3.c: La yerba mate y el ácido clorogénico reducen el tamaño de los agregados α -Syn en células H4. Cuantificación del tamaño promedio de los agregados de α -Syn por célula en cultivos de H4 co-transfectadas con SynT y Synphilin-1 y tratadas durante 24 h con extracto de yerba mate (YM) o ácido clorogénico (CGA). Los resultados se expresan como el área media en pixeles de agregados por célula, considerando más de 50 células analizadas por réplica experimental. Condiciones experimentales: YM 0,5 μ l; 1 μ l y 5 μ l/500 μ l de medio ($n = 7$), CGA 0,5 mM, 1 mM y 5 mM (equivalentes a YM 0,5 μ l; 1 μ l y 5 μ l/500 μ l de medio respectivamente; $n = 4$), y Control (Ctrl), células co-transfectadas sin tratamiento ($n = 7$). Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. (*) ANOVA de una vía, $p < 0,0001$.

El análisis por microscopia de fluorescencia reveló que tanto el tratamiento con YM como con CGA redujo de manera significativa la cantidad (*figura 4.3.b*) y el tamaño (*figura 4.3.c*) de los agregados de α -Syn en comparación con el grupo control no tratado. Si bien no se observaron diferencias estadísticas entre las distintas concentraciones empleadas, los resultados parecieran marcar una tendencia hacia un efecto máximo en la cantidad determinada previamente como optima (1 μ l extracto / 500 μ l cultivo o 1 mM de CGA). Además, en términos cualitativos se observó una menor densidad de inclusiones citoplasmáticas y una distribución más difusa de la señal de α -Syn, lo que es consistente con una menor tendencia a la agregación o con un incremento en los mecanismos de *clearance* proteico (*figura 4.3.a*).

Estos resultados sugieren que tanto la YM como el CGA son capaces de disminuir la carga de agregados de α -Syn en este modelo celular de inclusiones tipo cuerpos de Lewy, un sistema utilizado comúnmente para estudiar la dinámica de agregación y *clearance* de α -Syn (McLean, Kawamata y Hyman, 2001; McLean *et al.*, 2002; Outeiro y Lindquist, 2003). En este contexto, esta observación experimental adquiere especial relevancia al considerar que la acumulación de α -Syn mal plegada y su posterior agregación constituyen un evento central en la fisiopatología de la EP (Lashuel, 2021).

La disminución observada en los agregados podría explicarse por distintos mecanismos no excluyentes. Por un lado, la activación de AMPK y el aumento en la señal de LC3 expuestos en las secciones previas en SH-SY5Y sugieren que la YM y el CGA podrían promover la degradación de agregados proteicos a través de la activación del flujo autofágico. Por otro lado -si bien no fue explorado en el presente trabajo-, estos compuestos poseen reconocidas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que podrían contribuir indirectamente a preservar la integridad proteica y reducir la carga de estrés celular, factores que favorecen el correcto manejo de proteínas potencialmente agregantes.

De esta forma, los resultados presentados en esta sección refuerzan la hipótesis de que los componentes bioactivos de la YM, y particularmente el CGA, ejercen efectos moduladores sobre procesos de proteostasis celular, contribuyendo así a la disminución de la acumulación de α -Syn agregada. Este hallazgo no solo complementa las observaciones previas de activación de AMPK y aumento de autofagia en SH-SY5Y, sino que además sugiere un posible mecanismo de acción convergente que vincula la modulación metabólica con la protección frente a la disfunción proteica, ambos fenómenos claves en la fisiopatología de la EP.

5. DISCUSIÓN

En la presente tesis se demuestra que tanto el extracto de yerba mate (YM) como el ácido clorogénico (CGA) incrementan la fosforilación de AMPK en células SH-SY5Y, un hallazgo que resulta particularmente relevante dado el rol central de esta quinasa en la regulación del metabolismo celular y la supervivencia neuronal ([ver sección 1.4.](#)). Como se mencionó previamente, la fosforilación en Thr172 de la subunidad α constituye un marcador ampliamente aceptado de activación de AMPK (Hardie, 2014a; Herzig y Shaw, 2018), y su incremento sugiere que ambos tratamientos favorecen el reclutamiento de vías asociadas a la homeostasis energética.

La activación de AMPK por compuestos de origen natural ha sido reportada previamente en diversos modelos celulares y animales. En el caso de polifenoles como la quercetina, el resveratrol y catequinas del té verde, se ha documentado que promueven la activación de AMPK, contribuyendo a efectos antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores (Zhou *et al.*, 2014). Los resultados aquí expuestos sugieren que tanto la YM como el CGA podrían compartir mecanismos similares, lo que constituye un aporte novedoso considerando que la exploración del efecto neuroprotector de la YM es un campo muy poco explorado aún.

En términos funcionales, la activación de AMPK representa un punto de intersección crítico con procesos vinculados a la neuroprotección. Por un lado, se asocia a la promoción de la autofagia a través de la fosforilación de ULK1 -promoviendo la formación del complejo de iniciación de la autofagia- y la inhibición de mTORC1, lo que facilita la eliminación de proteínas mal plegadas y organelas dañadas (Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011). Por otro lado, regula el metabolismo energético, optimizando el uso de glucosa y ácidos grasos en condiciones de estrés, lo que puede ser particularmente relevante para neuronas dopaminérgicas que presentan una alta demanda energética (Sulzer y Surmeier, 2013).

La activación de AMPK es una observación de particular interés, porque la capacidad de la YM y del CGA para inducir esta señalización podría explicar, al menos de manera parcial, un posible mecanismo molecular a través del cual ejercen efectos protectores en modelos de neurodegeneración como el previamente publicado por nuestro laboratorio (Bernardi *et al.*, 2019). Como se mencionó previamente ([ver sección 1.2.3.](#)), en ese trabajo se demostró que la YM favorece la supervivencia y el desarrollo dendrítico de neuronas dopaminérgicas en cultivo, lo que planteó el interrogante acerca de los mecanismos intracelulares responsables de tales efectos. Por otra parte, diversos estudios han señalado que rutas de señalización relacionadas, como la vía cAMP/PKA, pueden también mediar efectos neuroprotectores al modular procesos

de supervivencia, metabolismo energético y plasticidad sináptica (Michel y Agid, 1996; Patrick P. Michel, Hirsch y Hunot, 2016). Esta observación refuerza la hipótesis de que los compuestos presentes en la YM podrían converger sobre mecanismos comunes integrando respuestas adaptativas que favorecen la homeostasis y la resiliencia neuronal. En este sentido, el marco teórico planteado y estos resultados sugieren que la activación de AMPK podría constituir uno de los nodos centrales que vinculan la acción de los compuestos bioactivos de la YM con la promoción de la viabilidad neuronal, proporcionando así un marco mecanístico que da continuidad y sustento al enfoque experimental.

Cabe destacar que, aunque los resultados obtenidos indican que aunque la exposición aguda (30 minutos) no modifica de manera significativa la expresión de AMPK, tratamientos prolongados podrían inducir un ajuste transcripcional compensatorio (*figura 4.1.d*). A pesar de que los cambios observados no resultaron estadísticamente significativos, la tendencia detectada podría reflejar una respuesta biológica incipiente que, de confirmarse con un mayor número de réplicas o tiempos experimentales, fortalecería la hipótesis de un efecto modulador de la YM por sobre la expresión de AMPK. Esto podría abrir la posibilidad de un doble nivel de regulación: uno rápido, postraducciona, y otro adaptativo a largo plazo. Este fenómeno ha sido reportado en contextos de exposición a resveratrol y metformina, donde además de la activación inicial se observaron cambios en la expresión de genes asociados a metabolismo energético (Cantó *et al.*, 2009).

De esta forma, los resultados obtenidos en SH-SY5Y permiten proponer que tanto la YM como el CGA actúan como moduladores de AMPK (*figura 4.1.b.*), marcando esto la potencial consecuencia de activar programas celulares que favorecen la homeostasis, la resiliencia metabólica y la eliminación de agregados proteicos. Si bien se requieren estudios adicionales para determinar la especificidad y las vías intermedias involucradas, esta observación aporta un mecanismo plausible que vincula los efectos epidemiológicos de las infusiones ricas en polifenoles con la disminución del riesgo de enfermedades neurodegenerativas.

La activación de AMPK observada en células SH-SY5Y refuerza la hipótesis de que estos compuestos son capaces de modular vías metabólicas reguladas por esta quinasa, íntimamente relacionadas con la supervivencia neuronal (Hardie, 2014a; Herzig y Shaw, 2018). Entre ellas, sobre todo en el campo de la neuroprotección destaca la autofagia, un proceso clave en el mantenimiento de la proteostasis y en la prevención de la acumulación de proteínas mal plegadas, fenómeno característico de diversas patologías neurodegenerativas como la EP (Stacchiotti y Corsetti, 2020). De esta forma siguiendo con esta línea conceptual, en este trabajo

se observó que tanto el extracto de YM como el CGA promovieron un aumento significativo en el número de vesículas LC3 positivas (*puncta* o *foci*) en células SH-SY5Y ([figura 4.2.a](#); [figura 4.2.b](#)). Este hallazgo es consistente con el uso de conteo de *puncta* de LC3-II como un indicador robusto del número de autofagosomas, metodología ampliamente aceptada y empleada en publicaciones de autofagia (Runwal *et al.*, 2019).

De todas formas, es importante reconocer que el incremento en el número de *puncta* de LC3 puede reflejar tanto un aumento en la formación de autofagosomas como una disminución en su degradación, dado que este marcador no discrimina entre ambas etapas del flujo autofágico. No obstante, al considerar conjuntamente este resultado con la activación de AMPK ([ver sección 4.1.](#)), se refuerza la interpretación de que el efecto observado corresponde a una inducción funcional del proceso autofágico. Esto es porque AMPK ejerce un rol regulador clave de la autofagia a través de la fosforilación de ULK1 y la inhibición del complejo mTORC1 (Kim *et al.*, 2011), y por tanto su activación provee un contexto mecánico coherente sobre el que se sustenta esta conclusión. Además, el incremento en *puncta* observado en respuesta a YM y CGA refleja un patrón similar al inducido por estímulos clásicos como la privación de nutrientes (hambre o “*starving*”), lo cual se alinea con estudios que resaltan el papel de LC3 como marcador sensible de estrés celular y activación autofágica (Pugsley, 2017).

No obstante, cabe mencionar que el uso del conteo de *puncta* o *foci* de LC3 como único indicador de autofagia presenta limitaciones. La coacumulación de LC3-I en agregados en condiciones de autofagia deficiente ha sido reportada, lo que podría generar artefactos que imitan un incremento en formación de autofagosomas (Runwal *et al.*, 2019). Por ello, la interpretación de los resultados debería considerarse en conjunto con otros marcadores como *Western blot* de LC3I / LC3II y p62 o ensayos de tráfico vesicular. Además, para establecer una activación funcional de la autofagia se requiere de análisis dinámicos del flujo autofágico, incluyendo la evaluación de la degradación lisosomal de los autofagosomas (Mizushima, Yoshimori y Levine, 2010; Klionsky *et al.*, 2012). Estos ensayos se encuentran en curso y serán incluidos en la publicación que se desprenda del presente trabajo.

En definitiva y a pesar de las limitantes mencionadas, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que tanto la YM como el CGA inducen actividad autofágica en las células SH-SY5Y. Al considerar simultáneamente la activación de AMPK observada en este mismo modelo, se refuerza la posibilidad de que promuevan la autofagia como parte de un mecanismo neuroprotector integrado. Esta interpretación encuentra sustento en la literatura previa, donde

el CGA ha sido reportado como un modulador positivo de la autofagia en distintos contextos celulares y tisulares no neuronales.

Como fue introducido previamente ([ver sección 1.2.2.](#)), en modelos hepáticos y musculares el CGA induce la activación de AMPK y la subsecuente fosforilación de ULK1, evento inicial del proceso autofágico, promoviendo la degradación de lípidos y la eliminación de organelas dañadas o defectuosas (Ong, Hsu y Tan, 2013; Yao *et al.*, 2025). De forma similar, en células endoteliales y macrófagos se ha descrito que el CGA incrementa el flujo autofágico a través de la activación del eje AMPK–PGC-1 α y la inhibición del complejo mTORC1, resultando en una disminución del estrés oxidativo y la inflamación (Tsai *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2023).

En cuanto al sistema nervioso, los trabajos reportados son escasos, pero existe evidencia creciente de que el CGA puede inducir autofagia en modelos neuronales experimentales. Por ejemplo, en cultivos celulares expuestos a estrés oxidativo o a neurotoxinas como la 6-hidroxidopamina, el tratamiento con CGA redujo la acumulación de proteínas mal plegadas y atenuó el daño celular, efecto acompañado por un aumento en la expresión de marcadores de autofagia como LC3-II y Beclin-1 (Shan, Tian y Fang, 2019). En línea con estos resultados, estudios en modelos animales de Parkinson demostraron que el CGA retrasa la progresión de la neurodegeneración mediante la activación de la vía autofágica tanto en *Caenorhabditis elegans* (He *et al.*, 2023) como en *Danio rerio* (Gao *et al.*, 2023). Estos hallazgos sugieren que el CGA podría favorecer la degradación de agregados proteicos a través de la activación de la autofagia, lo que sugiere una acción protectora mediada por la restauración de la homeostasis proteica.

Desde una perspectiva fisiológica, estos reportes sugieren que el CGA podría funcionar como un modulador metabólico capaz de conectar la regulación del metabolismo energético con los mecanismos de proteostasis. La activación coordinada de AMPK y de la maquinaria autofágica favorece la eliminación de agregados proteicos y mitocondrias dañadas —procesos críticos en enfermedades neurodegenerativas como la EP (Surmeier *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2011; Hardie, Ross y Hawley, 2012)—.

De esta forma, cuando se analizan los resultados presentados en este trabajo en conjunto con la evidencia previamente publicada, es coherente proponer que el CGA podría contribuir a la neuroprotección no solo por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, sino también mediante la activación de rutas de reciclaje celular y mantenimiento de la calidad proteica.

A partir de estos resultados y del rol de la autofagia en la degradación de proteínas agregadas, el siguiente enfoque experimental se orientó a examinar si la YM y el CGA influían sobre la acumulación de α -Syn en un modelo de agregación en células en cultivo. Como se introdujo previamente ([ver sección 1.3.2.](#); [ver sección 3.2.4.](#)), se utilizó el modelo de agregación de α -Syn en células H4 (modelo H4- SynT/SPH1). Este es un sistema robusto y ampliamente utilizado para el análisis de la dinámica de formación y degradación de agregados de α -Syn (McLean *et al.*, 2002; Outeiro y Lindquist, 2003). De esta forma, en dicho modelo se observó que tanto el tratamiento con extracto de YM como con CGA condujo a una disminución significativa no solo en el número de los agregados de α -Syn, sino también en el tamaño de estos ([ver sección 4.3.](#)).

Estos efectos se alinean con trabajos recientes que reportaron efectos similares mediante compuestos naturales. En particular, se ha reportado que ingredientes bioactivos como dihidromiricetin o ácido salvianólico B inhiben la agregación de α -Syn y activan vías de degradación como la autofagia mediada por chaperonas (CMA, por sus siglas en ingles), incluyendo un aumento de marcadores lisosomales como LAMP-1 y LAMP-2A en modelos celulares con SynT/Synphilin-1 (Wu *et al.*, 2019). Asimismo, en otro enfoque experimental, los polifenoles extraídos de plantas como *Corema album* mostraron una reducción en la toxicidad y agregación de α -Syn, mediante estimulación de la autofagia y disminución del estrés oxidativo (Macedo *et al.*, 2015).

Aunque no fue evaluado de manera directa en el presente trabajo, la activación de la vía autofágica mostrada en las secciones previas ([ver sección 4.2.](#)) sugiere fuertemente que la YM y el CGA podrían promover la degradación de agregados proteicos mediante mecanismos dependientes de la vía lisosomal o promoviendo la autofagia selectiva. Esta interpretación se sustenta en la estrecha relación que existe entre la activación de AMPK, la inducción de la autofagia y la eliminación de agregados de α -Syn, vinculo ampliamente documentado en modelos de EP (Djajadikerta *et al.*, 2020; Sahoo *et al.*, 2022). La activación de AMPK favorece la formación de autofagosomas a través de la fosforilación de ULK1 y la inhibición de mTORC1, coordinando así la degradación de proteínas mal plegadas y organelas dañados. Resulta razonable proponer que la reducción en la carga de agregados observada en las células H4 tratadas con YM o CGA podría reflejar una mejora en la eficiencia del sistema autofágico-lisosomal.

El modelo H4-SynT/SPH1 constituye una herramienta robusta y bien validada para el estudio de la agregación de α -Syn, dado que genera de manera consistente inclusiones

intracelulares que recapitulan características morfológicas y bioquímicas de los cuerpos de Lewy observados en la EP (McLean *et al.*, 2002; Outeiro y Lindquist, 2003). A pesar de tratarse de una línea no neuronal, su facilidad para la transfección y su reproducibilidad la han consolidado como un sistema de referencia en estudios mecanísticos y en la evaluación de compuestos con potencial modulador de la proteostasis (Delenclos *et al.*, 2019; Masaracchia *et al.*, 2020). No obstante, debe reconocerse que los resultados obtenidos en H4 representan una primera aproximación y que la extrapolación a contextos neuronales o *in vivo* deben abordarse con cautela. Numerosos compuestos que demostraron efectos antiagregantes en H4, incluyendo inhibidores de mTOR, inductores de autofagia o pequeñas moléculas moduladoras de α -Syn, han mostrado resultados variables o más modestos en modelos de mayor alcance traslacional, como los modelos neuronales primarios o animales (Fleming *et al.*, 2008; Lashuel, 2021), lo que refleja la complejidad de los mecanismos involucrados en la homeostasis proteica neuronal.

Una reducción significativa en el número y tamaño de agregados de α -Syn tras el tratamiento con YM o el CGA, posiciona a estos compuestos como potenciales moduladores de la proteostasis celular. Desde una perspectiva mecanística, estos resultados podrían deberse, al menos en parte, a una estimulación del *clearance* lisosomal mediado por AMPK, promoviendo la eliminación de agregados proteicos a través de la activación del sistema autofágico. Sin embargo, no puede descartarse la participación de otras rutas complementarias, como la activación de vías antioxidantes —particularmente la mediada por el factor de transcripción Nrf2— o la disminución del estrés oxidativo intracelular, que podrían contribuir a preservar la conformación nativa de la α -Syn y reducir así su tendencia a la agregación.

Como se mencionó previamente en esta misma sección, diversos estudios han documentado que el CGA, al igual que otros polifenoles de origen vegetal, es capaz de activar AMPK en distintos tipos celulares y de modular vías metabólicas vinculadas a la homeostasis energética, la inflamación y la autofagia (Ong, Hsu y Tan, 2012; Tsai *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2024). En este sentido, los efectos observados en el modelo H4 podrían reflejar la convergencia de mecanismos metabólicos y redox sobre el control de la calidad proteica neuronal. La activación sostenida de AMPK no solo favorece la inducción de autofagia (Kim *et al.*, 2011), sino que también potencia la biogénesis mitocondrial y la función energética, factores clave en la resistencia celular al estrés proteotóxico.

Efectos similares han sido descritos para otros activadores farmacológicos de AMPK, entre los cuales se destaca la metformina. En modelos celulares y animales de sinucleinopatías, la metformina reduce la carga de inclusiones de α -Syn al promover la autofagia, atenuar el estrés

oxidativo y restaurar la función mitocondrial (Lu *et al.*, 2016; Katila *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2019; Paudel *et al.*, 2020; Gopar-Cuevas *et al.*, 2023; Chang *et al.*, 2024; Mary *et al.*, 2025). En este marco, es coherente establecer un paralelismo conceptual entre los efectos de la metformina y los observados con los compuestos derivados de la YM, dado que ambos convergen en la activación de AMPK como nodo central de la respuesta adaptativa celular frente al estrés metabólico y proteotóxico.

Así, los resultados expuestos en este trabajo no solo aportan evidencia experimental sobre la capacidad de la YM y del CGA para modular vías de señalización asociadas con la homeostasis proteica, sino que también abren la posibilidad de explorar estos compuestos como herramientas experimentales o nutraceuticos⁴ con potencial para atenuar procesos patológicos vinculados a la agregación proteica en enfermedades neurodegenerativas.

Los resultados obtenidos en el modelo de H4 muestran que tanto la YM como el CGA, son capaces de reducir de manera significativa la carga agregada de α -Syn, lo que aporta un respaldo experimental importante a la hipótesis de que estos compuestos pueden modular la proteostasis neuronal a través de la activación de vías degradativas como la autofagia. Para fortalecer estos resultados, sería relevante incorporar análisis complementarios que permitan evaluar de manera dinámica el flujo autofágico y la participación lisosomal en el *clearance*⁵ de agregados, incluyendo la detección de marcadores como p62/SQSTM1, LAMP1 o catepsinas, así como el uso de inhibidores selectivos de la degradación lisosomal. Estas aproximaciones permitirían discernir si la reducción observada en los agregados de α -Syn responde a una mayor degradación de inclusiones preformadas o a una prevención de su formación.

En términos traslacionales, la posibilidad de que la YM y componentes naturales como el CGA actúen sobre la misma vía metabólica que fármacos ampliamente utilizados —como la metformina— abre un campo de especial interés en la intersección entre nutrición, metabolismo y neurodegeneración. La activación de AMPK estaría representando un punto de convergencia entre las intervenciones farmacológicas y dietarias. De esta forma, el CGA y otros polifenoles derivados de alimentos o bebidas tradicionales como la YM, podrían ejercer un

⁴ Los nutraceuticos se definen como sustancias bioactivas derivadas de alimentos naturales que, además de su valor nutricional básico, proporcionan beneficios comprobados para la salud o contribuyen a la prevención y tratamiento de enfermedades (Nasri *et al.*, 2014). El término combina los conceptos de “nutrición” y “farmacéutico”, y abarca tanto compuestos purificados (como polifenoles, ácidos grasos o vitaminas) como formulaciones basadas en extractos alimentarios.

⁵ En este contexto, el término *clearance* hace referencia a la eliminación de proteínas anómalas o agregadas mediante rutas degradativas celulares —principalmente la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma—, mecanismos esenciales para preservar la homeostasis proteica y prevenir la acumulación patológica de α -sinucleína (Menzies *et al.*, 2017).

efecto mimético o incluso sinérgico con activadores farmacológicos de AMPK, contribuyendo a la resiliencia metabólica neuronal y a la preservación de la proteostasis. Así, la modulación de AMPK mediante compuestos naturales podría pensarse como una forma de preconditionamiento metabólico, preparando a las neuronas para enfrentar condiciones de estrés proteotóxico y energético características de las sinucleinopatías. Bajo esta perspectiva se integrarían los enfoques de la biología molecular, la nutrición y la neuroprotección, respaldando la idea de que los nutraceuticos no solo actúan como antioxidantes directos, sino también como inductores de programas adaptativos de supervivencia celular.

Además, cabe considerar que los procesos de agresión neuronal comienzan mucho antes de la manifestación clínica de los síntomas motores característicos de la EP. Desde una visión preventiva, el consumo regular de YM podría entenderse no solo como un agente que “prepara” a las neuronas ante el daño, sino como una forma potencial de tratamiento suave y sostenido en el tiempo, capaz de modular de manera crónica vías metabólicas neuroprotectoras. Con el paso de los años, este condicionamiento metabólico inducido por compuestos naturales podría traducirse en una mayor resiliencia neuronal y, en consecuencia, en una reducción del riesgo de desarrollar la enfermedad, fenómeno que como se ha mencionado previamente ya se ha observado de manera consistente en estudios epidemiológicos con consumidores habituales de café, y que la evidencia emergente sugiere podría extenderse al consumo de YM.

Reducir los niveles y/o eliminar las especies tóxicas de α -Syn presente en las células es potencialmente un objetivo prometedor para las terapias destinadas a -idealmente- detener la progresión de la EP (Näsström *et al.*, 2011; Brundin, Dave y Kordower, 2017a; Delenclos *et al.*, 2019). Dado que la acumulación y propagación de formas mal plegadas de α -Syn ocupa un papel central en la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas, cualquier intervención capaz de modular su carga intracelular podría tener un impacto directo sobre la progresión de la enfermedad. En este sentido, los resultados obtenidos en el modelo de células H4 adquieren una relevancia traslacional particular. Estos resultados se alinean con tendencias actuales que apuntan a desarrollar terapias dirigidas a la proteostasis neuronal, ya sea mediante la inhibición de la agregación, la disolución de fibrillas preexistentes o la estimulación de los sistemas de degradación proteica, como la autofagia y el proteasoma. La activación de AMPK y la inducción de autofagia mostradas en este trabajo sitúan a la YM y al CGA dentro de esta última categoría, sugiriendo un posible mecanismo endógeno y fisiológico de eliminación de agregados proteicos, sin requerir intervenciones farmacológicas.

Desde una perspectiva traslacional, este tipo de moduladores naturales podrían concebirse como herramientas para reforzar las defensas celulares frente al estrés proteotóxico, especialmente en etapas tempranas o prodrómicas de la enfermedad ([ver sección 1.1.2.](#); [figura 1.1.2.a](#)). Así, La manipulación de vías metabólicas como las de AMPK a través de nutracéuticos abre la posibilidad de estrategias coadyuvantes seguras y accesibles. Además, la evidencia emergente sugiere que el control metabólico y la capacidad autofágica neuronal declinan con la edad (Rubinsztein, Mariño y Kroemer, 2011), lo que refuerza la idea de que una intervención preventiva o moduladora del metabolismo energético podría ralentizar la aparición o progresión de los fenotipos patológicos asociados a α -Syn.

Si bien las evidencias específicas sobre YM aún son incipientes, el paralelismo con el café —una bebida que comparte gran parte de su composición fenólica, incluyendo el CGA— otorga un marco de referencia sólido para interpretar estos resultados (Moore, McDermott y Wood, 1948; Gale, Martyn y Gale, 2003; Kim *et al.*, 2012; Tajik *et al.*, 2017). Numerosos estudios epidemiológicos han reportado consistentemente una asociación inversa entre el consumo de café y el riesgo de desarrollar EP, atribuida en parte a la presencia de polifenoles y metilxantinas (Hu *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010; Qi y Li, 2014). Más allá de la cafeína, el CGA y otros compuestos fenólicos del café han mostrado efectos neuroprotectores en modelos celulares y animales, actuando sobre la homeostasis energética, la inflamación y la degradación de proteínas mal conformadas (Kwon *et al.*, 2010; Cropley *et al.*, 2012). En este sentido, los resultados aquí obtenidos con YM y CGA pueden considerarse parte de una tendencia más amplia que vincula el consumo habitual de bebidas ricas en polifenoles con una mayor resiliencia neuronal frente al estrés metabólico y proteotóxico.

Por otro lado, resulta razonable pensar que la sinergia entre distintos componentes de la YM, incluyendo polifenoles (CGA), xantinas (cafeína, teobromina), podría generar efectos combinados sobre la modulación de AMPK, la función mitocondrial y la respuesta inflamatoria. Así, la YM se presenta como un sistema biológicamente complejo que podría, al igual que el café, contribuir al mantenimiento de la homeostasis neuronal a través de mecanismos multifactoriales.

En conjunto, estos los tres bloques de resultados expuestos permiten delinear un mecanismo integrador: la activación de AMPK por YM y CGA desencadenaría la inducción de autofagia, y esta, a su vez, contribuiría a la reducción de agregados de α -Syn. De esta manera, los compuestos presentes en la YM podrían actuar sobre la proteostasis neuronal y el metabolismo energético, procesos cuya disfunción ha sido fuertemente vinculada con la

neurodegeneración (Surmeier *et al.*, 2010). Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el consumo de infusiones ricas en polifenoles no solo posee un correlato epidemiológico con una menor incidencia de Parkinson, sino que también cuenta con un sustento mecanístico plausible basado en la regulación de rutas celulares críticas para la supervivencia neuronal.

En síntesis, los resultados presentados en esta tesis constituyen una aproximación inicial pero significativa hacia la comprensión de los mecanismos mediante los cuales la YM y uno de sus principales compuestos bioactivos, el CGA, podrían modular procesos celulares asociados a la neuroprotección. Si bien es necesario confirmar la naturaleza dinámica del flujo autofágico mediante el uso de inhibidores específicos y profundizar en los mecanismos por los cuales YM y CGA impactan en la degradación de α -Syn, los hallazgos aquí expuestos se complementan con la evidencia previa.

Así, el presente trabajo sugiere la activación del eje AMPK – Autofagia abriendo las puertas a la exploración respecto a la participación del metabolismo energético, autofagia y proteostasis como ejes centrales en la acción de compuestos naturales con potencial neuroprotector, estableciendo una base experimental sobre la cual proyectar futuras líneas de investigación tanto básicas como aplicadas, orientadas a estrategias preventivas o coadyuvantes en enfermedades neurodegenerativas.

6. CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se exploró el efecto de la yerba mate (YM) y del ácido clorogénico (CGA), sobre vías de señalización molecular vinculadas a la neuroprotección, empleando modelos celulares relevantes para enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP). Considerando los diferentes abordajes experimentales realizados, las principales conclusiones del este trabajo son:

- Tanto la YM como el CGA activan la quinasa AMPK en células SH-SY5Y, un regulador clave del metabolismo energético y la homeostasis celular.
- La activación de AMPK se asocia con un aumento en la formación de vesículas LC3 positivas en células SH-SY5Y, lo que indica una posible inducción de la autofagia como mecanismo de acción.
- No se observaron cambios significativos en la expresión génica de los componentes centrales de la vía autofágica en células SH-SY5Y, lo que sugiere que el efecto ocurre principalmente a nivel postraduccional.
- En el modelo de células H4 cotransfectadas con SynT y Synphilin-1, tanto YM como CGA redujeron significativamente el número y tamaño de los agregados de α -sinucleína, una característica patológica central de la EP.
- Los resultados obtenidos en células H4 apuntan a que YM y CGA podrían favorecer la eliminación de agregados proteicos mediante la activación del flujo autofágico, más que por una inhibición directa de su formación.
- En conjunto, los hallazgos respaldan la hipótesis de que la YM y el CGA actúan como moduladores metabólicos y proteostáticos, con potencial efecto neuroprotector en modelos celulares de neurodegeneración.

Las tres aproximaciones experimentales planteadas, junto con sus principales resultados se representan y resumen en la [figura 6.1](#). Figura que ilustra y profundiza la línea de hipótesis global planteada en el presente trabajo, junto con las aproximaciones experimentales empleadas.

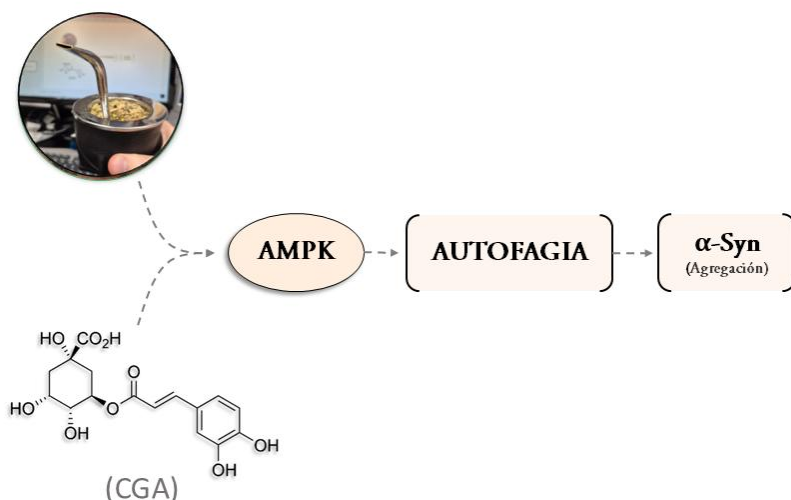


Figura 6.1: Resumen gráfico de las aproximaciones experimentales planteadas en el presente trabajo. (1) Determinación de la activación de AMPK en células SH-SY5Y tratadas con YM y CGA, mediante WB y RTqPCR. (2) Determinación del aumento de la autofagia en células SH-SY5Y tratadas con YM y CGA, medido mediante ICC contra LC3. (3) Determinación del efecto de la YM y CGA sobre el número y tamaño de agregados de A-Syn en células H4 cotransfectadas con SynT y Synfilin-1.

Finalmente, los resultados aquí obtenidos representan un punto de partida sólido para futuras investigaciones que deberán profundizar en la caracterización de las vías involucradas, validando los hallazgos en modelos animales y evaluando su relevancia en el contexto de enfermedades neurodegenerativas. De confirmarse, YM y CGA podrían constituir herramientas valiosas que, en un ideal, podrían aportar pistas clave en el diseño de terapias que contribuyan a enlentecer o prevenir la muerte neuronal dopaminérgica, aportando nuevas alternativas en la lucha contra patologías tan importantes a nivel global, como la enfermedad de Parkinson.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados presentados en esta tesis constituyen una primera aproximación experimental que vincula la activación de AMPK, la inducción de autofagia y la reducción de agregados de α -sinucleína (α -Syn) como posibles mecanismos celulares modulados por la yerba mate (YM) y uno de sus principales compuestos bioactivos, el ácido clorogénico (CGA). Si bien los hallazgos permiten delinear un modelo mecanístico integrador representan el inicio de diversas líneas de trabajo, algunas en curso y otras que apuntan a ser continuadas para profundizar y consolidar los mecanismos de neuroprotección inucidos por los extractos de YM o el CGA.

Experimentos complementarios a corto plazo

En un primer lugar, si bien los experimentos presentados mostraron un aumento consistente en la fosforilación de AMPK tras el tratamiento con YM y CGA, aún no puede descartarse que otras vías de señalización contribuyan a los fenómenos observados. Es por esto que con el fin de confirmar la participación de AMPK como mediador necesario de los efectos observados se procederá tanto por la inhibición farmacológica mediante el uso de fármacos como el *compound C* (Dorsomorphin), como por la utilización de herramientas de silenciamiento génico como ser RNAi contra AMPK en SH-SY5Y o en cultivos primarios dopaminérgicos. Este experimento permitirá determinar si la activación de esta quinasa es un requisito indispensable para observar los efectos neuroprotectores.

Paralelamente, dado que el incremento en el número de puncta LC3 constituye un indicio relevante de la inducción de estructuras autofágicas, pero no permite inferir de manera concluyente la dinámica completa del tráfico vesicular ni, por ende, del flujo autofágico, se plantea profundizar este análisis mediante ensayos específicos. En este sentido, la incorporación de inhibidores del tráfico vesicular, tales como bafilomicina A1 o cloroquina, resultará fundamental para distinguir entre un aumento en la formación de autofagosomas y una posible inhibición de su degradación lisosomal (Mizushima, Yoshimori y Levine, 2010). La aplicación de estos bloqueantes permitirá determinar si la YM y el CGA promueven un flujo autofágico funcional, condición indispensable para sostener su participación como inductores efectivos de procesos degradativos implicados en la proteostasis neuronal. Asimismo, la exploración de la activación de autofagia en cultivos primarios dopaminérgicos, daría un marco mas robusto para imaginar la activación de este fenómeno en el tipo neuronal afectado en la EP.

De manera complementaria, y con el objetivo de consolidar la evidencia de activación de la vía autofágica, se completarán los ensayos de *Western blot* dirigidos a la cuantificación de LC3-I/LC3-II y p62, marcadores ampliamente utilizados para evaluar la progresión y eficiencia del proceso autofágico.

Considerando la complejidad química de la YM ([ver sección 1.2.1.](#)), será relevante extender la exploración hacia otros compuestos bioactivos, particularmente la teobromina, una metilxantina que ha mostrado efectos neuroprotectores en cultivos dopaminérgicos primarios (Bernardi *et al.*, 2019). Dado que las xantinas pueden modular la actividad neuronal y el metabolismo energético a través de la señalización adenosinérgica y la modulación indirecta de AMPK, resulta fundamental evaluar si la teobromina reproduce —o potencia— los efectos observados para el CGA, ya sea de manera independiente o sinérgica. Estos estudios permitirán determinar si el efecto neuroprotector de la YM responde a la acción combinada de múltiples componentes y contribuirán a identificar qué fracción química o metabolitos específicos son responsables de la activación de AMPK y la inducción de vías autofágicas.

Perspectivas a mediano y largo plazo.

Resulta clave explorar con mayor profundidad el efecto de YM y CGA sobre la agregación de α -Syn, en principio en el modelo de células H4 aunque sería deseable poder hacerlo en modelos más robustos. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron una reducción en el número y tamaño de agregados, pero de los mismos se desprende inevitablemente un interrogante: ¿dicho efecto se debe a una inhibición de la formación de nuevas inclusiones o a la promoción de su degradación? La combinación de este modelo con herramientas de inhibición selectiva de autofagia, así como la evaluación de marcadores lisosomales, permitirá avanzar en este sentido.

Además, también en el modelo de H4, un aporte interesante consistiría en evaluar el impacto funcional del tratamiento con YM y CGA sobre el *clearance* de α -Syn, cuantificando no solo la carga de agregados sino también la degradación de especies solubles y oligoméricas mediante fraccionamiento proteico y *Western blot*. También, sería valioso determinar si los efectos observados se mantienen o se potencian en condiciones de estrés oxidativo o mitocondrial, para aproximar el modelo a escenarios fisiopatológicos más cercanos a la EP.

Complementariamente, pero no por eso menos importante, restaría conocer la “universalidad” del fenómeno, investigándolo en modelos bien establecidos de autofagia y en líneas celulares provenientes de diferentes tejidos.

Finalmente, la validación de estos hallazgos en modelos *in vivo* de la EP representa un paso primordial hacia la consolidación del potencial neuroprotector de la YM. Ensayos en modelos transgénicos en *Drosophila* que expresan α -Syn, sobre las que ya se ha comenzado a explorar en el laboratorio, o los modelos clásicos en ratón, tanto los inducidos por toxinas como los inducidos por lesión con 6-OHDA permitirán evaluar no solo la eficacia de los compuestos en un contexto fisiopatológico más complejo, biodisponibilidad y posible traslación a aplicaciones preclínicas, sino también relacionar cambios moleculares y celulares *in vivo* con “dosis” efectivas.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis resultan el punto de partida a un abanico de aproximaciones experimentales incluyendo estudios de biología molecular, ensayos funcionales de autofagia y modelos animales. Este camino permitirá establecer con mayor precisión si los compuestos de la YM representan una alternativa válida y científicamente fundamentada para contribuir a la prevención o al enlentecimiento de enfermedades neurodegenerativas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalyamova, M. *et al.* (2025) «Molecular basis of the development of Parkinson's disease», *Neuroscience*, 565, pp. 292-300. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2024.12.009>.
- Amara, A.W. y Memon, A.A. (2018) «Effects of Exercise on Non-motor Symptoms in Parkinson's Disease», *Clinical Therapeutics*, 40(1), pp. 8-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2017.11.004>.
- Anglade, P. *et al.* (1997) «Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease», *digitum.um.esP Anglade, S Vyas, F Javoy-Agid, MT Herrero Ezquerro, PP Michel, J MarquezHistology and histopathology, 1997•digitum.um.es* [Preprint]. Disponible en: <https://digitum.um.es/digitum/handle/10201/18924> (Accedido: 18 de agosto de 2025).
- Bayliss, J.A. *et al.* (2016) «Metformin Prevents Nigrostriatal Dopamine Degeneration Independent of AMPK Activation in Dopamine Neurons», *PloS one*, 11(7). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0159381>.
- Berg, D. *et al.* (2015) «MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease», *Movement Disorders* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.26431>.
- Van Der Berg, I. *et al.* (2024) «Dietary Interventions in Parkinson's Disease», *Journal of Parkinson's Disease*, 14(1). Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JPD-230366>.
- 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.27667>.
- Boerjan, W., Ralph, J. y Baucher, M. (2003) «L IGNIN BIOSYNTHESIS », *Annual Review of Plant Biology* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>.
- Bordi, M. *et al.* (2021) «A gene toolbox for monitoring autophagy transcription», *Cell Death & Disease*, 12(11), p. 1044. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04121-9>.
- Bortoli, P.M. *et al.* (2018) «*Ilex paraguariensis*: Potential antioxidant on aluminium toxicity, in an experimental model of Alzheimer's disease», *Journal of Inorganic Biochemistry*, 181, pp. 104-110. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2017.11.001>.
- Bracesco, N. *et al.* (2011) «Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview», *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), pp. 378-384. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>.
- Branco, C. dos S. *et al.* (2013) «Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats», *Brain Research Bulletin*, 92, pp. 60-68. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.11.008>.

Bravo, L. *et al.* (2025) «Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) Tea May Have Cardiometabolic Beneficial Effects in Healthy and At-Risk Subjects: A Randomized, Controlled, Blind, Crossover Trial in Nonhabitual Consumers», *Molecular Nutrition & Food Research*, 69(15), p. e70065. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/MNFR.70065>.

Brundin, P., Dave, K.D. y Kordower, J.H. (2017a) «Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology», *Experimental Neurology*, 298(Pt B), pp. 225-235. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.003>.

Brundin, P., Dave, K.D. y Kordower, J.H. (2017b) «Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology», *Experimental Neurology*, 298(Pt B), pp. 225-235. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.003>.

Burré, J. *et al.* (2010) « α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro», *Science*, 329(5999), pp. 1663-1667. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1195227>.

Burré, J. (2015) «The synaptic function of α -synuclein», *Journal of Parkinson's Disease*, 5(4), pp. 699-713. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JPD-150642>.

C. Jurado-Coronel, J. *et al.* (2016) «Implication of Green Tea as a Possible Therapeutic Approach for Parkinson Disease», *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/1871527315666160202125519>.

Cantó, C. *et al.* (2009) «AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity», *Nature*, 458(7241), pp. 1056-1060. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/NATURE07813>;KWWD.

Caruana, M. y Vassallo, N. (2015) «Tea polyphenols in parkinson's disease», *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Preprint]. Disponible en: https://doi.org/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)* [Preprint].

Cenci, M.A. y Konradi, C. (2010) «Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia», *Progress in Brain Research*, 183(C), pp. 209-233. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83011-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83011-0).

Chang, M.H. *et al.* (2024) «SARS-CoV-2 Spike Protein 1 Causes Aggregation of α -Synuclein via Microglia-Induced Inflammation and Production of Mitochondrial ROS: Potential Therapeutic Applications of Metformin», *Biomedicine*, 12(6), p. 1223. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES12061223/S1>.

Chiang, M.C. *et al.* (2016) «Metformin activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction», *Experimental Cell Research*, 347(2), pp. 322-331. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.013>.

- 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*, 5(11), p. e1542. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.506>.
- Clifford, M.N. *et al.* (2017) «Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity», *Natural Product Reports*, 34(12), pp. 1391-1421. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C7NP00030H>.
- Cohen, P. (2000) «The regulation of protein function by multisite phosphorylation - A 25 year update», *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), pp. 596-601. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01712-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01712-6).
- Colombo, R. y Papetti, A. (2020) «An outlook on the role of decaffeinated coffee in neurodegenerative diseases», *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), pp. 760-779. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1550384>.
- Conforti, A.S., Gallo, M.E. y Saraví, F.D. (2012) «Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women», *Bone*, 50(1), pp. 9-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.BONE.2011.08.029>.
- Conway, K.A., Harper, J.D. y Lansbury, P.T. (2000) «Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid», *Biochemistry*, 39(10), pp. 2552-2563. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/BI991447R>.
- Correa, V.G. *et al.* (2018) «Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.): A Promising Adjuvant in the Treatment of Diabetes, Obesity, and Metabolic Syndrome», *Nutraceuticals and Natural Product Derivatives: Disease Prevention & Drug Discovery*, pp. 167-181. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/9781119436713.CH8>.
- Costa, J. *et al.* (2010) «Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies», *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 20 Suppl 1(SUPPL.1). Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091525>.
- Cotzias, G.C., Van Woert, M.H. y Schiffer, L.M. (1967) «Aromatic amino acids and modification of parkinsonism», *The New England journal of medicine*, 276(7), pp. 374-379. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJM196702162760703>.
- Crane, F.L. (2001) «Biochemical Functions of Coenzyme Q10», *Journal of the American College of Nutrition*, 20(6), pp. 591-598. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719063>;JOURNAL:JOURNAL:UACN20;WGROU:STRING:PUBLICATION.
- Cropley, V. *et al.* (2012) «Does coffee enriched with chlorogenic acids improve mood and cognition after acute administration in healthy elderly? A pilot study», *Psychopharmacology*, 219(3), pp. 737-749. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S00213-011-2395-0>.
- Cubas Guillen, J. *et al.* (2023) «Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) consumption and risk of cognitive impairment: a prospective study project», *Alzheimer's & Dementia*, 19(S21), p. e078730. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ALZ.078730>.

Curry, D.W. *et al.* (2018) «Targeting AMPK signaling as a neuroprotective strategy in Parkinson's disease», *Journal of Parkinson's Disease*, 8(2), pp. 161-181. Disponible en: <https://doi.org/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*, 452-453, pp. 175-190. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.01.008>.

Decurgez, G. (2024) *Evaluación de mecanismos celulares regulados por la ingesta de yerba mate en un modelo de la enfermedad de Parkinson en Drosophila melanogaster*.

Delenclos, M. *et al.* (2019) «Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation», *Journal of Neurochemistry*. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>.

Deng, H. y Ma, Z. (2021) «Protective effects of berberine against MPTP-induced dopaminergic neuron injury through promoting autophagy in mice», *Food and Function*, 12(18), pp. 8366-8375. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/D1FO01360B>.

Devine, M.J. *et al.* (2011) «Parkinson's disease and α -synuclein expression», *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26(12), pp. 2160-2168. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/MDS.23948>.

Dextera, D.T. y Jenner, P. (2013) «Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms», *Free Radical Biology and Medicine* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>.

Djadjikerta, A. *et al.* (2020) «Autophagy Induction as a Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases», *Journal of Molecular Biology*, 432(8), pp. 2799-2821. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.035>.

Dominguez-Meijide, A. *et al.* (2021) «Doxycycline inhibits α -synuclein-associated pathologies in vitro and in vivo», *Neurobiology of disease*, 151. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2021.105256>.

Dong-Chen, X. *et al.* (2023) «Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions», *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/S41392-023-01353-3>.

Egan, D.F. *et al.* (2011) «Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy», *Science* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1196371>.

Ernst, M. *et al.* (2024) «Physical exercise for people with Parkinson's disease: a systematic review and network meta-analysis», *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013856.PUB3>.

Factor, S.A. (2008) «Current Status of Symptomatic Medical Therapy in Parkinson's Disease», *Neurotherapeutics*, 5(2), pp. 164-180. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.12.001>.

Falkenburger, B.H., Saridaki, T. y Dinter, E. (2016) «Cellular models for Parkinson's disease», *Journal of Neurochemistry*, pp. 121-130. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jnc.13618>.

Falkenburger, B.H. y Schulz, J.B. (2006) «Limitations of cellular models in Parkinson's disease research», *Journal of Neural Transmission, Supplement*, (70), pp. 261-268. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_40.

Fan, B. *et al.* (2020) «What and How Can Physical Activity Prevention Function on Parkinson's Disease?», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), p. 4293071. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2020/4293071>.

Fearnley, J.M. y Lees, A.J. (1991) «AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NIGRA REGIONAL SELECTIVITY», *Brain*, 114(5), pp. 2283-2301. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/BRAIN/114.5.2283>.

Ferrucci, M. *et al.* (2018) «Ambiguous Effects of Autophagy Activation Following Hypoperfusion/Ischemia», *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 2756, 19(9), p. 2756. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS19092756>.

Fields, C.R., Bengoa-Vergniory, N. y Wade-Martins, R. (2019) «Targeting Alpha-Synuclein as a Therapy for Parkinson's Disease», *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, p. 496177. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00299/FULL>.

Fleming, J. *et al.* (2008) «Detection of Compounds That Rescue Rab1-Synuclein Toxicity», *Methods in Enzymology*, 439, pp. 339-351. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00425-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00425-9).

Flint Beal, M. *et al.* (2014) «A Randomized Clinical Trial of High-Dosage Coenzyme Q10 in Early Parkinson Disease: No Evidence of Benefit», *JAMA Neurology*, 71(5), pp. 543-552. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2014.131>.

Folkerts, A.K. *et al.* (2023) «Physical Exercise as a Potential Treatment for Fatigue in Parkinson's Disease? A Systematic Review and Meta-Analysis of Pharmacological and Non-Pharmacological Interventions», *Journal of Parkinson's Disease*, 13(5), pp. 659-679. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JPD-225116>.

Funayama, M. *et al.* (2023) «Molecular genetics of Parkinson's disease: Contributions and global trends», *Journal of Human Genetics*, 68(3), pp. 125-130. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/S10038-022-01058-5>.

Gale, Catharine, Martyn, C. y Gale, Chris (2003) «Tobacco, coffee, and Parkinson's disease.», *BMJ (Clinical research ed.)*, 326(7389), pp. 561-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7389.561>.

Gao, X. *et al.* (2023) «Neuroprotective effect of chlorogenic acid on Parkinson's disease like symptoms through boosting the autophagy in zebrafish», *European Journal of Pharmacology*, 956. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175950>.

- 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*, 356(1-2), pp. 163-167. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.06.043>.
- Gawron-Gzella, A., Chanaj-Kaczmarek, J. y Cielecka-Piontek, J. (2021) «Yerba Mate—A Long but Current History», *Nutrients* 2021, Vol. 13, Page 3706, 13(11), p. 3706. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/NU13113706>.
- Gibb, W.R.G. y Lees, A.J. (1988) «The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease», *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/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* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>.
- Goltz, F., Van Der Heide, A. y Helmich, R.C. (2024) «Alleviating Stress in Parkinson's Disease: Symptomatic Treatment, Disease Modification, or Both?», *Journal of Parkinson's Disease*, 14(s1), pp. S147-S158. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JPD-230211>;JOURNAL:JOURNAL:PKNA;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:PKNA;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER.
- 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf048158g>.
- Gopar-Cuevas, Y. *et al.* (2023) «Metformin and Trehalose-Modulated Autophagy Exerts a Neurotherapeutic Effect on Parkinson's Disease», *Molecular Neurobiology* 2023 60:12, 60(12), pp. 7253-7273. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S12035-023-03530-5>.
- Greenamyre, J.T. y Hastings, T.G. (2004) «Parkinsons-divergent causes convergent mechanisms», *Science* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/science.1098966>.
- Gu, T. *et al.* (2023) «Chlorogenic Acid Alleviates LPS-Induced Inflammation and Oxidative Stress by Modulating CD36/AMPK/PGC-1 α in RAW264.7 Macrophages», *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), p. 13516. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS241713516>/S1.
- Guerreiro, P.S. *et al.* (2013) «LRRK2 interactions with α -synuclein in Parkinson's disease brains and in cell models», *Journal of Molecular Medicine*, 91(4), pp. 513-522. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S00109-012-0984-Y/FIGURES/5>.
- Gupta, A. *et al.* (2022) «Chlorogenic acid for cancer prevention and therapy: Current status on efficacy and mechanisms of action», *Pharmacological Research*, 186. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106505>.
- Hardie, D.G. (2014a) «AMP-Activated Protein Kinase: Maintaining Energy Homeostasis at the Cellular and Whole-Body Levels», *Annual Review of Nutrition*, 34(1), pp. 31-55. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161148>.

Hardie, D.G. (2014b) «AMPK - Sensing energy while talking to other signaling pathways», *Cell Metabolism*, 20(6), pp. 939-952. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.013>.

Hardie, D.G. (2015) «AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis», *Current Opinion in Cell Biology*, 33, pp. 1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2014.09.004>.

Hardie, D.G., Ross, F.A. y Hawley, S.A. (2012) «AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, pp. 251-262. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrm3311>.

Hauché P., H.E. (2020) «Estudio de los mecanismos moleculares regulados por la yerba mate en neuronas dopaminérgicas en cultivo.»

He, C.L. *et al.* (2023) «Chlorogenic acid delays the progression of Parkinson's disease via autophagy induction in *Caenorhabditis elegans*», *Nutritional neuroscience*, 26(1), pp. 11-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.2009993>.

Hebron, M.L., Lonskaya, I. y Moussa, C.E.H. (2013) «Nilotinib reverses loss of dopamine neurons and improves motor behavior via autophagic degradation of α -synuclein in Parkinson's disease models», *Human Molecular Genetics*, 22(16), p. 3315. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/HMG/DDT192>.

Heck, C.I. y 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>.

Heitman, E. y Ingram, D.K. (2017) «Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid», *Nutritional Neuroscience*. Taylor and Francis Ltd., pp. 32-39. Disponible en: <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.00000000146>.

Herrada, A.A. *et al.* (2025) «Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating Regulatory T Cell Function», *Nutrients*, 17(5), p. 897. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/NU17050897/S1>.

Herzig, S. y Shaw, R.J. (2018) «AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis», *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2), pp. 121-135. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/NRM.2017.95>.

Holczer, M. *et al.* (2018) «Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) promotes autophagy-dependent survival via influencing the balance of mTOR-AMPK pathways upon endoplasmic reticulum stress», *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/6721530>.

Hornykiewicz, O. (1966) «Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function.», *Pharmacological reviews*. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0031-6997\(25\)07154-6](https://doi.org/10.1016/s0031-6997(25)07154-6).

- Hou, Y.-S. *et al.* (2015) «Sestrin2 Protects Dopaminergic Cells against Rotenone Toxicity through AMPK-Dependent Autophagy Activation», *Molecular and Cellular Biology*, 35(16), pp. 2740-2751. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/MCB.00285-15>.
- Hu, G. *et al.* (2007) «Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease», *Movement Disorders*, 22(15), pp. 2242-2248. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/MDS.21706>; WEBSITE: WEBSITE: MOVEMENTDISORDERS; JOURNAL: JOURNAL: 15318257; REQUESTED JOURNAL: JOURNAL: 15318257; ISSUE: ISSUE: DOI.
- Huang, R. *et al.* (2015) «Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation», *Molecular Cell*, 57(3), pp. 456-466. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.013>.
- Hunter, T. (2007) «The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond», *Molecular Cell*, 28(5), pp. 730-738. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.019>.
- Ito, H. *et al.* (2008) «Chlorogenic acid and its metabolite m-coumaric acid evoke neurite outgrowth in hippocampal neuronal cells», *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/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. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009290>.
- Jankovic, J., Rousseaux, M.W.C. y Shulman, J.M. (2017) «Progress toward an integrated understanding of Parkinson's disease», *F1000Research* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.12688/f1000research.11820.1>.
- Jankovic, J. y Tan, E.K. (2020) «Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment», *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 91(8), pp. 795-808. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/JNNP-2019-322338>.
- Janssen Daalen, J.M. *et al.* (2022) «Lifestyle Interventions for the Prevention of Parkinson Disease», *Neurology*, 99(7), pp. 42-51. Disponible en: <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200787>.
- Jeon, S.M. (2016) «Regulation and function of AMPK in physiology and diseases», *Experimental & Molecular Medicine* 2016 48:7, 48(7), pp. e245-e245. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/emm.2016.81>.
- José, M.F.B. *et al.* (2023) «Physiological effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*): a systematic review», *Nutrition Reviews*, 81(9), pp. 1163-1179. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUAC109>.
- Kalender, A. *et al.* (2010) «Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner», *Cell Metabolism*, 11(5), pp. 390-401. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.014>.

- Kalia, L. V. y Lang, A.E. (2015) «Parkinson's disease», *The Lancet* [Preprint]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Kamada, Y. *et al.* (2010) «Tor Directly Controls the Atg1 Kinase Complex To Regulate Autophagy», *Molecular and Cellular Biology*, 30(4), pp. 1049-1058. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/MCB.01344-09>;WEBSITE:WEBSITE:TFOPB;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.
- Kang, Y.-R. *et al.* (2012) «Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet», *Laboratory Animal Research*, 28(1), pp. 23-29. Disponible en: <https://doi.org/10.5625/LAR.2012.28.1.23>.
- Karuppagounder, S.S. *et al.* (2014) «The c-Abl inhibitor, Nilotinib, protects dopaminergic neurons in a preclinical animal model of Parkinson's disease», *Scientific Reports 2014 4:1*, 4(1), pp. 1-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/srep04874>.
- Katila, N. *et al.* (2017) «Metformin lowers α -synuclein phosphorylation and upregulates neurotrophic factor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease», *Neuropharmacology*, 125, pp. 396-407. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.NEUROPHARM.2017.08.015>.
- Kim, C. y Lee, S.J. (2008) «Controlling the mass action of α -synuclein in Parkinson's disease», *Journal of Neurochemistry*, 107(2), pp. 303-316. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05612.X>.
- Kim, H.S. *et al.* (2013) «Epigallocatechin Gallate (EGCG) Stimulates Autophagy in Vascular Endothelial Cells: A POTENTIAL ROLE FOR REDUCING LIPID ACCUMULATION», *Journal of Biological Chemistry*, 288(31), pp. 22693-22705. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.477505>.
- Kim, H.S., Quon, M.J. y Kim, J. a. (2014) «New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate», *Redox Biology*, 2(1), pp. 187-195. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2013.12.022>.
- Kim, J. *et al.* (2011) «AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1», *Nature Cell Biology*, 13(2), pp. 132-141. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/NCB2152>.
- Kim, Jiyoung *et al.* (2012) «Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H₂O₂-induced apoptosis in primary cortical neurons», *Neurochemistry international*, 60(5), pp. 466-474. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2012.02.004>.
- Kim, R. *et al.* (2023) «Effects of physical exercise interventions on cognitive function in Parkinson's disease: An updated systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials», *Parkinsonism & Related Disorders*, 117, p. 105908. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.PARKRELDIS.2023.105908>.

- Kim, S.Y. *et al.* (2015) «Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial», *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S12906-015-0859-1>.
- Kim, T.Y. y Lee, B.D. (2025) «Current therapeutic strategies in Parkinson's disease: Future perspectives», *Molecules and Cells*, 48(11), p. 100274. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.MOCELL.2025.100274>.
- Kip, E. y Parr-Brownlie, L.C. (2022) «Reducing neuroinflammation via therapeutic compounds and lifestyle to prevent or delay progression of Parkinson's disease», *Ageing Research Reviews*, 78, p. 101618. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2022.101618>.
- Klionsky, D.J. *et al.* (2012) «Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy», *Autophagy*, 8(4), pp. 445-544. Disponible en: <https://doi.org/10.4161/auto.19496>.
- Kola, S. y Subramanian, I. (2023) «Updates in Parkinson's Disease Integrative Therapies: an Evidence-Based Review», *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 23(11), pp. 717-726. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S11910-023-01312-Z/TABLES/1>.
- Kong, L. *et al.* (2021) «Chlorogenic acid and caffeine combination attenuates adipogenesis by regulating fat metabolism and inhibiting adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells», *Journal of Food Biochemistry*, 45(7), p. e13795. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/JFBC.13795>.
- Kovalevich, J. y Langford, D. (2013) «Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology», *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1078, p. 9. Disponible en: https://doi.org/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. Disponible en: <https://doi.org/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). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1154>.
- Kroemer, G., Mariño, G. y Levine, B. (2010) «Autophagy and the Integrated Stress Response», *Molecular Cell*, 40(2), pp. 280-293. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2010.09.023>.
- Kruczkowska, W. *et al.* (2025) «Overview of Metformin and Neurodegeneration: A Comprehensive Review», *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 18(4). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/PH18040486>.
- Kwon, S.H. *et al.* (2010) «Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice», *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), pp. 210-217. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.001>.

- Lage, L. *et al.* (2024) «Angiotensin type 1 receptor activation promotes neuronal and glial alpha-synuclein aggregation and transmission», *npj Parkinson's Disease*, 10(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/S41531-024-00650-0>.
- Lage, L. *et al.* (2025) «Fasudil inhibits α -synuclein aggregation through ROCK-inhibition-mediated mechanisms», *Neurotherapeutics*, 22(2), p. e00544. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.NEUROT.2025.E00544>.
- Langeskov-Christensen, M. *et al.* (2024) «Exercise as medicine in Parkinson's disease», *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 95(11), pp. 1077-1088. Disponible en: <https://doi.org/10.1136/JNNP-2023-332974>.
- Lapchak, P.A. *et al.* (1997) «Glial cell line-derived neurotrophic factor: a novel therapeutic approach to treat motor dysfunction in Parkinson's disease», *Experimental neurology*, 144(1), pp. 29-34. Disponible en: <https://doi.org/10.1006/EXNR.1996.6384>.
- Lashuel, H.A. (2021) «Alpha-Synuclein oligomerization and aggregation: All models are useful but only if we know what they model», *Journal of Neurochemistry*, 157(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jnc.15275>.
- Lázaro, D.F. *et al.* (2016) «The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation», *Acta neuropathologica communications*, 4(1), p. 128. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S40478-016-0402-8/FIGURES/6>.
- Lee, J.-H. *et al.* (2015) «EGCG-mediated autophagy flux has a neuroprotection effect via a class III histone deacetylase in primary neuron cells», *Oncotarget*, 6(12), pp. 9701-9717. Disponible en: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.3832>.
- Li, P. *et al.* (2018) «Isoflavones Induce BEX2-Dependent Autophagy to Prevent ATR-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells», *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(5), pp. 1866-1879. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000484075>.
- Li, W. *et al.* (2011) «EGCG stimulates autophagy and reduces cytoplasmic HMGB1 levels in endotoxin-stimulated macrophages», *Biochemical Pharmacology*, 81(9), pp. 1152-1163. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2011.02.015>.
- de Lima, M.E. *et al.* (2017) «Protective effect of Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) against oxidative damage in vitro in rat brain synaptosomal/mitochondrial P2 fractions», *Journal of Functional Foods*, 34, pp. 447-452. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.05.026>.
- Limanaqi, F. *et al.* (2018) «Interdependency Between Autophagy and Synaptic Vesicle Trafficking: Implications for Dopamine Release», *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, p. 412082. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2018.00299/ENDNOTE>.
- Limanaqi, F., Biagioni, F., Busceti, C.L., Ryskalin, L., Soldani, P., *et al.* (2019) «Cell Clearing Systems Bridging Neuro-Immunity and Synaptic Plasticity», *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 2197, 20(9), p. 2197. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS20092197>.

Limanaqi, F., Biagioni, F., Busceti, C.L., Ryskalin, L., Polzella, M., *et al.* (2019) «Phytochemicals Bridging Autophagy Induction and Alpha-Synuclein Degradation in Parkinsonism», *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 3274, 20(13), p. 3274. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS20133274>.

Lister, T. (2020) «Nutrition and lifestyle interventions for managing parkinson's disease: A narrative review», *Journal of Movement Disorders*, 13(2), pp. 97-104. Disponible en: <https://doi.org/10.14802/JMD.20006>.

Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001) «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method», *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), pp. 402-408. Disponible en: <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>.

Lu, M. *et al.* (2016) «Metformin Prevents Dopaminergic Neuron Death in MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease via Autophagy and Mitochondrial ROS Clearance», *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(9), p. pyw047. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw047>.

Lutomski, P., Goździewska, M. y Florek-Łuszczki, M. (2020) «Health properties of Yerba Mate», *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 27(2), pp. 310-313. Disponible en: <https://doi.org/10.26444/AAEM/119994>.

Lynch-Day, M.A. *et al.* (2012) «The Role of Autophagy in Parkinson's Disease», *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(4), p. a009357. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A009357>.

Ma, K. *et al.* (2023) «Chlorogenic Acid from Burdock Roots Ameliorates Oleic Acid-Induced Steatosis in HepG2 Cells through AMPK/ACC/CPT-1 Pathway», *Molecules*, 28(21), p. 7257. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28217257/S1>.

Macedo, D. *et al.* (2015) «(Poly)phenols protect from α -synuclein toxicity by reducing oxidative stress and promoting autophagy», *Human Molecular Genetics*, 24(6), pp. 1717-1732. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/HMG/DDU585>.

Mak, M.K. *et al.* (2017) «Long-term effects of exercise and physical therapy in people with Parkinson disease», *Nature Reviews Neurology* 2017 13:11, 13(11), pp. 689-703. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.128>.

Manchester, K.L. (1995) «Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids», *BioTechniques*.

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. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.27489>.

Maries, E. *et al.* (2003) «The role of α -synuclein in Parkinson's disease: Insights from animal models», *Nature Reviews Neuroscience*, 4(9), pp. 727-738. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/NRN1199>.

Markowicz-Piasecka, M. *et al.* (2017) «Metformin - a Future Therapy for Neurodegenerative Diseases : Theme: Drug Discovery, Development and Delivery in Alzheimer's Disease Guest Editor: Davide Brambilla.», *Pharmaceutical research*, 34(12), pp. 2614-2627. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2199-y>.

Marques, V. y Farah, A. (2009) «Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions», *Food Chemistry*, 113(4), pp. 1370-1376. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.086>.

Marras, C. y 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.27613>.

Mary, A. *et al.* (2025) «Hampered AMPK-ULK1 cascade in Alzheimer's disease (AD) instigates mitochondria dysfunctions and AD-related alterations which are alleviated by metformin», *Alzheimer's Research & Therapy* 2025 17:1, 17(1), pp. 1-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S13195-025-01772-0>.

Masaracchia, C. *et al.* (2020) «Molecular characterization of an aggregation-prone variant of alpha-synuclein used to model synucleinopathies», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(1), p. 140298. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2019.140298>.

McLean, P.J. *et al.* (2002) «TorsinA and heat shock proteins act as molecular chaperones: Suppression of α -synuclein aggregation», *Journal of Neurochemistry*, 83(4), pp. 846-854. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2002.01190.X>.

McLean, P.J., Kawamata, H. y Hyman, B.T. (2001) « α -Synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons», *Neuroscience*, 104(3), pp. 901-912. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00113-0).

Medeiros, M. *et al.* (2021) «A Case-Control Study of the Effects of Chimarrão (*Ilex paraguariensis*) and Coffee on Parkinson's Disease», *Frontiers in neurology*, 12. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2021.619535>.

Mehraban, R.A.M. *et al.* (2024) «Metformin improves memory via AMPK/mTOR-dependent route in a rat model of Alzheimer's disease», *Iranian journal of basic medical sciences*, 27(3), pp. 360-365. Disponible en: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2023.73075.15879>.

Melki, R. (2015) «Role of different alpha-synuclein strains in synucleinopathies, similarities with other neurodegenerative diseases», *Journal of Parkinson's Disease*, 5(2), pp. 217-227. Disponible en: <https://doi.org/10.3233/JPD-150543>.

Menon, S. *et al.* (2022) «Alpha-Synuclein Targeting Therapeutics for Parkinson's Disease and Related Synucleinopathies», *Frontiers in Neurology*, 13, p. 852003. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2022.852003/FULL>.

- Menzies, F.M. *et al.* (2017) «Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities.», *Neuron*, 93(5), pp. 1015-1034. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>.
- Michel, P.P. y Agid, Y. (1996) «Chronic activation of the cyclic AMP signaling pathway promotes development and long-term survival of mesencephalic dopaminergic neurons», *Journal of neurochemistry*, 67(4), pp. 1633-1642. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1996.67041633.X>.
- Michel, Patrick P., Hirsch, E.C. y Hunot, S. (2016) «Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease», *Neuron*, 90(4), pp. 675-691. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.038>.
- Michel, Patrick P., Hirsch, E.C. y Hunot, S. (2016) «Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease», *Neuron*, 90(4), pp. 675-691. Disponible en: <https://doi.org/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. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.2166>.
- Mizushima, N. (2011) «Autophagy in Protein and Organelle Turnover», *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, pp. 397-402. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/SQB.2011.76.011023>.
- Mizushima, N. y Komatsu, M. (2011) «Autophagy: Renovation of Cells and Tissues», *Cell*, 147(4), pp. 728-741. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.10.026>.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. y Levine, B. (2010) «Methods in Mammalian Autophagy Research», *Cell*, 140(3), pp. 313-326. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>.
- Montenegro, J. (1711) *Materia Médica Misionera*.
- Moore, R.G., McDermott, D.L. y Wood, T.R. (1948) «Determination of Chlorogenic Acid in Coffee», *Analytical Chemistry*, 20(7), pp. 620-624. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/ac60019a007>.
- De Moraes, P. *et al.* (2015) «Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis* A. St. Hil) and Risk Factors for Cardiovascular Diseases», *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(3), pp. 182-190. Disponible en: <https://doi.org/10.12691/JFNR-3-3-9>.
- De Moraes, E.C. *et al.* (2009) «Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects and Provides an Additional LDL-Cholesterol Reduction in Individuals on Statin Therapy», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), pp. 8316-8324. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/JF901660G>.
- Morens, D.M. *et al.* (1995) «Cigarette smoking and protection from parkinson's disease: False association or etiologic clue?», *Neurology* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1212/WNL.45.6.1041>.

Musi, N. *et al.* (2002) «Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes», *Diabetes*, 51(7), pp. 2074-2081. Disponible en: <https://doi.org/10.2337/DIABETES.51.7.2074>.

Nasri, H. *et al.* (2014) «New Concepts in Nutraceuticals as Alternative for Pharmaceuticals», *International Journal of Preventive Medicine*, 5(12), p. 1487. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4336979/> (Accedido: 8 de noviembre de 2025).

Näsström, T. *et al.* (2011) «Antibodies against alpha-synuclein reduce oligomerization in living cells», *PloS one*, 6(10). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0027230>.

Nguyen, V. *et al.* (2024) «Chlorogenic Acid: A Systematic Review on the Biological Functions, Mechanistic Actions, and Therapeutic Potentials», *Nutrients* 2024, Vol. 16, Page 924, 16(7), p. 924. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/NU16070924>.

Noyce, A.J. *et al.* (2012) «Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease», *Annals of Neurology* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ana.23687>.

Obergasteiger, J. *et al.* (2018) «A new hypothesis for Parkinson's disease pathogenesis: GTPase-p38 MAPK signaling and autophagy as convergence points of etiology and genomics», *Molecular Neurodegeneration* 2018 13:1, 13(1), pp. 1-17. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S13024-018-0273-5>.

Obeso, J.A. *et al.* (2008) «Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease», *Movement Disorders*, 23(SUPPL. 3). Disponible en: <https://doi.org/10.1002/MDS.22062>.

Oertel, W. y Schulz, J.B. (2016) «Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists», *Journal of Neurochemistry*, 139, pp. 325-337. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/JNC.13750;CSUBTYPE:STRING:SPECIAL;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>.

Okamoto, K. (2014) «Organellophagy: Eliminating cellular building blocks via selective autophagy», *Journal of Cell Biology*, 205(4), pp. 435-445. Disponible en: <https://doi.org/10.1083/JCB.201402054>.

Olate-Briones, A. *et al.* (2024) «Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Reduces Colitis Severity by Promoting Anti-Inflammatory Macrophage Polarization», *Nutrients*, 16(11), p. 1616. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/NU16111616/S1>.

Ong, K.W., Hsu, A. y 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). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032718>.

Ong, K.W., Hsu, A. y Tan, B.K.H. (2013) «Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation», *Biochemical Pharmacology*, 85(9), pp. 1341-1351. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2013.02.008>.

- Otaegui-Arrazola, A. *et al.* (2014) «Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought», *European Journal of Nutrition*, 53(1), pp. 1-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0561-3>.
- Outeiro, T.F. y Lindquist, S. (2003) «Yeast Cells Provide Insight into Alpha-Synuclein Biology and Pathobiology», *Science*, 302(5651), pp. 1772-1775. Disponible en: <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1090439>.
- Pagan, F.L. *et al.* (2020) «Nilotinib Effects on Safety, Tolerability, and Potential Biomarkers in Parkinson Disease: A Phase 2 Randomized Clinical Trial», *JAMA neurology*, 77(3), pp. 309-317. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2019.4200>.
- Pardo-Moreno, T. *et al.* (2023) «Current Treatments and New, Tentative Therapies for Parkinson's Disease», *Pharmaceutics*, 15(3), p. 770. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15030770>.
- Parekh, P. *et al.* (2022) «AMPK-dependent autophagy activation and alpha-Synuclein clearance: a putative mechanism behind alpha-mangostin's neuroprotection in a rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease», *Metabolic brain disease*, 37(8), pp. 2853-2870. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S11011-022-01087-1>.
- Park, J. *et al.* (2025) «Comparison of the Impact of Various Exercise Modalities on Parkinson's Disease», *Journal of Movement Disorders*, 18(3), pp. 222-230. Disponible en: <https://doi.org/10.14802/JMD.25038>.
- 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* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/archneur.1969.00480100117017>.
- Parkinson, J. (2002) «An essay on the shaking palsy. 1817.», *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2).
- Pasquali, L. *et al.* (2009) «Does autophagy worsen or improve the survival of dopaminergic neurons?», *Parkinsonism & Related Disorders*, 15(SUPPL. 4), pp. S24-S27. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(09\)70830-2](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(09)70830-2).
- Paudel, Y.N. *et al.* (2020) «Emerging neuroprotective effect of metformin in Parkinson's disease: A molecular crosstalk», *Pharmacological Research*, 152. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104593>.
- Poels, J. *et al.* (2009) «Expanding roles for AMP-activated protein kinase in neuronal survival and autophagy», *BioEssays*. Bioessays, pp. 944-952. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bies.200900003>.
- Poewe, W. *et al.* (2017) «Parkinson disease», *Nature Reviews Disease Primers* 2017 3:1, 3(1), pp. 1-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- Pomilio, A.B., Trajtemberg, S. y 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/pca.647>.

Postuma, R.B. y Berg, D. (2019) «Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come», *Movement Disorders*, 34(5), pp. 665-675. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/MDS.27670>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:15318257;WGROU:STRING:PUBLICATION.

Prasanth, M.I. *et al.* (2019) «A review of the role of green tea (camellia sinensis) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy», *Nutrients*, 11(2). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/NU11020474>.

Pugsley, H.R. (2017) «Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry», *Methods*, 112, pp. 147-156. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2016.05.022>.

Qi, H. y Li, S. (2014) «Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease», *Geriatrics and Gerontology International*, 14(2), pp. 430-439. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/GGI.12123>;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;WEBSITE:WEBSITE:PERICLES;ISSUE:ISSUE:DOI.

Rena, G., Grahame, & D. y Pearson, E.R. (sin fecha) «The mechanisms of action of metformin-carboxamide ribonucleoside AMPK AMP-activated protein kinase EGP Endogenous glucose production FDG Fluorodeoxyglucose G6Pase Glucose-6-phosphatase GI Gastrointestinal GLP-1 Glucagon-like peptide-1 mGPD Mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase NLR Neutrophil to lymphocyte ratio OCT1 Organic cation transporter 1 PET Positron emission tomography PKA Protein kinase A SERT Serotonin transporter ZMP 5-Amino-4-imidazolecarboxamide riboside 5'-monophosphate». Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>.

Rena, G., Hardie, D.G. y Pearson, E.R. (2017) «The mechanisms of action of metformin», *Diabetologia*. Springer Verlag, pp. 1577-1585. Disponible en: <https://doi.org/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* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/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*, 69(6), pp. 308-313. Disponible en: <https://doi.org/10.24875/RIC.17002291>.

Ross, G.W. *et al.* (2000) «Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease», *Journal of the American Medical Association* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.283.20.2674>.

Rubinsztein, D.C., Mariño, G. y Kroemer, G. (2011) «Autophagy and aging», *Cell*, 146(5), pp. 682-695. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>.

Runwal, G. *et al.* (2019) «LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells». Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46657-z>.

Sahoo, S. *et al.* (2022) «Role of Ubiquitin-Proteasome and Autophagy-Lysosome Pathways in α -Synuclein Aggregate Clearance», *Molecular neurobiology*, 59(9), pp. 5379-5407. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S12035-022-02897-1>.

Santos, C.C. *et al.* (2022) «JM-20, a Benzodiazepine-Dihydropyridine Hybrid Molecule, Inhibits the Formation of Alpha-Synuclein-Aggregated Species», *Neurotoxicity Research*, 40(6), pp. 2135-2147. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S12640-022-00559-7>,.

Santos, E. C.S. *et al.* (2015) «Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice», *Neuroscience*, 292, pp. 13-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.004>.

Santos, E C S *et al.* (2015) «Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice», *Neuroscience*, 292, pp. 13-21. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.004>.

Sato, S. *et al.* (2018) «Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice», *Scientific Reports*, 8(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1038/S41598-018-21325-W>,.

Schapira, A.H.V. y Olanow, C.W. (2004) «Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions», *JAMA*, 291(3), pp. 358-364. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/JAMA.291.3.358>.

Schootemeijer, S. *et al.* (2020) «Current Perspectives on Aerobic Exercise in People with Parkinson's Disease», *Neurotherapeutics*, 17(4), pp. 1418-1433. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S13311-020-00904-8>.

Shan, S., Tian, L. y Fang, R. (2019) «Chlorogenic acid exerts beneficial effects in 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by inhibition of endoplasmic reticulum stress», *Medical Science Monitor*, 25, pp. 453-459. Disponible en: <https://doi.org/10.12659/MSM.911166>.

Shults, C.W. *et al.* (2002) «Effects of Coenzyme Q10 in Early Parkinson Disease: Evidence of Slowing of the Functional Decline», *Archives of Neurology*, 59(10), pp. 1541-1550. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.59.10.1541>.

Siderowf, A. y Lang, A.E. (2012) «Premotor Parkinson's disease: Concepts and definitions», *Movement Disorders* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.24954>.

da Silva, E.L. *et al.* (2008) «Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation», *Food Research International*, 41(10), pp. 973-979. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2008.08.004>.

- Simuni, T. *et al.* (2021) «Efficacy of Nilotinib in Patients With Moderately Advanced Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial», *JAMA neurology*, 78(3), pp. 312-320. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2020.4725>.
- Sivanandy, P. *et al.* (2021) «Systematic Review on Parkinson's Disease Medications, Emphasizing on Three Recently Approved Drugs to Control Parkinson's Symptoms», *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2022, Vol. 19, Page 364, 19(1), p. 364. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJERPH19010364>.
- Socała, K. *et al.* (2021) «Neuroprotective effects of coffee bioactive compounds: A review», *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), pp. 1-64. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS22010107>.
- Soto, C. y Pritzkow, S. (2018) «Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases», *Nature Neuroscience* 2018 21:10, 21(10), pp. 1332-1340. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0235-9>.
- Srivastav, S., Fatima, M. y Mondal, A.C. (2017) «Important medicinal herbs in Parkinson's disease pharmacotherapy», *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 92, pp. 856-863. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.137>.
- Srivastava, P. y Yadav, R.S. (2016) «Efficacy of Natural Compounds in Neurodegenerative Disorders», *Advances in Neurobiology*, 12, pp. 107-123. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-28383-8_7.
- Stacchiotti, A. y Corsetti, G. (2020) «Natural Compounds and Autophagy: Allies Against Neurodegeneration», *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., p. 989. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.555409>.
- Stephenne, X. *et al.* (2011) «Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status», *Diabetologia*, 54(12), pp. 3101-3110. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S00125-011-2311-5>.
- Sulzer, D. y Surmeier, D.J. (2013) «Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease.», *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28(6), pp. 715-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/mds.25187>.
- Surmeier, D.J. (2007) «Calcium , ageing , and neuronal vulnerability in Parkinson ' s disease», pp. 933-938.
- Surmeier, D.J. *et al.* (2010) *What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease?*, *Progress in Brain Research*. Elsevier B.V. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)83004-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)83004-3).
- Suski, V. y Stacy, M. (2023) «Dopamine Agonists», *Handbook of Parkinson's Disease, Fifth Edition*, pp. 414-429. Disponible en: https://doi.org/10.5005/jp/books/10587_26.

- Tajik, N. *et al.* (2017) «The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature», *European Journal of Nutrition*, 56(7), pp. 2215-2244. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1379-1>.
- Tocci, D. *et al.* (2025) «Beyond expectations: investigating nilotinib's potential in attenuating neurodegeneration in Alzheimer's disease», *Alzheimer's Research & Therapy* 2025 17:1, 17(1), pp. 1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S13195-025-01706-W>.
- Tooze, S.A. y Schiavo, G. (2008) «Liaisons dangereuses: autophagy, neuronal survival and neurodegeneration», *Current Opinion in Neurobiology*, 18(5), pp. 504-515. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2008.09.015>.
- Tribbia, L. *et al.* (2019) «Study of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*) as a Neuroprotective Agent of Dopaminergic Neurons in an Animal Model of Parkinson's Disease (P5.8-008)», *Neurology*, 92(15_supplement), p. P5.8-008. Disponible en: https://doi.org/10.1212/WNL.92.15_SUPPLEMENT.P5.8-008.
- Trivedi, P.C. *et al.* (2016) «Glucolipotoxicity diminishes cardiomyocyte TFEB and inhibits lysosomal autophagy during obesity and diabetes», *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(12), pp. 1893-1910. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.09.004>.
- Tsai, K.L. *et al.* (2018) «Chlorogenic Acid Protects Against oxLDL-Induced Oxidative Damage and Mitochondrial Dysfunction by Modulating SIRT1 in Endothelial Cells», *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(11), p. 1700928. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/MNFR.201700928>.
- Tsuda, S. *et al.* (2012) «Coffee polyphenol caffeic acid but not chlorogenic acid increases 5'AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle», *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(11), pp. 1403-1409. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2011.09.001>.
- Vasileva, L. V. *et al.* (2020) «Caffeic and Chlorogenic Acids Synergistically Activate Browning Program in Human Adipocytes: Implications of AMPK- and PPAR-Mediated Pathways», *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 9740, 21(24), p. 9740. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS21249740>.
- Vekrellis, K. *et al.* (2011) «Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders», *The Lancet Neurology*, 10(11), pp. 1015-1025. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70213-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70213-7).
- Ventruti, A. y Cuervo, A.M. (2007) «Autophagy and neurodegeneration», *Current neurology and neuroscience reports*, 7(5), pp. 443-451. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S11910-007-0068-5>.
- Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T. y Outeiro, T.F. (2016) «Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies», *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 1, pp. 240-255. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/JNC.13249>.

- Wang, L. *et al.* (2022) «The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review», *Frontiers in Nutrition*, 9, p. 943911. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/FNUT.2022.943911/FULL>.
- Wang, Y. *et al.* (2019) «Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK», *Cell Reports*, 29(6), pp. 1511-1523.e5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.070>.
- Weil, R.S. *et al.* (2017) «Current concepts and controversies in the pathogenesis of Parkinson's disease dementia and Dementia with Lewy Bodies», *F1000Research* [Preprint]. Disponible en: <https://doi.org/10.12688/f1000research.11725.1>.
- Winner, B. y Winkler, J. (2015) «Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases», *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(4). Disponible en: <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021287>.
- Wu, J.Z. *et al.* (2019) «Dihydromyricetin and Salvianolic acid B inhibit alpha-synuclein aggregation and enhance chaperone-mediated autophagy», *Translational Neurodegeneration*, 8(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S40035-019-0159-7>.
- Xicoy, H., Wieringa, B. y Martens, G.J.M. (2017) «The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review», *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 10. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
- Xie, Z. y Klionsky, D.J. (2007) «Autophagosome formation: Core machinery and adaptations», *Nature Cell Biology*, 9(10), pp. 1102-1109. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/NCB1007-1102>.
- Xu, L. y Ash, J.D. (2016) «The role of AMPK pathway in neuroprotection», en *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC, pp. 425-430. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-17121-0_56.
- Xu, M. *et al.* (2019) «Collaborative effects of chlorogenic acid and caffeine on lipid metabolism via the AMPK α -LXR α /SREBP-1c pathway in high-fat diet-induced obese mice», *Food & Function*, 10(11), pp. 7489-7497. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C9FO00502A>.
- Xue, H., Wei, M. y Ji, L. (2023) «Chlorogenic acids: A pharmacological systematic review on their hepatoprotective effects», *Phytomedicine*, 118, p. 154961. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2023.154961>.
- Yan, Q. *et al.* (2017) «Activation of AMPK/mTORC1-mediated autophagy by metformin reverses Clk1 deficiency-sensitized dopaminergic neuronal death», *Molecular Pharmacology*, 92(6), pp. 640-652. Disponible en: <https://doi.org/10.1124/mol.117.109512>.
- Yan, Y. *et al.* (2020) «Use of Chlorogenic Acid against Diabetes Mellitus and Its Complications», *Journal of Immunology Research*, 2020(1), p. 9680508. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2020/9680508>.

- Yao, Y.X. *et al.* (2025) «Chlorogenic Acid Ameliorates Acetaminophen-Induced Liver Injury Through AMPK/mTOR/ULK1-Mediated Autophagy Activation», <https://doi.org/10.1142/S0192415X2550020X>, 53(2), pp. 523-542. Disponible en: <https://doi.org/10.1142/S0192415X2550020X>.
- Yu, L., Chen, Y. y Tooze, S.A. (2018) «Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms», *Autophagy*, 14(2), pp. 207-215. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1378838>,.
- Yu, S. *et al.* (2015) «Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial», *Experimental Gerontology*, 62, pp. 14-22. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2014.12.016>.
- Yuan, H. *et al.* (2010) «Treatment strategies for Parkinson's disease», *Neuroscience Bulletin* 2010 26:1, 26(1), pp. 66-76. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/S12264-010-0302-Z>.
- Zhou, G. *et al.* (2001) «Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action», *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), pp. 1167-1174. Disponible en: <https://doi.org/10.1172/JCI13505>,.
- Zhou, J. *et al.* (2014) «Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), a Green Tea Polyphenol, Stimulates Hepatic Autophagy and Lipid Clearance», *PLOS ONE*, 9(1), p. e87161. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087161>.
- Zhu, J. *et al.* (2024) «Temporal trends in the prevalence of Parkinson's disease from 1980 to 2023: a systematic review and meta-analysis», *The Lancet Healthy Longevity*, 5(7), pp. e464-e479. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(24\)00094-1](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(24)00094-1),.
- Zhu, Y. *et al.* (2022) «New opportunities and challenges of natural products research: When target identification meets single-cell multiomics», *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 12(11), pp. 4011-4039. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2022.08.022>.