



UNIVERSIDAD MAYOR

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTI-AGREGACIÓN DE EXTRACTOS DE
HOJA DE MURTILLA EN MODELOS *IN VITRO* DE PROTEINOPATÍAS**

Miguel González Cifuentes

Director de Seminario de Título: Dr. Claudio Hetz

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Rene Vidal

Co-Director de Seminario de Título: Dr. Patricio Manque

Octubre, 2015

Santiago – Chile

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS.....	7
1. Resumen.....	9
2. Abstract	10
3. Introducción	11
3.1 Enfermedades Neurodegenerativas	11
3.2 Agregados proteicos	12
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos	22
5.1. Objetivo general.....	22
6. Materiales y Métodos	23
6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
6.1.1 PCR convencional.....	23
6.1.2 PCR Clon Amp Hifi	23
6.3 Recombinación Homóloga	24
6.4 Transformación de bacterias quimiocompetentes	25
6.5 Extracción de ADN plasmidial	25
6.6 Ensayo de Digestión	26
6.7 Cultivo Celular	26
6.8 Métodos de Transfección.....	26

6.8.1 Método fosfato de calcio	26
6.8.2 Método Effectene	27
6.9 Sistemas de generación de líneas estables	27
6.9.1 Sistema Flp-FRT/TO (Invitrogen)	27
6.9.2 Sistema de expresión inducible TetOne (Clonetech)	29
6.9.2.1 Generación de lentivirus	30
6.9.2.2 Generación de líneas estables e inducibles de tipo neuronal.....	30
6.10 Análisis por SDS-PAGE y Western blot	34
6.11 Detección de fluorescencia	35
6.11.1 Microscopía de epifluorescencia	35
6.11.2 Citometría de flujo (FACS)	36
6.12 Microscopía automatizada.....	37
6.12.1 Validación de agregados proteicos en líneas celulares mediante la aplicación “General Spot Measurement Tool” del software HCS Studio.	37
6.12.2 Análisis de toxicidad celular en células silvestres de tipo neuronal mediada por compuestos	38
6.12.3 Determinación de agregados proteicos y muerte celular.....	38
7. Resultados.....	41
7.1. Generación líneas celulares para medir agregación proteica en modelos de EA, EP y ELA (Biosensores) utilizando Cellomics.....	41

7.1.1 Caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de EH en células HEK FLP FRT/TO.	41
7.1.2 Generación y caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de ELA en células HEK293 FLP FRT/TO.	42
7.1.3 Generación de modelos <i>in vitro</i> de la EH y ELA en líneas celulares tipo neuronal con el sistema FRT/TO.	44
7.1.4 Generación de modelos <i>in vitro</i> inducibles de la EP, ELA y EH utilizando un sistema lentiviral.	46
7.2 Determinar parámetros microscópicos de los biosensores.....	54
7.2.1 Caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de tipo neuronal de ELA.....	54
7.2.2 Caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de la EP en células N2A.....	55
7.2.3 Caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de Poliglutaminas en células HEK.	57
7.3.3 Análisis del impacto en la viabilidad celular y agregación proteica de extractos de hoja de murtilla en un modelo <i>in vitro</i> de poliglutaminas.....	65
8. Discusión	68
9. Proyecciones	77
10. Conclusiones	78
11. Referencias.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Esquema 1	Diagrama sistema FLP-FRT/TO.	31
Esquema 2	Mapa de vector pLVX.	32
Esquema 3	Diagrama sistema Tet-One.	33
Esquema 4	Esquema para la adquisición de imágenes por Cellomics.	40
Figura 1	Caracterización de modelo <i>in vitro</i> de EH en células HEK FLP-FRT/TO.	43
Figura 2	Caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de ELA en células HEK FLP-FRT/TO.	45
Figura 3	Caracterización de un modelo <i>in vitro</i> de EH y ELA en células tipo neuronal.	47
Figura 4	Subclonamiento de los genes de las proteínas mutantes en el vector pLVX.	50
Figura 5	Validación de expresión de constructos pLVX SOD1G85R::EGFP, pLVX α SYN WT::EGFP y pLVX EGFP.	51
Figura 6	Validación de expresión de constructos pLVX polyQ79::EGFP y pLVX polyQ11::EGFP.	53
Figura 7	Caracterización de un modelo de la ELA <i>in vitro</i> estable e inducible en células NSC34.	56

Figura 8	Caracterización de un modelo de la EP <i>in vitro</i> estable e inducible en células N2A.	58
Figura 9	Caracterización de un modelo de la EH <i>in vitro</i> estable e inducible en células HEK.	60
Figura 10	Validación de métodos de microscopía automatizada en modelo de la EH en células HEK FLP FRT/TO.	63
Figura 11	Análisis de toxicidad celular mediada por extractos naturales de hoja de murtila en células NSC34 WT.	66
Figura 12	Análisis de la toxicidad celular mediada por extractos naturales de hoja de murtila en células N2A.	67
Figura 13	Análisis del efecto de compuestos naturales de hoja de murtila en la agregación proteica y muerte celular en modelos <i>in vitro</i> de la EH.	69

ABREVIATURAS

- α -SYN - Alfa sinucleína
- A β - Péptido beta Amiloide
- ADN - Ácido desoxirribonucleico
- APP - Proteína precursora amiloide
- BAIC – Baicaleína
- pCMV – Promotor citomegalovirus
- DMEM - Dulbecco modified Eagle's médium
- dNTP - Deoxinucleótido Trifosfato
- DTT – Ditioneitol
- EA - Enfermedad de Alzheimer
- ECL - Enhanced Chemiluminescence
- EDTA - Ácido Etilendiaminotetraacético
- EGCG - Epigallocatequina-3-galato
- EGFP - Green fluorescent protein
- EH - Enfermedad de Huntington
- ELA - Esclerosis lateral amiotrófica
- EP - Enfermedad de Parkinson
- HEK 293t - Human Embryonic Kidney 293
- kDa – KiloDalton
- HMW: High molecular weight
- HSP90 - Heat Shock Protein 90
- Htt - Huntingtina
- mHtt - Huntingtina mutante
- N2A - Neuro-2A
- NSC34 - Neuroblastoma-Spinal Cord 34

- pb - Pares de bases
- PBS - Tampón fosfato salino
- PCR - Reacción en cadena de la polimerasa
- polyQ - Poli Glutamina
- PVDF - Fluoruro de polivinilideno
- r.p.m - Revoluciones por minuto.
- RA - Acido rosmarínico
- SBF - Suero Bovino Fetal
- SDS - Sodium Dodecyl Sulphate
- SDS-PAGE -Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- SOD1: Supero Oxido Dimutasa 1
- TEMED: Tetramethylethylenediamine
- WB: Western Blot
- WT: Wild Type

1. Resumen

La característica principal de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras, es la formación de agregados proteicos intra o extracelulares. Estas patologías no tienen cura, por lo tanto la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para dar solución a estas enfermedades es de amplio interés. En este ámbito la utilización de moléculas provenientes de extractos naturales de flora nativa con propiedad bioactivas propone una nueva área de desarrollo biotecnológico. Por otra parte, la tecnología Cellomics se posiciona como una herramienta de gran versatilidad la cual permite realizar de forma automatizada y a gran escala ensayos celulares *in vitro*.

En este trabajo se estudiaron las propiedades anti-agregación de extractos de hoja de *Ugni Molinae* (Murtilla), las cuales poseen propiedades anti-inflamatorias, así como también propiedades contra la agregación del péptido A β en ensayos *in vitro*.

En la presente tesis se logró desarrollar un ensayo automatizado para medir agregación de Huntingtina, con el cual se identificaron extractos de hoja de Murtilla provenientes de ciertos genotipos presentan la propiedad de disminuir agregados proteicos asociados a la enfermedad de Huntington. Además en este proyecto de título se han establecido una variedad de modelos *in vitro* de proteinopatías los cuales se plantean como una potente herramienta en la búsqueda de mecanismos moleculares que subyacen eventos patológicos en enfermedades neurodegenerativas.

2. Abstract

The main feature of most neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, Alzheimer's and amyotrophic lateral sclerosis, among other is the accumulation of intra or extracellular protein aggregates. These diseases have no cure, so the search for new therapeutic strategies to these diseases is of broad interest. In this context the use of molecules from natural extracts of native flora with bioactive property proposes a new area of biotechnology

Moreover, the Cellomics technology is positioned as a versatile tool which enables automated and large-scale *in vitro* testing, In this work the anti-aggregation properties of leaf extracts Ugni Molinae (Murtilla), which have anti-inflammatory properties, as well as preliminary studies have linked properties against A β peptide aggregation *in vitro* assays were studied.

In this thesis it was possible to develop an automated assay for measuring huntingtin aggregation, it was possible to identify genotypes of Murtilla with the property to decrease protein aggregates associated with Huntington's disease. Also in this project we have established a variety of *in vitro* models of proteinopathies which arise as a powerful tool in the search for molecular mechanisms underlying pathological events on neurodegenerative diseases.

3. Introducción

3.1 Enfermedades Neurodegenerativas

Los trastornos neurodegenerativos tienen una prevalencia superior al 12% de la población mundial, siendo la enfermedad de Alzheimer (EA) la de mayor incidencia ya que afecta al 10% de la población mayor de 65 años y más del 50% de la población mayor de 85 años (Brayne 2007). La prevalencia de las demencias es de 5% a 8% de los individuos entre 65-70 años. Esta se duplica a partir de los 65 años siendo de 15% a 20% en los mayores de 75 años y de 25% a 50% en los mayores de 85 años. La EA y otras demencias afectan en la actualidad entre 24 y 37 millones de personas, cifra que podría llegar a 115 millones de aquí a 2050. En Chile, actualmente 1,06% de la población (180.000 personas) padecen EA u otra demencia, situación que aumentara en el año 2050 a cerca de un 3.10% de la población (626.000 personas). En Chile no existen datos epidemiológicos acerca de la incidencia de éstas enfermedades, sin embargo se estima que cerca de 100.000 personas padecen de la EA y unas 25.000 a 35.000 personas están afectadas por la enfermedad de Parkinson (EP) (Fuente: Minsal).

Las enfermedades neurodegenerativas no tienen cura y es necesario conocer los mecanismos moleculares que subyacen a los eventos patológicos descritos en estas enfermedades así como desarrollar nuevas estrategias terapéuticas implicadas en dar solución a este problema (Arosio et al. 2014).

3.2 Agregados proteicos

Uno de los eventos patológicos transversal observado en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas como la EA, EP, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras es la acumulación de proteínas mal plegadas en los distintos grupos neuronales afectados en estas patologías (Matus et al. 2011). Estos agregados proteicos son los responsables de la alteración crónica de la homeostasis proteica que lleva a la degeneración y muerte neuronal (Skovronsky et al. 2006). Este evento, a su vez, es el responsable de los signos que caracterizan a este tipo de enfermedades, tales como el deterioro en la capacidad motora y cognitiva de los pacientes. La alteración de la homeostasis proteica causada por estos cúmulos proteicos anormales ha sido relacionada directamente con la aparición de defectos en la actividad sináptica, además de alteraciones en el transporte axonal, estrés oxidativo, alteración de síntesis proteica, cambios transcripcionales, entre otros (Vidal et al. 2011, Hetz et al. 2014). Existe una extensa literatura donde se ha descrito que la modulación de los procesos celulares involucrados en revertir o evitar la formación de estos agregados proteicos puede disminuir la aparición de los signos asociados a enfermedades neurodegenerativas (Trippier et al. 2013, Ciechanover et al. 2015).

La presencia de inclusiones proteicas en el sistema nervioso central es una característica que se manifiesta en gran parte de las enfermedades neurodegenerativas (Soto, 2003). Esta condición se genera debido a cambios conformacionales que sufren ciertas proteínas y que resultan en la exposición de

las regiones hidrofóbicas, las cuales promueven la oligomerización y la formación de agregados (Chiti & Dobson, 2006; Kaye et al., 2003).

En el caso de la ELA se ha descrito la presencia de inclusiones insolubles de SOD1, TDP-43, FUS y C9orf72, las cuales en determinadas circunstancias son tóxicas para la célula. Inclusiones proteicas de SOD1 han sido identificadas en modelo murino y en pacientes con ELA (Forsberg et al., 2010; Shibata et al., 1996). A pesar de que los mecanismos que subyacen a la patogénesis de SOD1 mutante aún no son totalmente comprendidos, se ha relacionado con múltiples procesos que generan toxicidad celular, dentro de los cuales se encuentra; estrés de retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial, desregulación en el transporte axonal y acumulación de proteínas. Probablemente la convergencia de dos o más de estos mecanismos sea capaz de generar la pérdida o disfunción de las neuronas (Andersen and Al-Chalabi, 2011; Pasinelli and Brown, 2006).

Otra causa de la generación de estos agregados proteicos es por mutaciones genéticas, las cuales se traducen en proteínas anormales (Bertram et al. 2005). Por ejemplo, en el caso de la EH es causada por la repetición de las secuencias CAG en el gen HTT, resultando en la expresión de una región repetida de glutaminas en la proteína huntingtina (Htt) (Reiner et al. 2011). La secuencia de poliglutaminas (PolyQ) en dicha proteína y su extensión es la causante de que la versión mutante de huntingtina (mHtt) sea propensa a formar agregados (Bates 2003, Ignatova et al. 2006). Estas inclusiones proteicas son las responsables de la muerte de neuronas ubicadas en el cuerpo estriado y que finalmente se refleja en el déficit motor observado en los pacientes (Evert et al. 2000).

En los casos genéticos de la EA, la mutación de los genes PSEN 1 y PSEN2, que codifican para las proteínas involucradas en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP), genera el aumento de la agregación del péptido beta Amiloide (A β). Este evento, además de la acumulación extracelular de agregados de la proteína Tau está implicado en la muerte de las neuronas hipocampales generando los signos asociados a pérdida de memoria (Sherrington et al. 1995, Citron et al. 1997, Rogaeva 2002).

Estos antecedentes, sugieren que la formación de agregados proteicos es un evento común en las distintas enfermedades neurodegenerativas y por lo tanto, la búsqueda de estrategias terapéuticas que eviten o disminuyan la formación de estos agregados proteicos neurotóxicos es un importante tópico de interés. Actualmente, existe una búsqueda constante de herramientas moleculares para aliviar la neurodegeneración, tales como la terapia génica, la inmunoterapia, y las terapias celulares, entre otras. Sin embargo, hasta la fecha no existen medicamentos efectivos que mejoren exitosamente los síntomas de los pacientes que padecen este tipo de patologías. Una de las áreas más promisorias en la búsqueda de una posible terapia es la farmacología, en donde diferentes tipos de moléculas han sido postuladas como posibles agentes que reduzcan la muerte neuronal.

3.3 Compuestos Naturales con propiedad Anti agregación

La aplicación de moléculas pequeñas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas es de gran interés en la industria farmacéutica, ya que consiste

en una estrategia poco invasiva, de fácil administración y producción a gran escala. Una serie de antecedentes bibliográficos han demostrado que antioxidantes específicos de origen vegetal tienen una capacidad para disminuir los efectos adversos observados en enfermedades neurodegenerativas como la EA o la EP (Wollen 2010, Rojas et al. 2012). Entre los compuestos más destacados se encuentra el polifenol epigallocatequina-3-galato (EGCG) proveniente de la planta de té *Camilla sinensis*. Este compuesto tiene la capacidad de actuar directamente a un gran número de proteínas que están implicadas en el plegamiento de proteínas y así, disminuir el proceso de agregación proteica (Bieschke 2013). Además, se han descrito una serie de compuestos de origen natural que han presentado efectos positivos sobre la pérdida de memoria asociados con la EA. Entre ellos, destacan compuestos naturales tales como la galantamida, el Ginkgo Biloba y el Ginseng, los cuales han demostrado mejorar las capacidades cognitivas en modelos animales de la EA (Bores et al. 1996, Zhao et al. 2009). En el caso de la EP, también se han utilizado compuestos de origen natural como flavonoides que han demostrado tener actividad neuroprotectora en modelos celulares de agregación proteica (Caruana et al. 2011, Kang et al. 2013).

Aun cuando existen variados antecedentes respecto al efecto neuroprotector de ciertos compuestos identificados desde extractos de plantas, actualmente no se ha logrado confirmar su efecto real en pacientes, ya sea, por la limitada capacidad de realizar pruebas en pacientes o por lo poco efectivos que han demostrado ser muchos de los compuestos probados en ensayos clínicos. Aun así, la búsqueda de compuestos biológicamente activos en este tipo de

enfermedades sigue siendo intenso e impulsado por las empresas farmacéuticas. A continuación se describen algunos ejemplos exitosos de compuestos que se aplican o pueden aplicarse en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Un ejemplo de estos compuestos, es la rapamicina en Isla de Pascua, que ha mostrado una eficacia muy alta en inducir la eliminación de proteínas anormales en muchos trastornos neurodegenerativos (Bove et al. 2011). Este medicamento se utiliza en la clínica como inmunosupresor y como droga anti-tumoral en todo el mundo, sin embargo, su posible aplicación para enfermedades cerebrales ha sido cuestionado, debido a sus efectos secundarios adversos (Rubinsztein et al. 2011). Otro ejemplo, lo constituye la trehalosa, una molécula pequeña implicada en el proceso de autofagia donde las proteínas anormales son recicladas y/o eliminadas (Zhang et al. 2014). Este compuesto es capaz de revertir la formación de agregados proteicos y ha demostrado tener un potente efecto neuroprotector en modelos preclínicos de enfermedades neurodegenerativas como Huntington (Tanaka et al. 2004) y ELA (Castillo et al. 2013).

Existen además compuestos orgánicos presentes en extractos de té verde, que reduce la producción y agregación de la proteína A β en modelos murinos y celulares de la EA. Estos modelos corresponden a cultivos de células neuronales que expresan la proteína APP involucrada en la EA, donde se observó una disminución de la formación de agregados de A β (Morris et al. 2002). El compuesto EGCG, es el flavonoide más importante extraído de hojas de té verde, el cual es capaz de reducir la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de la proteína A β . Además de disminuir el contenido de este péptido

neurotóxico disminuyendo la muerte neuronal en modelos experimentales de la EA (Vassallo 2008). Adicionalmente, existen otros ejemplo con compuestos derivados de Orceína, un colorante fenoxazina aislado del liquen *Roccella tinctoria*, que genera una disminución de los agregados de A β (Bieschke et al. 2012).

En los últimos años ha sido de gran interés el desarrollo de inhibidores de la agregación de la proteína α -sinucleína para la prevención y el tratamiento de la EP (Amer et al. 2006). De hecho, un grupo importante de estos compuestos ha demostrado un efecto protector contra la agregación de α -sin, este conjunto corresponde a los polifenoles. Estos compuestos naturales son muy beneficiosos para nuestra salud, los cuales están presentes en la dieta y en diversas plantas medicinales (Vassallo 2008), frutas, verduras y bebidas, como el té, el vino tinto, manzanas, bayas y berries (Scalbert et al. 2005). Los compuestos polifenólicos identificados con actividad neuroprotectora frente a la EP incluyen baicaleína (BAIC) (Zhu et al. 2004), el compuesto EGCG (Ehrnhoefer et al. 2008, Bieschke et al. 2010), ácido rosmarínico (RA) (Rao et al. 2008), ácido tánico (TA), ácido nordihidroguaiarético (NDGA), Curcumin, miricetina (Myr), kaempferol, catequina y epicatequina (Ono et al. 2006). Estudios adicionales mostraron que varios polifenoles inhiben la formación de fibras de la proteína α -sin y son capaces de formar estados solubles de esta proteína las cuales resultan no ser neurotóxicas (Masuda et al. 2006, Meng et al. 2009)

A pesar que en nuestro país existe un escaso desarrollo de la búsqueda de compuestos naturales únicos, hay importantes grupos de investigadores dedicados

a aislar y caracterizar las propiedades fisicoquímicas de compuestos naturales. Nuestro país cuenta con una vasta fuente de recursos naturales poco explorados a nivel biotecnológico. En particular, posee una flora muy diversa y única a nivel mundial, debido al aislamiento geográfico de Chile, que podría tener un potencial biotecnológico y un valor agregado muy interesante.

3.4 Propiedades bioactivas de *Ugni molinae*

Una de las especies que ha causado mayor interés tanto nivel internacional como nacional son los berries. Dentro de estos, la murtila o *Ugni molinae* Turcz que es una especie nativa de Chile, conocida comúnmente como murta o uñi. Crece a lo largo del sur de Chile, es un arbusto de aproximadamente 1,5 - 2 metros de altura. Sus frutos se utilizan para hacer diferentes preparaciones caceras como mermelada, jugos, repostería y licores (Ah-Hen 2011). Se ha demostrado que estos frutos poseen una rica y diversa composición de compuestos bioactivos con propiedades medicinales, los cuales han sido intensamente estudiados (Schreckinger et al. 2010).

Con el fin de caracterizar las moléculas que contiene estas plantas se realizan extracciones químicas a partir de las diferentes secciones de la planta las cuales difieren en los tipos y cantidades de las moléculas que la componen. Existe una serie de extractos (hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) de las hojas de la especie *Ugni molinae*. Estos extractos presentan diferentes compuestos provenientes de las hojas de murtila, por ejemplo en el caso de la fase derivada de acetato de etilo esta enriquecida con polifenoles y triterpenoides,

en el caso de la fase etanólica esta preferentemente compuesta de triterpenoides pentacíclicos y polifenoles con polaridades más bajas que la anterior. Estos extractos han sido validados por demostrar una elevada actividad anti-inflamatoria identificados en un modelo *in vivo* de inflamación tópica en ratones (Aguirre et al. 2006). Además, se han descrito propiedades analgésicas de extractos seriados de diclorometano, acetato de etilo y metanol de hojas de murtila en modelos *in vivo* de ratón utilizando diferentes ensayos de inducción químicos y térmicos de dolor agudo, los cuales finalmente validaron el uso popular de hojas de murtila como analgésico a diversas dolencias (Delporte et al. 2007).

En el marco de las propiedades de anti-agregación, estudios preliminares del laboratorio de la Dra. Carla Delporte de la Universidad de Chile colaboradora en este proyecto, indicaron una disminución de agregados del péptido A β asociados a la EA por la acción extractos de hoja de murtila en modelos *in vitro*. Estos datos junto con lo descrito previamente, nos hace postular a estos extractos como un atractivo candidato para evaluar su actividad biológica sobre los agregados proteicos asociados a enfermedades neurodegenerativas.

3.4 Microscopía automatizada a gran escala

En los últimos años, técnicas avanzadas de microscopía tales como la espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), análisis de distribución de intensidad de fluorescencia (FIDA) y el escaneo de objetivos intensamente fluorescentes (SIFT), han sido utilizados como herramientas poderosas para el análisis del proceso de agregación proteica anormal en modelos celulares de

diversas enfermedades neurodegenerativas (Giese et al. 2005, Kostka et al. 2008). Sin embargo, el uso de estas técnicas de microscopía es poco viables en la búsqueda de nuevas drogas a gran escala, debido a que no es posible realizar estudios con cientos a miles de drogas al mismo tiempo.

Hoy en día el uso de plataformas automatizadas en la captura y análisis de imágenes de fluorescencia de miles de células están siendo aplicadas en la búsqueda de biomoléculas activas (Ramm et al. 2003, Almholt et al. 2004, Lundholt et al. 2005). La tecnología Cellomics ha sido una de las más utilizadas en el análisis a gran escala y de forma automatizada para la búsqueda de nuevas drogas. Esta tecnología presenta diversas ventajas, entre ellas, permite utilizar concentraciones nanomolares de los compuestos a estudiar y presenta una gran sensibilidad en la detección de fluorescencia de las muestras analizadas. En la actualidad las empresas farmacéuticas y biotecnológicas más importantes del mundo realizan pesquisas a gran escala de compuestos químicos sintéticos y naturales en bioensayos simples que reflejen algún aspecto central de la enfermedad de interés. De hecho la mayoría de los fármacos identificados en la última década para el tratamiento de patologías se han encontrado mediante el uso de sistemas automatizados.

En esta tesis se utilizará la tecnología Cellomics, con el objetivo de identificar compuestos derivados de hoja de murtila con posibles propiedades bioactivas utilizando microscopia automatizada. Una de las tecnologías centrales en este trabajo fue desarrollar modelos *in vitro* de enfermedades neurodegenerativas como por ejemplo de la EA, EH y EP. Estas son herramientas

indispensables en el área de la búsqueda de nuevas drogas. La convergencia de todo este desarrollo de nuevas tecnologías, permitirá en un futuro utilizar compuestos derivados de flora nativa chilena como posible terapia en contra de enfermedades neurodegenerativas.

SOLO USO ACADÉMICO

4. Hipótesis

Extractos de hojas de murtila poseen propiedad anti-agregación en modelos *in vitro* de proteinopatías analizados por tecnología Cellomics

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Identificar la actividad anti-agregación de extractos derivados de hojas de murtila en modelos *in vitro* de proteinopatías utilizando tecnología Cellomics

5.2. Objetivos específicos

- Generar 3 líneas celulares para medir agregación proteica en modelos de EH, EP y ELA (Biosensores) utilizando tecnología Cellomics.
- Determinar los parámetros microscópicos de la agregación proteica de los biosensores en modelos de EH, EP y ELA en forma automatizada.
- Analizar a gran escala y en forma automatizada el efecto de extractos derivados de hojas de diferentes genotipos de murtila sobre la agregación proteica en modelos de EH, EP y ELA.

6. Materiales y Métodos

6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.1.1 PCR convencional

La reacción de PCR convencional se realizó utilizando 100 ng de ADN de interés (**Tabla 1**) que se incubó con 12,5 µL de Go Taq Master Mix (Promega) y 25 µM de cada partidor (**Tabla 1**) para un volumen final de 25 µL. El programa de PCR utilizado contaba con 1 ciclo de denaturación por 5 minutos a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 58 °C y 30 segundos a 72 °C, y un ciclo final de elongación de 10 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron a través de electroforesis en geles de agarosa (Lonza) a 1% TAE con GelRed (Biotium) una concentración de 1X a 100 V.

Tabla 1. Partidores utilizados para el subclonamiento de los genes de interés.

Vector donador	Nombre	Secuencia Adaptadora	Secuencia gen de interés
pEGFP N1 SOD1-G85R	SOD1_EcoRI SN	CCCTCGTAAAGAATTC	ATGGCGACGAAGGC
pEGFP N1 α -Synucleína WT	asyn_EcoRI SN	CCCTCGTAAAGAATTC	ATGGATGTATTCATGAAAGGACT
pEGFP N1 SOD1-G85R	EGFP_EcoRI SN	CCCTCGTAAAGAATTC	ATGGTGAGCAAGGGC
pEGFP N1 SOD1-G85R	EGFP_BamHI AS	GAGGTGGTCTGGATCC	TFACTTGTACAGCTCG

6.1.2 PCR Clone Amp Hifi

Se utilizó la polimerasa Clone Amp (Clontech) para obtener productos de PCR sin errores en su secuencia nucleotídica. Para esta reacción se utilizaron 90 ng de ADN de interés (**Tabla 1**) y se incubó con 12,5 µl de Clone Amp Hifi Premix (Clontech) y 7,5 pmol de cada partidor (**Tabla 1**) hasta un volumen final de 25 µl. Se realizaron 30 ciclos de amplificación con periodos de denaturación,

hibridación y elongación de 10 segundos a 94 °C, 15 segundos a 55 °C y 15 segundos a 72 °C, respectivamente. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa 1% TAE con GelRed 1X a 100 V.

6.1.3 PCR de Colonia

Se realizó una búsqueda de colonias positivas utilizando la técnica de PCR, para esto se extrajo media colonia y se resuspendió en 5 µl de agua libre de nucleasas utilizándose como templado para realizar la reacción de PCR convencional. Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa 1% TAE con GelRed 1X a 100 V.

6.2 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

Se realizó una purificación de los productos de PCR desde los geles de Agarosa. Las bandas fueron visualizadas con luz UV al 70% y el ADN fue extraído del gel usando el kit “NucleoSpin Gel and PCR Clean-up” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos purificados fueron cuantificados utilizando espectrofotómetro Epoch (Biotek).

6.3 Recombinación Homóloga

Para esta reacción se utilizó el kit “In Fusion HD Cloning” (Clontech). Se incubó 200 ng del plásmido pLVX Tet-On (Clontech) linearizado con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, más 200 ng del producto de PCR purificado con 2 µl de 5X In-Fusion HD Enzyme Premix (Clontech) hasta 10 µl totales por reacción. Se

incubo a 50 °C por 15 minutos. Este kit se basa en la recombinación de secuencias flanqueantes acopladas al gen de interés, las cuales recombinan de forma específica en las secuencias adaptadoras del plasmidio lentiviral pLVX en el sitio de múltiple clonamiento.

6.4 Transformación de bacterias quimiocompetentes

Se usaron las Bacterias Stellar quimiocompetentes (Clontech) que fueron descongeladas en hielo y se mezclaron manualmente con 2,5 µl del producto de la recombinación homóloga. Las bacterias se incubaron durante 30 minutos en hielo, luego se realizó un shock térmico por 45 segundos a 42 °C. Se incubaron nuevamente en hielo por 1 minuto. Se agregaron 800 µl de medio SOC a 37 °C y se incubó durante una hora, con agitación constante a 200 rpm a 37 °C. Las bacterias fueron centrifugadas a 2.000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante en exceso, dejando 100 µl para resuspender el precipitado. Las bacterias resuspendidas se sembraron en placas LB suplementadas con el antibiótico Ampicilina (US Biological) 200 µg/ml, estas se dejaron por 16 horas a 37 °C.

6.5 Extracción de ADN plasmidial

Se realizó una extracción de ADN plasmidial utilizando el kit “NucleoSpin Plasmid” (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El funcionamiento de este kit se basa en la unión selectiva del ADN a una membrana de sílice situada en el interior de una columna.

6.6 Ensayo de Digestión

Se realizó un ensayo de digestión a los clones positivos en el ensayo de PCR de Colonia incubando 2 µg de DNA plasmidial con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* (New England BioLabs) por 2 horas a 37 °C, los productos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa 1% TAE con GelRed 1X a 100 V.

6.7 Cultivo Celular

Las células HEK2093t, N2a y NSC34 fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). Suplementadas con 5-10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml. Las células fueron subcultivadas antes de alcanzar confluencia.

6.8 Métodos de Transfección

6.8.1 Método fosfato de calcio.

Se sembró 3×10^5 en placas de 30 mm. Luego de 24 horas el medio de cultivo fue reemplazado por 2 ml de medio DMEM fresco con 10% SFB y luego de 2 horas las células fueron transfectadas. Una masa de 1 µg de ADN fue mezclada con 6,4 µl de CaCl₂ 2 M y se agregó agua destilada hasta completar 52 µl. Un volumen de 52 µl de tampón salino HEPES 2X pH 7,1 (HEPES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM) fue agregado gota a gota a la mezcla

ADN/Ca²⁺, agitando en *vortex* constantemente. La solución fue incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Un volumen de 104 µl de la solución fue agregada gota a gota a la placa de cultivo cubriendo la totalidad de la superficie y agitando constantemente. El medio de cultivo fue reemplazado por medio DMEM fresco suplementado con 10% SFB luego de 24 horas post transfección.

6.8.2 Método Effectene

Se sembraron 3x10⁵ células en pocillos de 30 mm. Luego de 24 horas se mezclaron 0,6 µg de ADN más 3,2 µl de Enhancer y 100 µl de tampón EC. La mezcla se agitó en *vortex* durante 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se agregaron 8 µl de Effectene (Qiagen), se agitó en *vortex* por 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución se mezcló con 500 µl de medio DMEM 10% SFB y se agregó a la placa de cultivo por goteo cubriendo la totalidad de la superficie.

6.9 Sistemas de generación de líneas estables.

6.9.1 Sistema Flp-FRT/TO (Invitrogen)

Para la generación de células estables se utilizaron células HEK Flp 293T-Rex, estas células portan inserto de manera estable el sitio de unión FRT de la recombinasa, el cual se encuentra bajo la selección de zeocina. La integración de este sitio dentro del genoma de las células es aleatorio. Otra de las características de esta línea celular es que tiene inserto de manera estable el plasmidio pCDNA6

TR, el cual contiene el represor controlado por doxiciclina, este se encuentra bajo la selección de blastacidina.

Estas células son transfectadas utilizando el método de fosfato de calcio, se realiza la co-transfección del plasmidio pCDNA5 FRTTO portador del gen de interés y el plasmidio de la recombinasa pOG44 (Craig, 1988; Sauer, 1994), esta reconoce los sitios FRT insertos en el genoma de las células y los recombina utilizando los sitios flanqueantes al gen de interés ubicados en el plasmidios pCDNA5 FRTTO, este plasmidio se encuentra bajo la selección de Higromicina (**Esquema 1**). Para la inducción de las proteínas de interés se utiliza 1 µg de Doxiciclina.

Para la generación de líneas estables en células HEK293 se utilizaron células HEK293t-Flp enviadas cordialmente por el Dr. Harm H. Kampinga que se mantuvieron en medio suplementado con 5 µg/ml de blastacidina (Invitrogen) y 100 µg/ml de zeocina (Invitrogen).

Los plasmidios de expresión pCDNA 5 FRT/TO GFP, mCherry, SOD1 WT::mCherry, SOD1 A4V::mCherry además del plasmidio portador de la recombinasa pOG44 también fueron enviados gentilmente por el Dr. Kampinga.

Para la generación de líneas estables se sembraron 3×10^5 células en cada pocillo de 30 mm, luego de 24 horas se transfectaron transitoriamente utilizando el método de fosfato de calcio, en una relación de 1:9 µg de ADN del plasmidio de interés con el plasmidio pOG44 respectivamente, luego de 4 horas se cambió el medio de cultivo de mantención suplementado con blastacidina y zeocina, 48 horas pos-transfección se cambió nuevamente el medio pero esta vez a medio con

selección DMEM 10% SFB, 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco-BRL) utilizando 5 µg/ml de blastacidina y 100 µg/ml de higromicina (Invitrogen). Finalmente las células resistentes se tripsinizaron utilizando tripsina 1X-EDTA (Gibco-BRL) y sembradas en placas de 100 mm, luego de 2 semanas de selección, se generaron foci de células resistentes, estos fueron amplificados en placas de 60 mm hasta que se obtuvo poblaciones estables de células.

6.9.2 Sistema de expresión inducible TetOne (Clontech)

Este sistema se basa en la alta eficiencia de transducción de lentivirus. Además, el control de expresión de genes de interés es altamente regulado por el sistema Tet-On (Gossen et al. 1992). Para la generación de líneas estables es necesario realizar el subclonamiento de los genes de interés dentro del plasmidio pLVX-TetOne. Este plasmidio posee el promotor TRE3GS, un híbrido entre el promotor CMV mas el promotor P_{TRE3G} . Rio abajo de este se encuentra el transactivador Tet-On 3G, el cual en presencia de doxiciclina se une al promotor e inicia la transcripción del gen de interés (**Esquema 2**). Una de las ventajas de este kit se basa en la utilización de partidores con secuencias adaptadoras homólogas, las cuales aumentan la eficiencia de clonamiento. Los plasmidios generados se co-transfectaron en células empaquetadoras Lenti X 293t junto al mix de empaquetamiento Lenti-X HTX (Clontech), 48 horas post transfección se colectaron los lentivirus generados. La infección se generó en las células de interés, posterior a las 48 horas de infección se realizó una selección utilizando

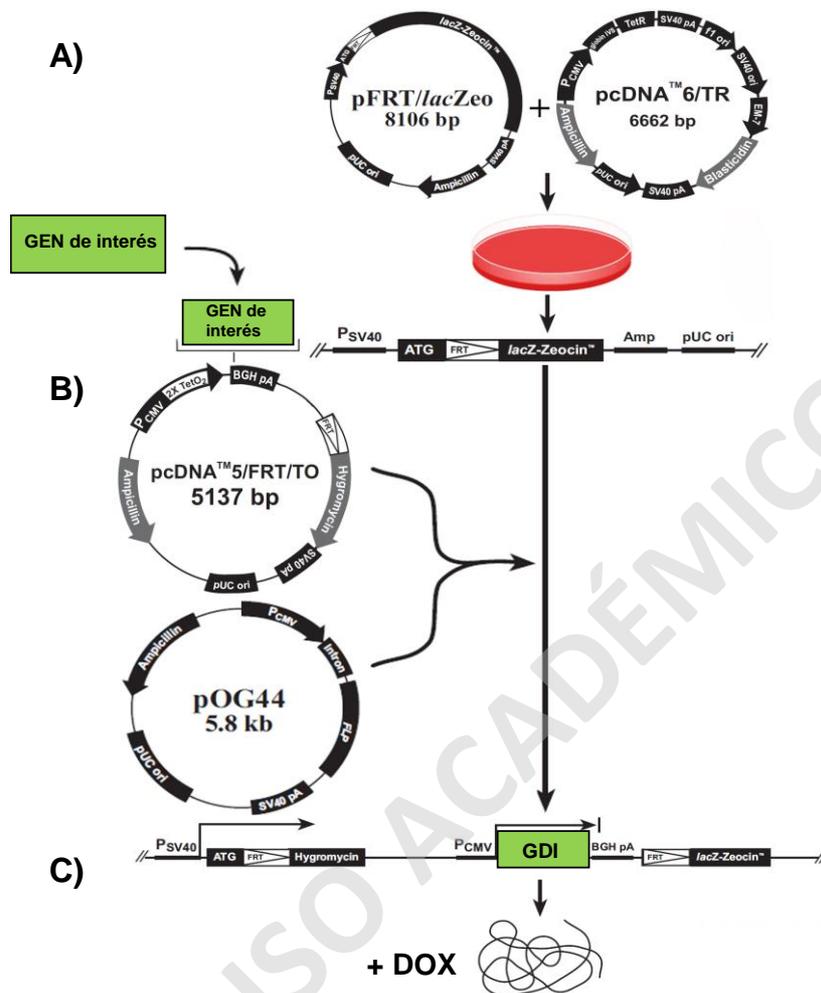
puromicina (**Esquema 3**). Para la inducción de la expresión de las proteínas de interés se utilizaron 100 ng/ml de Doxiciclina.

6.9.2.1 Generación de lentivirus

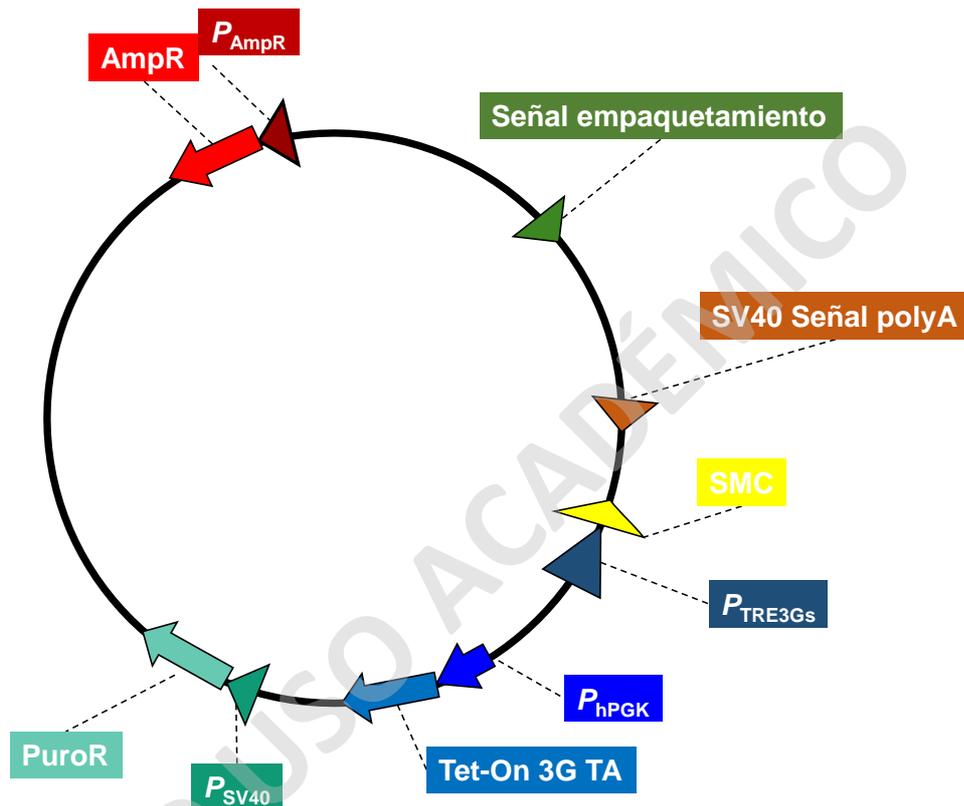
En placas de 100 mm fueron sembradas 4×10^6 células LENTI X 293t (Clontech) en medio DMEM 10% SFB libre de tetraciclina (Clontech), luego de 24 horas se realizó la transfección transitoria utilizando el kit “Xfect polymer” (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante, este kit utiliza un polímero biodegradable el cual genera baja toxicidad celular y una alta eficiencia de transfección. Luego de 48 horas se realizó la cosecha de los lentivirus, recolectando el medio que fue centrifugando a 500 rpm por 10 minutos, posterior a ello se eliminaron restos celulares filtrando el medio por un filtro de $0,45 \mu\text{m}$. La cosecha de lentivirus se guardó a -80°C .

6.9.2.2 Generación de líneas estables e inducibles de tipo neuronal.

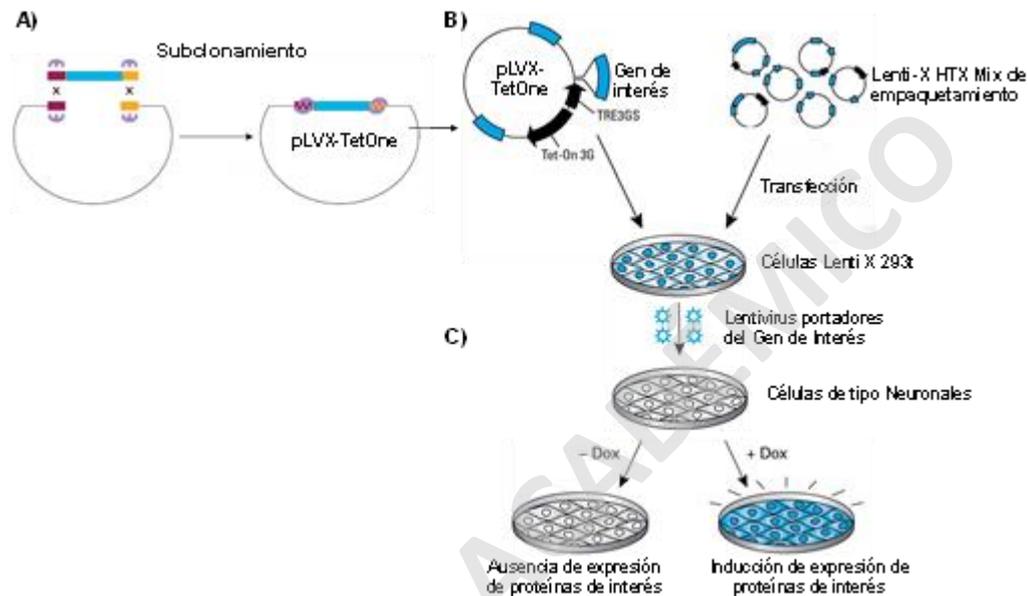
Se sembraron 3×10^5 células N2a (ATCC:CCL-131) o motoneuronas NSC34 en cada pocillo de 30 mm. Luego de 24 horas se trasdujeron las células utilizando un título 1:2 de la preparación de lentivirus. Posteriormente a 48 horas de infección se cambió el medio utilizando puromicina (Sigma) a una concentración de $3 \mu\text{g/ml}$. Finalmente luego de 48 horas, se obtuvo una subpoblación celular resistente a puromicina que contenían el gen de interés inserto en el cromosoma de las células de manera estable.



Esquema 1. Diagrama sistema FLP-FRT/TO: Esquema del protocolo utilizado para la generación de los modelos *in vitro* estables e inducibles en células HEK FLP FRT/TO. (A) Se generaron células HEK 293t-Flp que portan establemente insertando el plasmidio pFRT el cual posee el sitio FRT y el plasmidio pcDNA6 TR represor sensible a doxiciclina. (B) El gen de interés fue insertado en el plasmidio pcDNA5 FRT/TO y luego fue co-transfectado con el plasmidio pOG44 que contiene la recombinasa FLP en células HEK 293t FLP/TR (C) Mediante recombinación homóloga de los sitios FRT el gen de interés es inserto de manera estable e inducible por doxiciclina en células HEK FLP FRT/TO. Imagen obtenida y modificada desde Invitrogen (Cod: K6010-01).



Esquema 2. Mapa de vector pLVX: Diagrama de plasmidio pLVX con sus respectivos genes de control del sistema Tet-One. ■ Gen de resistencia a ampicilina (AmpR), ■ Promotor de AmpR (P_{AmpR}), ■ Señal para empaquetamiento de lentivirus, ■ Señal de termino polyA (SV40 polyA), ■ Sitio de múltiple clonamiento (SMC), ■ Promotor TRE3Gs (P_{TRE3Gs}), ■ Promotor PGK humano, ■ Transactivador Tet-On 3G, ■ Promotor SV40 (P_{SV40}), ■ Gen de resistencia a puromicina.



Esquema 3. Diagrama sistema Tet-One: Esquema del protocolo utilizado para la generación de modelos *in vitro* estables e inducibles en células de tipo neuronal. **(A)** Secuencias de genes de interés fueron subclonadas dentro del plasmidio pLVX utilizando secuencias adaptadoras para la recombinación homóloga, sitios *EcoRI* y *BamHI* fueron insertos en regiones flanqueantes al gen de interés. **(B)** Los plasmidios que contienen el gen de interés fueron co-transfectados junto al mix de empaquetamiento Lenti-X HTX en células empaquetadoras Lenti X 293t, para obtener las partículas. **(C)** Las células de tipo neuronal fueron infectadas con virus portadores del gen de interés, seleccionadas con puromicina (células estables). Finalmente la inducción de la expresión de proteínas se realizó en presencia de doxiciclina. Imagen obtenida y modificada desde Clontech (COD: 631844)

6.10 Análisis por SDS-PAGE y Western blot

Se sembró 3×10^5 células de tipo neuronal en pocillos de 30 mm, se realizó la inducción de expresión de proteínas de interés utilizando doxiciclina (Sigma) a una concentración de 100 ng/ml a diferentes tiempos. Al finalizar los tiempos de inducción las células se despegaron de la placa de cultivo utilizando un *cell scraper*, se colectaron y se centrifugaron a 2.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. El precipitado se resuspendió en tampón RIPA (Tris 20 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, DOC 0,5% y tritón X-100 0,5%), suplementado con inhibidor de proteasas (Roche). Las células se lisaron por sonicación 3 veces durante 5 segundos en hielo y finalmente la concentración de proteínas fue determinada en cada muestra utilizando el kit BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, IL) (Zhang et al. 2014).

Las muestras de proteína se prepararon utilizando 80 µg de proteína total incubadas con DTT 100 mM o sin este por 10 minutos en hielo, mezcladas con buffer de carga 4X (Tris-HCl 0,2 M [pH 6,8], SDS 10%, azul de bromofenol 0,05%, y glicerol 20%) y luego calentadas por 5 min a 95 °C, 30 µg de proteína fueron cargados en geles denaturantes al 8%. El gel de poliacrilamida separador al 8% fue preparado con Tris-HCl 380 mM [pH 8,3], acrilamida-bis-acrilamida 8%, SDS 0,1%, Persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,06%. El gel de poliacrilamida compresor se preparó con Tris-HCl 60 mM [pH 6,8], acrilamida-bis-acrilamida 4%, SDS 0,1%, persulfato de amonio 0,1% y TEMED 0,06%.

La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida (Tris 25 mM, Glicina 250 mM y SDS 0,1%) a un voltaje constante de 100 V. La corrida

electroforética fue detenida cuando el frente azul abandonó el gel. A continuación las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF en buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 250 mM y metanol 20%) a un voltaje constante de 100 V por 2 horas 30 minutos en hielo. Posteriormente la membrana fue incubada en solución de bloqueo (leche 5% en PBS) por 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Finalmente, las membranas fueron incubadas con alguno de los siguientes anticuerpos, diluidos en leche 5% PBS tween 0,02%; anti-SOD1 1:3000 (Calbiochem), anti-HSP90 1:3000 (Santa Cruz), anti- α Synucleina 1:1000 (BD Transduction), anti-GFP 1:1000 (Santa Cruz) por 16 h a 4 ° C en agitación. Al día siguiente las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS Tween 0,1% y posteriormente incubadas 1 hora a temperatura ambiente y en agitación con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-rabbit-HRP, anti-mouse-HRP (Invitrogen) o anti-sheep-HRP (Sigma), diluidos 1:3000 (Leche 5% en PBS Tween 0,02%). Transcurrido este periodo, las membranas fueron lavadas con PBS Tween 0,1%, esta vez 3 veces por 5 minutos. Finalmente, el revelado fue realizado utilizando el kit Western Blotting Substrate (Pierce) y el sistema de detección de imágenes Chemidoc (Biorad).

6.11 Detección de fluorescencia

6.11.1 Microscopía de epifluorescencia

En placas de 24 pocillos se incubaron cubre objetos de 12 mm con polylysine por 2 horas a 37°C, se lavaron con agua destilada 3 veces, posterior a ello se sembró 2×10^4 de células de tipo neuronal estable e inducibles a diferentes

tiempos utilizando doxiciclina a 100 ng/ml. Al finalizar los tiempos de inducción los cubre objetos se fijaron utilizando paraformaldehído a 4% por 10 minutos en hielo, se realizaron 3 lavados por 10 minutos utilizando PBS 1X, luego de esto se realizó la tinción de los núcleos utilizando Hoechst 33342 (Molecular Probes) 1:10.000 por 10 minutos a temperatura ambiente. Los cubre objetos fueron montados utilizando medio de montaje Fluoromont G (Electron Microscopy Sciences) y finalmente las imágenes fueron adquiridas utilizando microscopía de epifluorescencia.

6.11.2 Citometría de flujo (FACS)

Se sembraron 2×10^3 células en cada pocillo de 11 mm y se realizó la inducción de la expresión de las proteínas de interés por 48 horas en medio de cultivo DMEM 10% SFB mas doxiciclina a 100 ng/ml. Una vez concluido este periodo de tiempo las células se tripsinizaron con tripsina-EDTA 1X (Gibco) durante 5 minutos a 37°C y se recolectaron en tubos de FACS (BD Falcon), previa interrupción de la tripsinización con medio de cultivo completo). Los tubos fueron centrifugados a 1.000 rpm por 5 minutos y el pellet se resuspendió en 400 µl de PBS 1X. Los datos se adquirieron y analizaron con ayuda del software BD FACSDiva v 6.1.1 (BD Biosciences). Se analizaron un mínimo de 5.000 eventos por cada punto y por triplicado.

6.12 Microscopía automatizada

6.12.1 Validación de agregados proteicos en líneas celulares mediante la aplicación “General Spot Measurement Tool” del software HCS Studio.

Se sembraron 10×10^3 , 15×10^3 y 20×10^3 células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP por pocillo, en placas de 96 pocillos de borde negro (BD Falcon). Después de 48 horas de ser sembradas se estimularon utilizando doxíciclina a $1 \mu\text{g/ml}$ por otras 24 horas para inducir la expresión de las proteínas fluorescentes. Se realizó la tinción de núcleos utilizando Hoechst 33342 1:1000 durante 15 minutos. Posterior a ello estas muestras fueron analizadas usando el microscopio Cellomics, realizando la adquisición de imágenes siguiendo los pasos consecutivos ejemplificados en el **Esquema 4** en el software “Thermo Scientific HCS Studio Cellomics Navigator” el primer paso se realizó utilizando el canal azul en el cual se pre-procesaron las imágenes corrigiendo el ruido de fondo, luego se ajustó el suavizado y el umbral además de realizar la segmentación de los núcleos. Finalmente se realizó la validación de estos objetos por forma y área. En paralelo en el canal verde utilizando la aplicación “General Spot Measurement Tool” se definió el umbral y la segmentación de los agregados dentro de un área determinada a partir de los núcleos de cada célula, estos objetos se validaron por área e intensidad en el mismo canal verde. Luego de establecer todas las configuraciones anteriormente explicadas se realizó la lectura total de la placa de forma automatizada, entregando finalmente las cuantificaciones de los datos obtenidos por el programa.

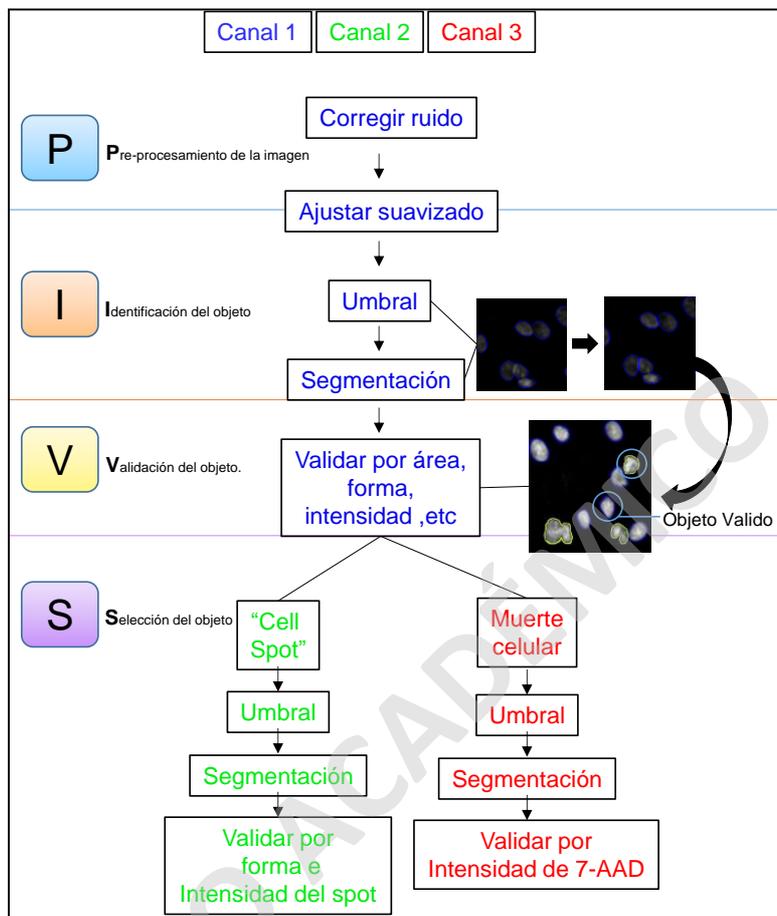
6.12.2 Análisis de toxicidad celular en células silvestres de tipo neuronal mediada por compuestos

En placas de 96 pocillos de borde negro (BD Falcon) se sembraron $7,5 \times 10^3$ células N2a y NSC34, luego de 24 horas fueron incubadas con diferentes extractos naturales de hoja de murtila a diferentes concentraciones finales de 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ por duplicado, esta incubación se realizó por 24 horas. Luego se realizó la tinción de núcleos utilizando Hoechst 33342 1:1000 durante 15 minutos, posterior a ello se adquirieron las imágenes en el microscopio Cellomics siguiendo los pasos consecutivos ejemplificados en el **Esquema 4** del software “Thermo Scientific HCS Studio Cellomics Navigator”. Con el canal 1 azul se realizó el pre-procesamiento de la imagen corrigiendo el ruido de fondo, se ajustó el suavizado y umbral además de realizar la segmentación de los núcleos, finalmente se realizó la validación de estos por forma y área. Luego de establecer todas las configuraciones anteriormente explicadas se realizó la lectura total de la placa de forma automatizada, entregando finalmente las cuantificaciones de los datos obtenidos por el programa.

6.12.3 Determinación de agregados proteicos y muerte celular.

En placas de 96 pocillos de borde negro (BD Falcon) se sembraron $7,5 \times 10^3$ células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP por pocillo. Luego de 24 horas se realizó la inducción utilizando doxiciclina a 1 $\mu\text{g/ml}$ por otras 24 horas, luego de este tiempo se incubó con diferentes extractos de hoja de murtila a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas. Se realizó la tinción de núcleos utilizando Hoechst 33342 1:1000 durante 15 minutos y se incubó con 7-AAD

(Biolegend) a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para determinar muerte celular. Posterior a ello se realizó la adquisición de imágenes siguiendo los pasos consecutivos ejemplificados en el **Esquema 4** en el software “Thermo Scientific HCS Studio Cellomics Navigator” el primer paso se realizó utilizando el canal azul en el cual se pre-procesaron las imágenes corrigiendo el ruido de fondo, luego se ajustó el suavizado y el umbral además de realizar la segmentación de los núcleos, finalmente se realizó la validación de estos por forma y área, en paralelo en el canal verde utilizando la aplicación “General Spot Measurement Tool” se definió el umbral y la segmentación de los agregados dentro de una área determinada a partir de los núcleos de cada célula, que fueron validados por área e intensidad en el mismo canal verde. Finalmente para evaluar muerte celular se establecieron los parámetros en el canal rojo ajustando el umbral, la segmentación y validación de los objetos por intensidad del fluoroforo 7-AAD. Luego de establecer todas las configuraciones anteriormente explicadas se realizó la lectura total de la placa de forma automatizada, entregando finalmente las cuantificaciones de los datos obtenidos por el programa.



Esquema 4. Esquema para la adquisición de imágenes por Cellomics: La obtención de las imágenes fue mediante el software “Thermo Scientific HCS Studio Cellomics Navigator”. Este software utiliza diferentes algoritmos para la identificación de cualquier elemento celular que desee ser cuantificado. El primero paso es el pre-procesamiento de la imagen en donde se corrigen las señales que no serán consideradas en el análisis y dificulten la adquisición de la imagen como el ruido de fondo de luz. El siguiente paso es la identificación correcta del núcleo de las células para así establecer los números de objetos a procesar, para esto se utilizan algoritmos para el ajuste de suavizado, el cual elimina las rugosidades del borde de los núcleos para facilitar su identificación. Otros algoritmos que se utilizan son el umbra y la segmentación los cuales permiten discriminar entre el fondo y el objeto a procesar, dependiendo del canal utilizado. En el siguiente paso se analizan los otros canales y se aplican diferentes algoritmos para definir los objetos a cuantificar, dependiendo de las propiedades de este como por ejemplo agregados proteicos, morfología de organelos, viabilidad celular entre otros.

7. Resultados

7.1. Generación líneas celulares para medir agregación proteica en modelos de EA, EP y ELA (Biosensores) utilizando Cellomics.

7.1.1 Caracterización de un modelo *in vitro* de EH en células HEK FLP FRT/TO.

Con el objetivo de generar un sistema celular de agregación proteica *in vitro* se caracterizó un modelo de la EH utilizando células HEK FLP FRT/TO estables e inducibles de la proteína mHtt-PolyQ74::EGFP (Hageman et al. 2010). Para esto se procedió a estandarizar las concentraciones óptimas de doxiciclina usando 1 µg/ml y 10 µg/ml de doxiciclina para la inducción proteica por 48 horas. Se observó el aumento de expresión de la proteína de fusión mHtt-PolyQ74::EGFP utilizando el anticuerpo específico para la proteína GFP (**Figura 1A**). Este aumento, se observa en ambas concentraciones de doxiciclina, visualizándose además especies de alto peso molecular correspondiente a los agregados proteicos de mHtt-PolyQ74::EGFP medido mediante técnica de western blot (**Figura 1A**). A continuación, para identificar la presencia de inclusiones proteicas se indujo la expresión de mHtt-PolyQ74::EGFP con doxiciclina por 24 y 48 horas. Se observaron inclusiones proteicas de gran tamaño mediante microscopía de fluorescencia. La marca fluorescente de mHtt-PolyQ74::EGFP es homogénea en toda la población celular y mayormente en el citoplasma celular. Cabe destacar, que se observó una expresión basal de GFP en los controles sin doxiciclina en ambos tiempos analizados (**Figura 1B**). Como

control se generaron células HEK FLP FRT/TO EGFP, las cuales no presentan agregados proteicos evaluados por western blot y microscopía de fluorescencia (**Figura 1C, D**). Estos datos sugieren que la expresión de mHtt-PolyQ74::EGFP genera agregados proteicos observados mediante microscopía de fluorescencia, siendo un modelo potencial para evaluar posibles drogas que afecten el proceso de agregación proteica.

7.1.2 Generación y caracterización de un modelo *in vitro* de ELA en células HEK293 FLP FRT/TO.

Para el estudio de otras proteinopatías se generó un modelo *in vitro* de ELA en células humanas utilizando el sistema FLP-FRT/TO (**Esquema 1**), siguiendo el protocolo descrito previamente en la sección **6.9.1**. Se generaron células que expresan de manera inducible la proteína SOD1WT::mCherry y SOD1A4V::mCherry para observar así la presencia de agregados proteicos. Para confirmar la expresión de proteínas específicas se realizó un análisis mediante western blot con muestras de células inducidas por 48 horas utilizando el anticuerpo anti-SOD1. Se confirmó la expresión de la proteína de fusión correspondiente a 40 kDa e inducible dependiente de doxiciclina en ambas líneas celulares. Además, se observaron agregados proteicos de alto peso molecular en la muestras de células SOD1WT::mCherry inducida por 48 horas en presencia o ausencia del agente reductor DTT (**Figura 2**)

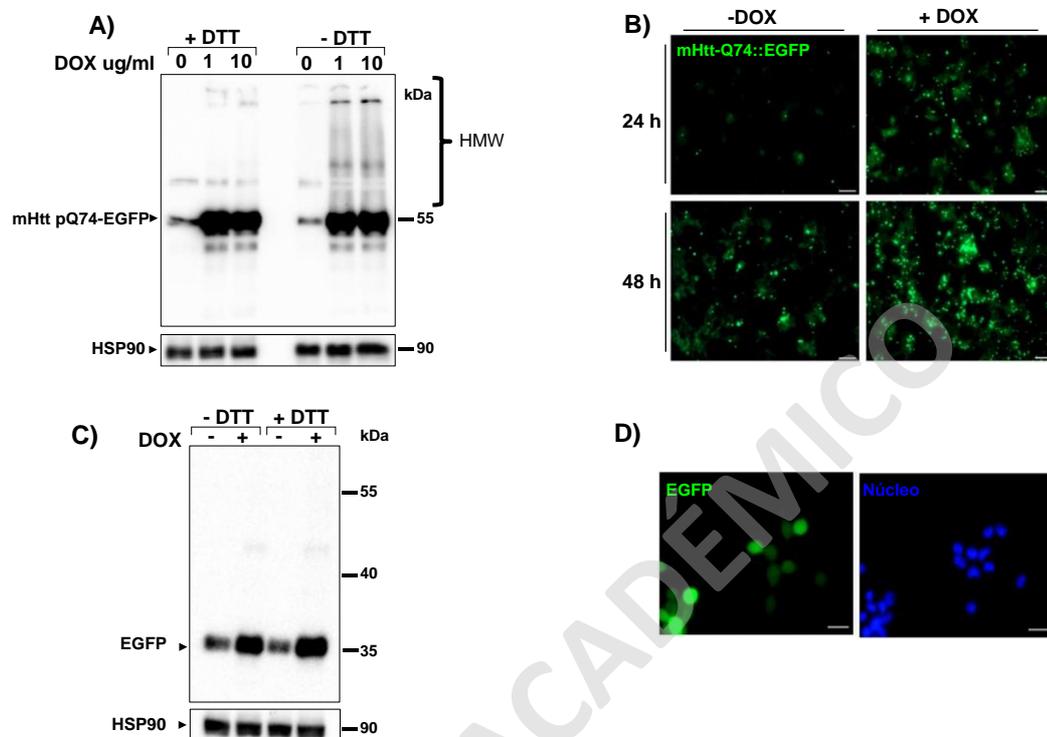


Figura 1. Caracterización de modelo *in vitro* de Huntington en células HEK FLP-FRT/TO: (A) Las células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP se indujeron con doxiciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas, se analizó la expresión proteica utilizando western blot. (B) En esta misma línea celular se analizó la formación de inclusiones proteicas a 24 y 48 horas utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina por microscopía de epifluorescencia. (C) En células HEK FLP FRT/TO EGFP se realizó la inducción proteica por 48 horas utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina estas fueron analizadas por western blot y microscopía de epifluorescencia (D). Se utilizó HSP90 como control de carga. La barra de escala corresponde a 20 μm en B y 50 μm en D.

A continuación, se realizó la inducción con doxiciplina de las proteínas SOD1WT::mCherry, SOD1A4V::mCherry y mCherry por 48 horas y al ser visualizadas por microscopía de epifluorescencia no se observaron inclusiones proteicas, siendo el patrón de fluorescencia subcelular de SOD1 tanto silvestre como la mutante citoplasmático (**Figura 2B**). Estos datos nos sugieren, que el modelo de ELA en células HEK FLP FRT/TO no genera inclusiones proteicas visibles mediante microscopía de epifluorescencia.

7.1.3 Generación de modelos *in vitro* de la EH y ELA en líneas celulares tipo neuronal con el sistema FRT/TO.

Dado a que no fue posible observar la formación de inclusiones proteicas en el modelo celular de ELA en líneas HEK FLP FRT/TO, se planteó la generación de modelos de ELA y EH en líneas celulares de tipo neuronal. Para la generación de modelos de EH se utilizaron células N2a que corresponden a células de neuroblastoma de ratón. Se transfectaron transitoriamente con los plasmidios FRTTO-mHtt-PolyQ74::EGFP y FRTTO-EGFP más el plasmidio represor pCDNA6 TR. Luego de 48 horas se determinó la expresión de estas proteínas mediante el ensayo de western blot y se observó una disminución de la expresión de mHtt-PolyQ74-EGFP y EGFP en presencia del represor, en ausencia como presencia de DTT (**Figura 3A**).

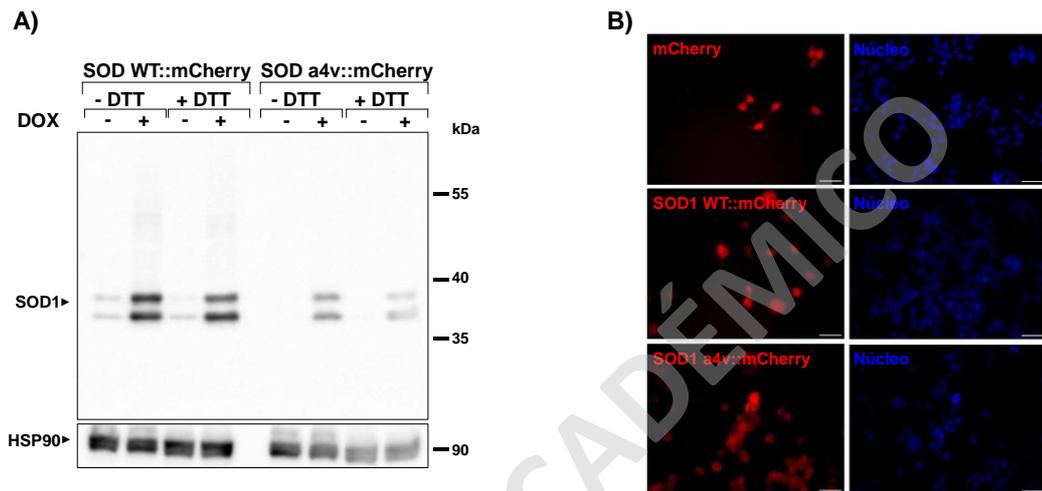


Figura 2. Caracterización de un modelo *in vitro* de ELA en células HEK FLP-FRT/TO: (A) Células HEK FLP FRT/TO SOD1WT::mCherry, HEK FLP FRT/TO SODA4V::mCherry y HEK FLP FRT/TO mCherry fueron inducidas con doxiciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ por 48 horas, se analizó la expresión proteica mediante western blot en dos condiciones con DTT y sin DTT. Se utilizó HSP90 como control de carga. (B) Estas mismas células fueron analizadas por microscopía de epifluorescencia y tinción nuclear con la sonda DAPI luego de 48 horas de inducción. La barra de escala corresponde a 50 μm .

Mediante microscopía de epifluorescencia no fue posible identificar la formación de inclusiones proteicas de Htt en este tipo celular (**Figura 3B**) Esta estrategia experimental también se realizó en células NSC34 transfectadas con los plasmidios FRTTO-SOD1 WT::mCherry, FRTTO-SOD1 A4V::mCherry y FRTTO-mCherry con el represor pCDNA6 TR. En presencia del represor se observó la disminución de expresión del monómero de la proteína de fusión, y de las especies de alto peso molecular de las muestras de SOD1 tanto silvestre como mutante (**Figura 3C**). Estos resultados también fueron evidenciados mediante el análisis de imágenes de epifluorescencia de las células transfectadas transitoriamente, en donde el efecto de regulación de la expresión por parte del represor es evidente en todas las líneas celulares. En estas células con la metodología utilizada no fue posible identificar inclusiones proteicas mediante microscopía fluorescente (**Figura 3D**). Debido a esto, no se realizó selección de clones de estas líneas celulares, para su posterior inducción de expresión utilizando doxiciclina.

7.1.4 Generación de modelos *in vitro* inducibles de la EP, ELA y EH utilizando un sistema lentiviral.

A fin de generar nuevas líneas células de tipo neuronal que expresen de manera inducible proteínas asociadas a enfermedades neurodegenerativas. Con el fin de obtener sistemas celulares con características más fisiológicas, se estableció una nueva estrategia de generación de líneas celulares de tipo neuronales.

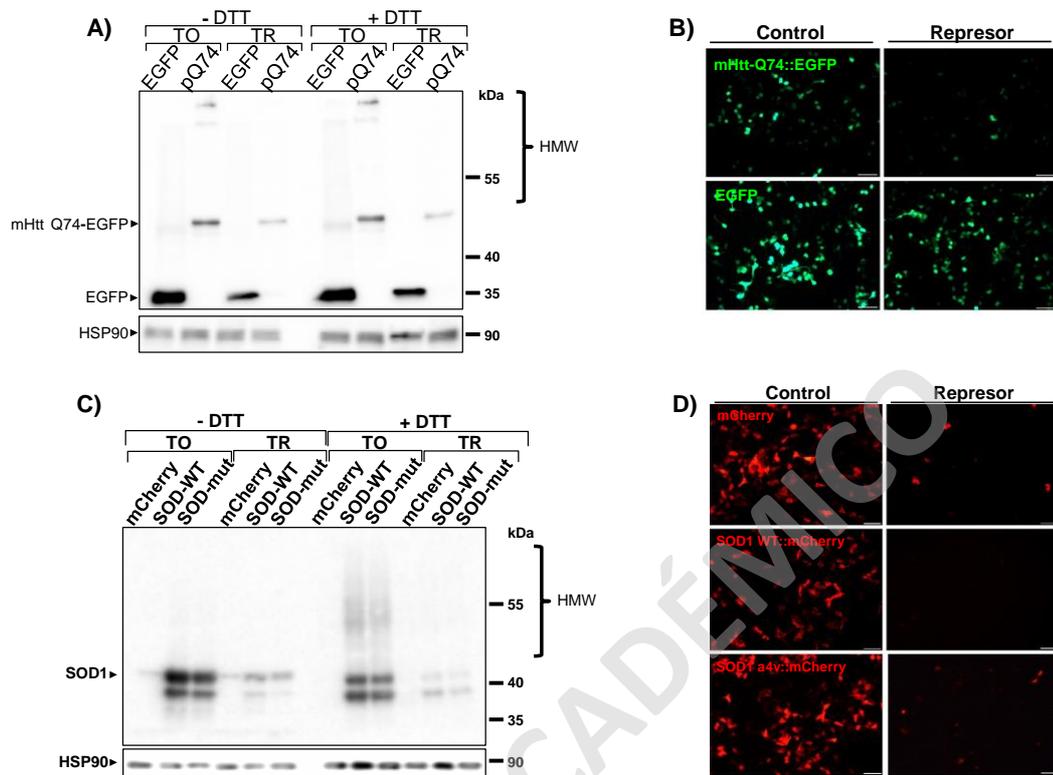


Figura 3. Caracterización de un modelo *in vitro* de EH y ELA en células tipo neuronal: Para la generación del modelo *in vitro* de EH se usaron células N2a que fueron co-transfectadas transitoriamente con los plasmidios pCDNA5 TO mHtt-PolyQ74::EGFP y pCDNA6 TR o pCDNA5 TO (vector vacío). Además se co-transfectó los plasmidios pCDNA5 TO EGFP y pCDNA6 TR o pCDNA5 TO (vector vacío). **(A)** Luego de 48 horas de expresión se analizó la expresión de proteínas por western blot. HSP90 fue usado como control de carga. **(B)** Se analizó la expresión de las proteínas por microscopía de epifluorescencia. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

Para la generación del modelo *in vitro* de ELA se usaron las células NSC34 que fueron co-transfectadas transitoriamente con los plasmidios pCDNA5 TO SOD1WT::mCherry y pCDNA6 TR o pCDNA5 TO (vector vacío). Igualmente se analizó la proteína mutante con los plasmidios pCDNA5 TO SOD1A4V::mCherry y pCDNA6 TR o pCDNA5 TO (vector vacío). Además se co-transfecto los plasmidios pCDNA5 TO mCherry y pCDNA6 TR o pCDNA5 TO (vector vacío). **(C)** Luego de 48 horas de expresión se analizó la expresión de proteínas por western blot HSP90 fue usado como control de carga. **(D)** Se analizó la expresión de las proteínas por microscopía de epifluorescencia. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

Se realizó el subclonamiento en el vector lentiviral pLVX-TetOne (**Esquema 2**) de las secuencias codificantes de las proteínas de fusión SOD1G85R::EGFP, α -SYNUCLEINA-WT::EGFP, polyQ79::EGFP, polyQ11::EGFP y EGFP. La fusión de las proteínas a EGFP facilita el análisis por microscopía automatizada con la tecnología Cellomics. Las secuencias fueron amplificadas por PCR utilizando la polimerasa Clone Amp y los productos obtenidos fueron resueltos en un gel de agarosa. Las bandas correspondientes a SOD1G85R::EGFP (1400 pb), α -SYNUCLEINA-WT::EGFP (1300 pb), polyQ79::EGFP (1100 pb), polyQ11::EGFP (800 pb) y EGFP(700 pb) fueron purificadas a partir del gel de agarosa. Luego los fragmentos fueron recombinados utilizando los sitios homólogos sentido 5' CCCTCGTAAAGAATTC 3' y antisentido 5' GAGGTGGTCTGGATCC 3'. Para corroborar la correcta inserción de las secuencias se realizó un ensayo de digestión utilizando en forma conjunta las enzimas *EcoRI* y *BamHI* (**Figura 4**). Los fragmentos obtenidos para SOD1G85R::EGFP fueron de 600 pb y 900 pb (**Figura 4 carril 1**); para α -SYNUCLEINA-WT::EGFP bandas de 300 pb,1000 pb y 1300 pb (**Figura 4 carril 3**); para EGFP se observó la liberación de una banda de 700 pb (**Figura 4 carril 5**) ; para polyQ79::EGFP se observaron dos bandas de 700 pb y 350 pb aproximadamente (**Figura 4 carril 7**); para polyQ11::EGFP se observaron la liberación de dos fragmentos de 700 pb y otro de aproximadamente de 100 pb (**Figura 4 carril 9**) corroborando así la inserción. Paralelamente estos plasmidios fueron secuenciados para corroborar que las secuencias clonadas eran correctas.

Con el objeto de confirmar la correcta expresión proteica de los nuevos plasmidios se realizó la transfección transitoria en células HEK 293t utilizando medio en ausencia o presencia de doxiciclina. Mediante un análisis de western blot se confirmó la expresión específica de las proteínas inducidas por doxiciclina, observándose la expresión de las proteínas de fusión SOD1G85R::EGFP en un tamaño aproximado de 45 kDa. Además se observó la presencia de especies de alto peso molecular en la muestra con DTT (**Figura 5A**). También, se confirmó la expresión de la proteína α -SYNUCLEINA-WT::EGFP de un tamaño aproximado de 54 kDa utilizando el anticuerpo anti- α -SYN. La expresión de la proteína EGFP también fue confirmada mediante este análisis obteniéndose una banda específica de 35 kDa inducida por doxiciclina (**Figura 5A**). Adicionalmente, células HEK 293t se transfectaron transitoriamente y se estimularon con doxiciclina por 48 horas. Se evaluó la expresión de las proteínas de fusión utilizando microscopía de epifluorescencia. En las células transfectadas con el plasmidio pLVX- α -SYNUCLEINA-WT::EGFP se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula la marca de fluorescencia, a diferencia de las células transfectadas con SOD1G85R::EGFP en donde el patrón subcelular es restringido al citoplasma (**Figura 5B**).

En paralelo, se analizó la expresión de las proteínas de fusión de polyQ11::EGFP mediante western blot. Se observó que el tamaño de la proteína de fusión polyQ11::EGFP de 38 kDa concuerda con lo esperado. En este caso no se observó la formación de agregados en ninguna de las dos condiciones con o sin DTT (**Figura 6A**).

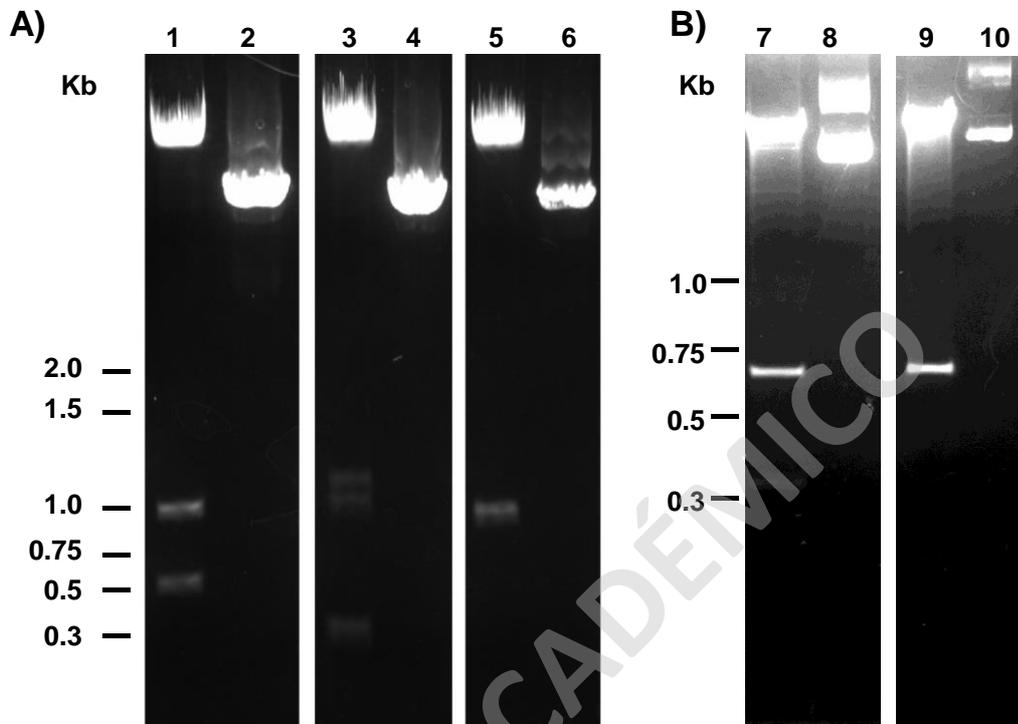


Figura 4. Subclonamiento de los genes de las proteínas mutantes en el vector pLVX: Electroforesis de los fragmentos de digestión de los plasmidios pLVX SOD1G85R::EGFP, αSYNWT::EGFP, EGFP, polyQ79::EGFP y polyQ11::EGFP con las endonucleasas *EcoRI* y *BamHI*. **(A)** Plasmidio pLVX SOD1G85R::EGFP digerido con *EcoRI/BamHI* y pLVX SOD1G85R::EGFP sin digerir (Carril 1 y 2), plasmidio pLVX αSYN WT::EGFP digerido con *EcoRI/BamHI* y pLVX αSYN WT::EGFP sin digerir (Carril 3 y 4), plasmidio pLVX EGFP digerido con *EcoRI/BamHI* y pLVX EGFP sin digerir (Carril 5 y 6). **(B)** Plasmidio pLVX polyQ79::EGFP digerido con *EcoRI/BamHI* y pLVX polyQ79::EGFP sin digerir (Carril 7 y 8), plasmidio pLVX polyQ11::EGFP digerido con *EcoRI/BamHI* y pLVX polyQ11::EGFP sin digerir (Carril 9 y 10).

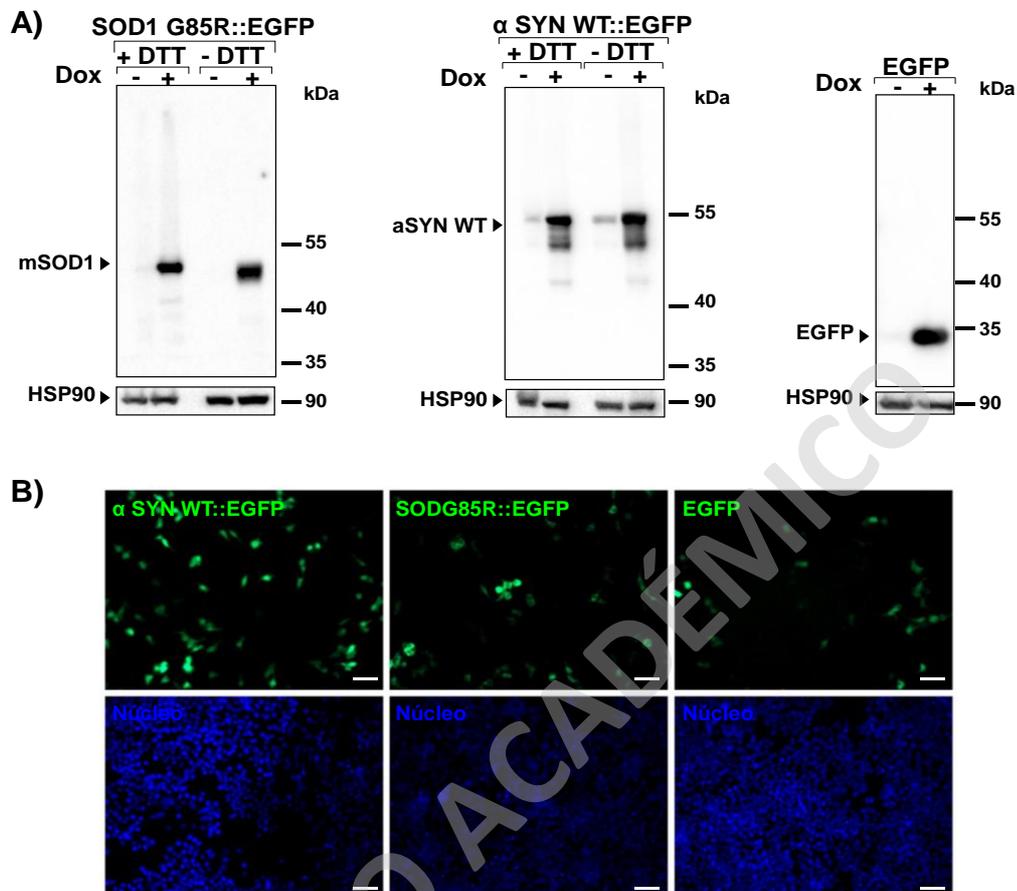


Figura 5. Validación de expresión de constructos pLVX SOD1G85R::EGFP, pLVX α SYN WT::EGFP y pLVX EGFP: (A) Las células HEK 293t fueron transfectadas transitoriamente con los plásmidos pLVX SOD1G85R::EGFP, pLVX α SYN WT::EGFP y pLVX EGFP en ausencia o en presencia de doxiciclina a una concentración de 100 ng/ml. Luego de 48 horas se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (B) Se analizó la expresión de las proteínas por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

Sin embargo, en las muestras de células transfectadas con el plasmidio de expresión de polyQ79::EGFP se observaron la formación de agregados proteicos en la muestra sin DTT además de la expresión del monómero de la proteína de fusión de un tamaño de 45 kDa (**Figura 6A**). En las células HEK 293t transfectadas con el plasmidio pLVX-polyQ79::EGFP, se observó un patrón subcelular de fluorescencia tanto en el citoplasma como en el núcleo de estas células (**Figura 6B**). Además, luego de 48 horas de expresión se observaron inclusiones proteicas citoplasmáticas, en aproximadamente un 10% de las células.

En resumen, para la generación de modelos de tipo neuronal se siguió el protocolo descrito en la **sección 6.9.2** y se obtuvieron las siguientes líneas celulares:

- Células N2a que sobreexpresan estable e induciblemente α -SYNUCLEINA WT::EGFP y la línea celular control EGFP
- Células NSC34 que sobreexpresan estable e induciblemente SOD1G85R::EGFP y la línea celular control EGFP.
- Células HEK 293t que sobreexpresan estable e induciblemente polyQ79::EGFP y la línea celular control polyQ11::EGFP.

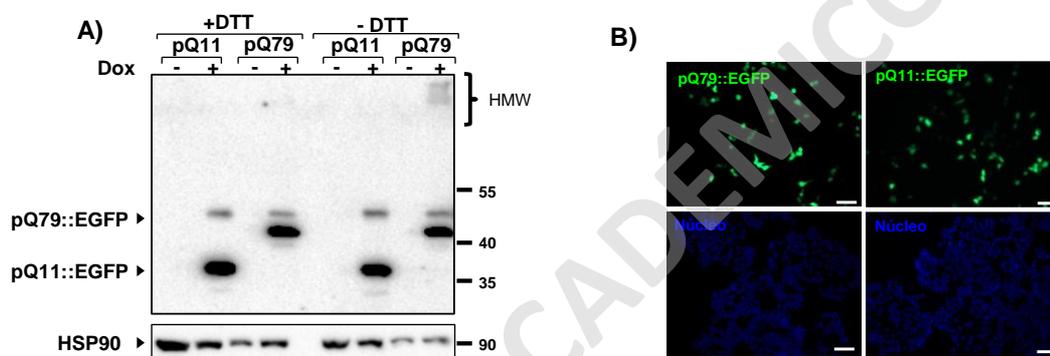


Figura 6. Validación de expresión de constructos pLVX polyQ79::EGFP y pLVX polyQ11::EGFP: (A) Células HEK 293t fueron transfectadas transitoriamente con los plasmidios pLVX polyQ79::EGFP y pLVX polyQ11::EGFP en ausencia o en presencia de doxiciclina a una concentración de 100 ng/ml. Luego de 48 horas se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (B) Se analizó la expresión de las proteínas por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m.

7.2 Determinar parámetros microscópicos de los biosensores

7.2.1 Caracterización de un modelo *in vitro* de tipo neuronal de ELA

A fin de caracterizar un nuevo modelo de ELA se realizó la inducción de las proteínas fluorescentes en células NSC34 estables por 24, 48 y 72 horas. Luego mediante la técnica de western blot se observó la expresión de la proteína SOD1G85R::EGFP de un tamaño aproximado de 54 kDa la cual se acumula de una manera dependiente del tiempo de inducción (**Figura 7A**). La expresión de la proteína de fusión SOD1G85R::EGFP también se visualizó utilizando microscopía de epifluorescencia, se observó un patrón subcelular citoplasmático. Además, no se observó la formación de inclusiones proteicas a las 72 horas de expresión (**Figura 7B**). Como control, se generaron las líneas celulares NSC34 que sobreexpresan EGFP. Se realizó el mismo ensayo de western blot a diferentes tiempos y se observó la expresión y acumulación de EGFP dependiente del tiempo (**Figura 7C**). A diferencia de la línea que sobreexpresan SOD1G85R::EGFP la marca de fluorescencia de las células control EGFP se observó en el citoplasma como también en el núcleo de las células (**Figura 7D**). Finalmente se evaluó la expresión de EGFP de cada línea utilizando citometría de flujo (**Figura 7E**). Se realizó la cuantificación de células EGFP positivas en cada modelo celular, y se obtuvo un 58% de células GFP positivas en el modelo de motoneuronas EGFP mientras que en las células que sobreexpresan SOD1G85R::EGFP, un 40% de células GFP positivas (**Figura 7F**). Una expresión basal cercana un 10% en ambas líneas celulares se detectaron en la condición sin doxiciclina. En conjunto estos datos sugieren que la generación de

una línea estable utilizando el sistema Tet-One que sobreexpresa SOD1G8R::EGFP, no forma agregados proteicos que puedan ser analizados mediante técnicas de western blot y microscopía de epifluorescencia en motoneuronas NSC34.

7.2.2 Caracterización de un modelo *in vitro* de la EP en células N2A.

Posterior a la generación del modelo celular de EP se realizó la caracterización de este, mediante la inducción de las proteínas de las células N2a estables por 24, 48 y 72 horas. Se realizó la detección específica de las proteínas de fusión, α -SYNUCLEINA WT::EGFP de un tamaño aproximado de 55 kDa mediante western blot, se observó un aumento de la expresión dependiente del tiempo de inducción (**Figura 8A**). Además, se detectaron especies de alto peso molecular que se acumulan conforme aumenta las horas de inducción. La expresión se visualizó además por microscopía de epifluorescencia, donde la marca de α -SYNUCLEINA WT::EGFP se observó en el citoplasma y núcleo de las células (**Figura 8B**).

No se detectó la formación de inclusiones proteicas en ninguno de los tiempos de inducción, como se muestra en el panel (**Figura 8B**). A su vez se generó la línea celular N2a que expresa EGFP como control, en las cuales se realizó el mismo ensayo de western blot a diferentes tiempos (**Figura 8C**), en las cuales se observó una acumulación de la proteína EGFP de 35 kDa dependiente del tiempo.

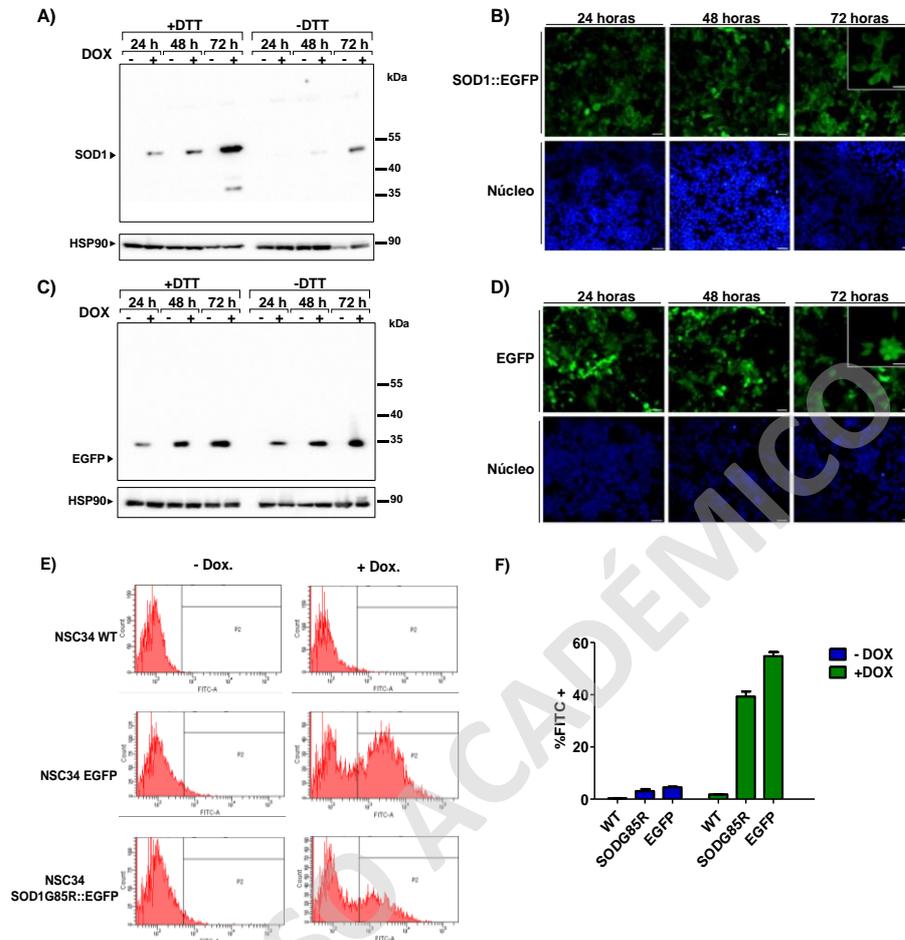


Figura 7. Caracterización de un modelo de la ELA in vitro estable e inducible en células NSC34: (A) Las células NSC34 que expresan SOD1G85R::EGFP se indujeron con doxiciiclina a una concentración de 100 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (B) Se analizó la expresión de la proteína SOD1G85R::EGFP por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50µm. (C) Las células NSC34 que expresan EGFP se indujeron con doxiciiclina a una concentración de 100 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (D) Se analizó la expresión de la proteína EGFP por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 µm. (E) Las células NSC34 WT, NSC34 EGFP y NSC34 SOD1G85R::EGFP fueron estimuladas con doxiciiclina por 48 horas y se determinó el porcentaje de células GFP positivas (FITC+) por citometría de flujo. (F) Grafico que representa el porcentaje de células FITC+ en cada una de las líneas celulares analizadas (n=3).

La marca de fluorescencia se detectó en el citoplasma y núcleo de las células (**Figura 8D**). Posteriormente se midió la fluorescencia de cada línea utilizando citometría de flujo (**Figura 8E**). Se realizó la cuantificación del número de células GFP positivas de cada modelo celular, observándose un 57% de células GFP positivas, en el modelo de neuroblastoma control mientras que en las células que sobreexpresan α -SYNUCLEINA WT::EGFP un 20%. Una expresión basal cercana un 10% en líneas celulares de EGFP se detectó en la condición sin doxiciclina, a diferencia de un 4% de fluorescencia total en el modelo de Synucleina (**Figura 8F**). Se estableció un modelo de agregación proteica de la EP, el cual puede ser analizado mediante western blot. Estos datos sugieren fuertemente que la generación de un modelo estable e inducible en células N2a con el sistema Tet-One que sobreexpresan α -SYNUCLEINA WT::EGFP no forma inclusiones proteicas que puedan ser analizadas por microscopía de epifluorescencia.

7.2.3 Caracterización de un modelo *in vitro* de Poliglutaminas en células HEK.

Se estableció un nuevo modelo de sobreexpresión de poliglutaminas en células HEK 293t, se caracterizó mediante la inducción de las proteínas por 24, 48 y 72 horas, mediante western blot (**Figura 9A**) y se observó la detección de la proteína polyQ79::EGFP de un tamaño de 45 kDa, esta proteína se acumula al aumentar el tiempo de inducción, se observaron especies de alto peso molecular en los tiempos 48 y 72 horas.

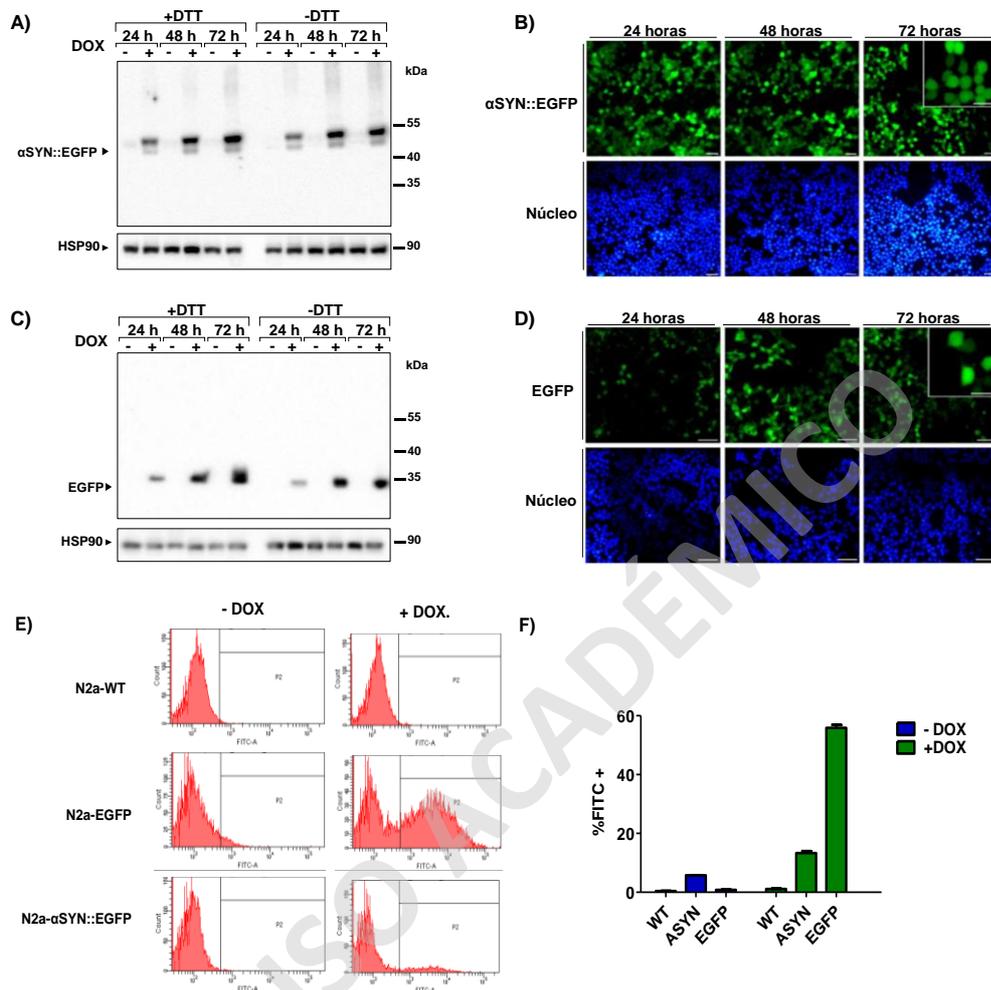


Figura 8. Caracterización de un modelo de la EP *in vitro* estable e inducible en células N2A: (A) Células N2a que expresan establemente α SYN WT::EGFP se indujeron con doxiciclina a una concentración de 100 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (B) Se analizó la expresión de la proteína α SYN WT::EGFP por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (C) Las células N2a que expresan establemente EGFP fueron inducidas con doxiciclina a una concentración de 100 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (D) Se analizó la expresión de la proteína EGFP por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (E) Las células N2a WT, N2a EGFP y N2a α SYN WT::EGFP fueron inducidas con doxiciclina por 48 horas y se determinó el porcentaje de células EGFP positivas (FITC+) por citometría de flujo. (F) Grafico que representa el porcentaje de células FITC+ en cada una de las líneas celulares analizadas (n=3).

La expresión de las proteínas fluorescentes se analizó utilizando microscopía de epifluorescencia (**Figura 9B**), tanto en el citoplasma celular como en el núcleo de estas se observó marca de fluorescencia, además se indentificaron inclusiones proteicas citoplasmáticas a las 48 y 72 horas pero solo un 10% de la población celular. A su vez se generaron células que sobreexpresan polyQ11::EGFP como control, se realizó el mismo ensayo (**Figura 9C**) midiendo la expresión de la proteína a diferentes tiempos, se observó una acumulación sostenida en el tiempo. Además la fluorescencia de EGFP se visualizó en el citoplasma y en el núcleo celular (**Figura 9D**). Luego se midió la fluorescencia de cada línea utilizando citometría de flujo (**Figura 9E**). Se realizó la cuantificación de la fluorescencia de cada modelo celular (**Figura 9F**), y se obtuvo un porcentaje de células GFP positivas de un 55% en el modelo control mientras que en las células que sobreexpresan poliglutaminas acopladas a EGFP el porcentaje fue de un 52%. Se observó una expresión basal a un 5% en las celulas polyQ11::EGFP en la condición sin doxiciclina, a diferencia de un 3% de fluorescencia total en el modelo de poliglutaminas. Estos datos en conjunto sugieren que la sobreexpresión de polyQ79::EGFP en células HEK forma agregados proteicos que pueden ser analizados por western blot, además de un porcentaje menor de células que forman inclusiones proteicas citoplasmáticas que pueden ser analizadas por microscopía de epifluorescencia.

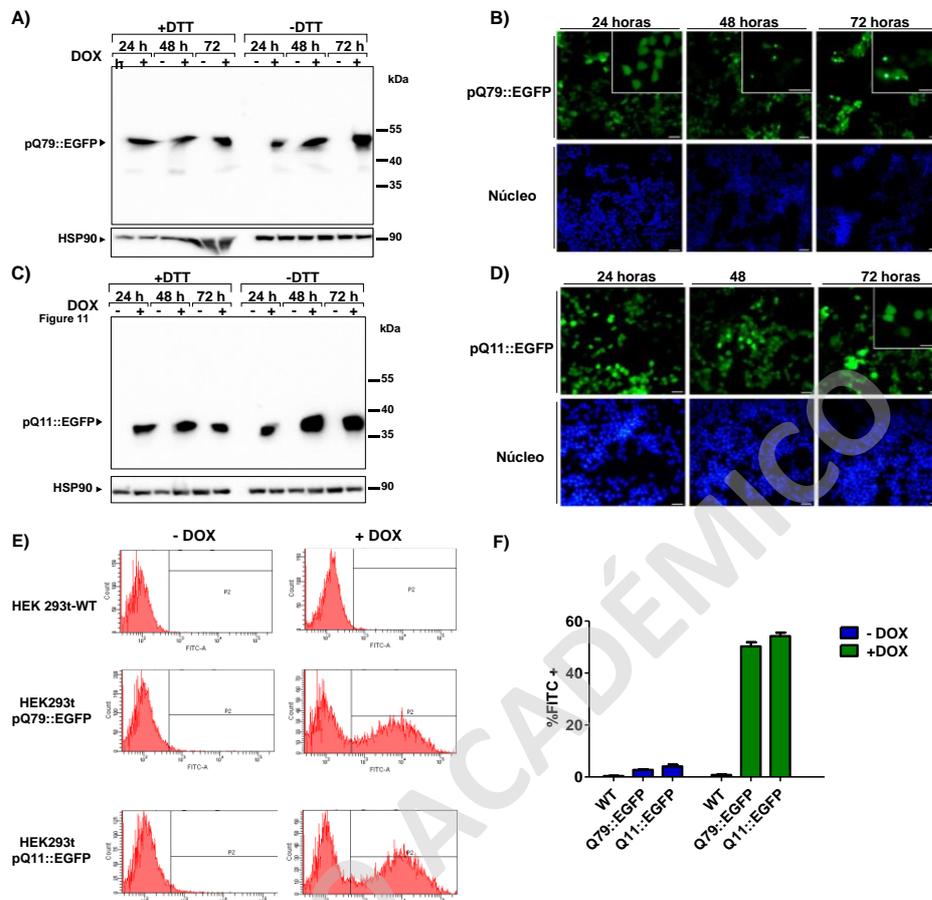


Figura 9. Caracterización de un modelo de la EH *in vitro* estable e inducible en células HEK: (A) Células HEK 293t que expresan establemente polyQ79::EGFP se indujeron con doxiciclina a una concentración de 100 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (B) Se analizó la expresión de la proteína polyQ79::EGFP por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (C) Las células HEK 293t que expresan establemente EGFP se indujeron con doxiciclina a una concentración de 100 ng/ml durante 24, 48 y 72 horas. Se analizó la expresión proteica mediante western blot. HSP90 fue usado como control de carga. (D) Se analizó la expresión de la proteína EGFP por microscopía de epifluorescencia directa y tinción nuclear con la sonda DAPI. La barra de escala corresponde a 50 μ m. (E) Las células HEK 293t WT, HEK 293t polyQ11 EGFP y HEK 293t polyQ79::EGFP fueron incubadas con doxiciclina a una concentración de 100ng/ml durante 48 horas y mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células EGFP positivas (FITC+). (F) Grafico que representa el porcentaje de células FITC+ en cada una de las líneas celulares analizadas (n=3).

En resumen, en la sección 7.1 y 7.2 se establecieron una gran variedad de líneas celulares, con el objetivo de generar modelos *in vitro* de proteinopatías (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de líneas celulares establecidas.

Proteinopatía	Línea Celular	Estable	Biosensor	Agregación por WB	Inclusiones por microscopía
EH	HEK FLPFRT/TO	Si	mHtt-PolyQ74::EGFP	Si	Si
ELA	HEK FLPFRT/TO	Si	SOD1::mCherry	Si	No
EH	N2a	No	mHtt-PolyQ74::EGFP	Si	No
ELA	NSC34	No	SOD1::mCherry	Si	No
ELA	NSC34	Si	SOD1G85R::EGFP	No	No
EP	N2a	Si	α SYN WT::EGFP	Si	No
EH	HEK	Si	PolyQ79::EGFP	Si	Si

Se decidió utilizar el modelo de EH en células HEK FLP FRT/TO que expresa de manera estable y homogénea inclusiones proteicas en toda la población celular. Esta línea celular ya ha sido validada como un modelo de agregación proteica (Hageman et al. 2010). Con estos datos es que se postuló a este modelo para ser utilizado en el ensayo de búsqueda de una nueva propiedad bioactiva de anti-agregación de extractos naturales de hoja de murtila.

7.3 Analizar a gran escala y en forma automatizada el efecto de extractos derivados de hojas de murtila sobre agregación proteica.

7.3.1 Validación de análisis de microscopía automatizada

Con el objetivo de validar los diferentes tipos de protocolos de la microscopía automatizada Cellomics se analizaron células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP por 24 horas. Luego se adquirieron las imágenes mediante

microscopía automatizada utilizando la aplicación “General Spot Measurement Tool”. Esta aplicación, cuantifica el total de las células por campo las cuales equivalen al total de células sembradas por pocillo validando con esto el protocolo. Además, se identificó que en valores de alta confluencia y en presencia de doxiciclina, se observó una disminución significativa en el número de células en los pocillos con 15.000 y 20.000 células en comparación con los controles sin doxiciclina (**Figura 10A**). Se cuantificaron el número de agregados por célula y se observó un promedio de 1,5 agregados por célula en todas las condiciones al ser inducida la expresión de la proteína fluorescente mHtt-PolyQ74::EGFP. La expresión basal se mantuvo en promedio a 0,3 agregados por células en todas las condiciones (**Figura 10B, C**). Para validar este ensayo, se determinó el parámetro estadístico denominado factor Z, el cual se calcula a partir de los promedios y desviaciones estándar de los valores mínimos y máximos de un modelo celular. Este ensayo valida la línea celular de la EH como un modelo viable para la realización de un HTS. Para esto se sembraron células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP 24 horas luego se realizó la inducción proteica por un periodo total de 24 horas. Posterior a ello se realizó la adquisición de imágenes por microscopía automatizada Cellomics. Al ser calculado el factor Z de este modelo, se obtuvo un valor de 0,671 validándolo como modelo para HTS (**Figura 10D**).

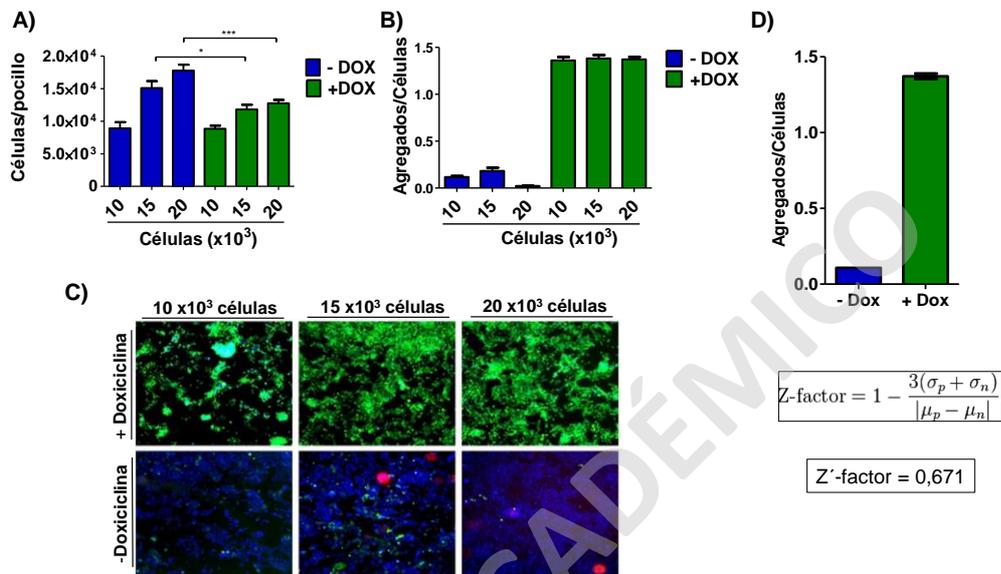


Figura 10. Validación de métodos de microscopía automatizada en modelo de la EH en células HEK FLP FRT/TO: Las células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP se sembraron a diferente confluencia celular y se indujo la expresión de proteínas con 1 µg/ml de doxiciclina durante 48 horas. **(A)** Mediante microscopía Cellomics se determinó el número de células totales (n=8) (*p < 0,05; prueba no paramétrica Mann-Whitney) (***) p < 0,01 prueba no paramétrica Mann-Whitney). **(B)** Las células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP se sembraron en diferente confluencia celular y se indujo la expresión de proteínas con 1 µg/ml de doxiciclina durante 48 horas y mediante microscopía Cellomics se determinó el número agregados por célula (n=8). **(C)** Imágenes representativas obtenidas de los 3 canales por microscopía Cellomics. **(D)** Calculo del Factor Z en células inducidas por 24 horas y determinación del número de agregados por célula por microscopía Cellomics.

Con la finalidad de identificar a que concentraciones de extractos de hoja de murtila generan citotoxicidad en las células NSC34. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de diferentes extractos de murtila derivados de la fracción de Acetato de Etilo y Etanolico. Luego de 24 horas de incubación, las células se visualizaron y cuantificadas utilizando la plataforma Cellomics. En los extractos derivados de la fracción etanolica de murtila a una concentración 1 $\mu\text{g/ml}$ no son tóxicos en las células NSC34, en cambio al aumentar la concentración de los diferentes extractos, se observa una disminución en el número de celular dependiente de la concentración lo que sugiere fuertemente citotoxicidad celular(**Figura 11A**). Este efecto se observó en extractos de acetato de etilo que resultaron ser tóxicos a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ en comparación a concentraciones inferiores de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ (**Figura 11B**).

El mismo análisis se realizó en células N2a, en donde se identificó que extractos derivados de la fase etanolica son tóxicos a concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/ml}$ evidenciándose en una disminución en el número de células por campo en comparación con el control DMSO. Esto, no se observó a concentraciones entre 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$ en donde la disminución del número de células por campo es menor en comparación con la concentración más alta de extractos (**Figura 12A**). En el siguiente gráfico se observó un efecto similar en los extractos derivados de la fracción de acetato de etilo de hoja de murtila en donde disminuye el número de células al aumentar las concentraciones de estos (**Figura 12B**). Además se observó un aumento de 3 veces en promedio del número de células por campo en el extracto de acetato de etilo 19-1 ha con respecto al control

DMSO, lo que sugiere que este extracto participaría como un agente que promueve la proliferación en células N2a (**Figura 12B**). De esta manera, se decidió utilizar los extractos derivados de hojas de murtila a las concentraciones 1 µg/ml y 25 µg/ml para los experimentos posteriores.

7.3.3 Análisis del impacto en la viabilidad celular y agregación proteica de extractos de hoja de murtila en un modelo *in vitro* de poliglutaminas.

En la búsqueda de identificar extractos de hoja de murtila que disminuyan la agregación proteica se realizó un ensayo en células HEK FLP FRT/TOmHtt-PolyQ74::EGFP. Se incubaron por 24 horas en presencia de diferentes extractos de hojas de murtila a una concentración de 25 µg/ml, en paralelo estas células se estimularon para expresar la proteína mHtt-polyQ74::EGFP.

Las imágenes fueron adquiridas y cuantificadas utilizando la plataforma Cellomics. La formación de agregados proteicos de mHtt-PolyQ74::EGFP en ausencia de doxiciclina se mantiene en un basal inferior a los 2 agregados por célula en la mayoría de las muestras incubadas con diferentes extractos naturales derivados tanto de acetato de etilo como etanolicos (**Figura 13A**). Además, se cuantificó la viabilidad celular midiendo la incorporación de 7-AAD. Se observó que extractos obtenidos a partir de la fracción de acetato de etilo son más tóxicos a concentraciones de 25 µg/ml en células HEK mHtt-PolyQ74::EGFP en ausencia de doxiciclina a diferencia de los extractos derivados de la fracción etanólica (**Figura 13B**).

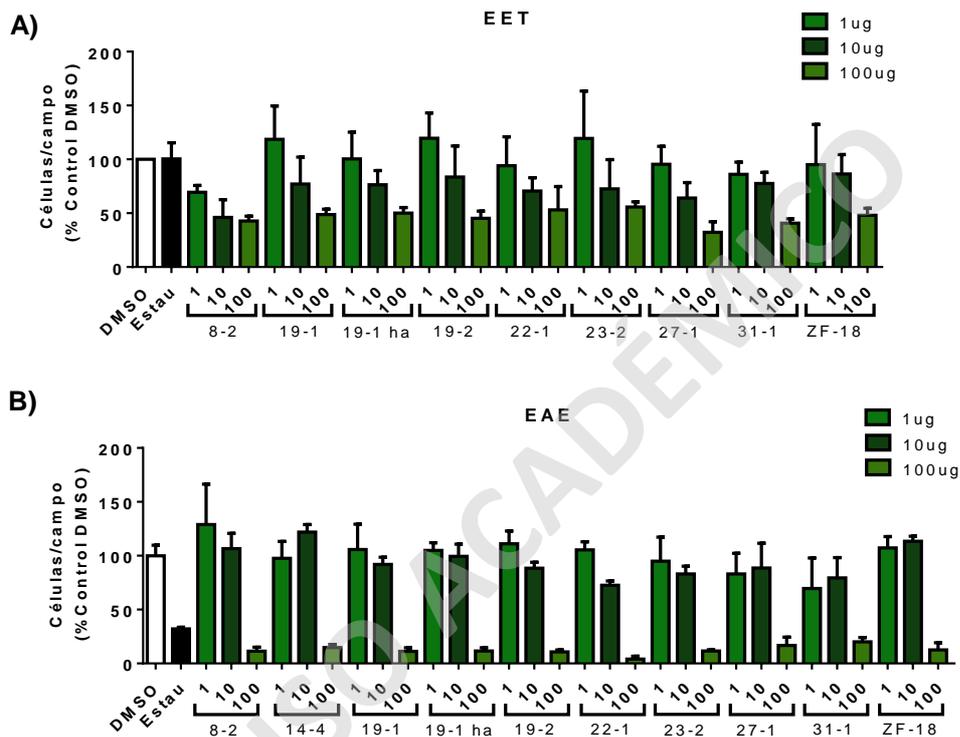


Figura 11. Análisis de toxicidad celular mediada por extractos naturales de hoja de murtila en células NSC34 WT: (A) Las células NSC34 WT se incubaron con diferentes extractos etanólicos (EET) de hoja de murtila a una concentración de 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml. Mediante microscopía Cellomics se cuantificó el número de células por campo en cada condición respecto al control DMSO. (B) Este mismo análisis se realizó con extractos de acetato de etilo (EAE) de hojas de murtila. Se utilizó estaurosporina como control positivo de muerte celular.

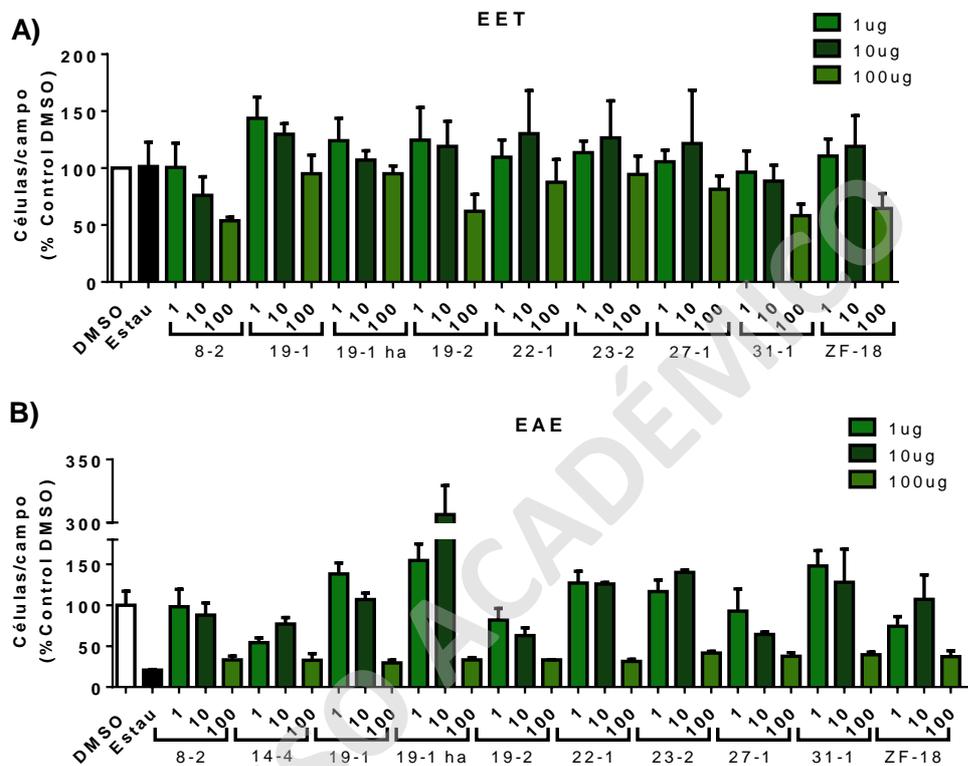


Figura 12. Análisis de la toxicidad celular mediada por extractos naturales de hoja de murtila en células N2A: (A) Las células N2A se incubaron con diferentes extractos etanólicos (EET) de hoja de murtila a una concentración de 1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml. Mediante microscopía Cellomics se cuantificó el número de células por campo en cada condición respecto al control DMSO. (B) Este mismo análisis se realizó con extractos de acetato de etilo (EAE) de hojas de murtila. Se utilizó estaurosporina como control positivo de muerte celular.

La disminución de agregados proteicos en las muestras incubadas con extractos etanolicos no fueron significativas. Se observó una disminución significativa en comparación con el control no tratado (NT) en las muestras incubadas con los extractos de acetato de etilo 19-1,19-2,22-1,23-2 y la muestras cauquenes (**Figura 13C**). En paralelo se cuantificó de forma automatizada la muerte celular en donde se observó nuevamente que el patrón de toxicidad inducida por los extractos de acetato de etilo en comparación con los extractos etanolicos fue significativamente mayor.

8. Discusión

En este trabajo hemos desarrollado nuevos modelos celulares de enfermedades neurodegenerativas, y además se estudiaron las propiedades bioactivas de extractos naturales de hoja de murtilla, en particular su capacidad disminuir la acumulación de agregados proteicos con el fin de obtener una alternativa terapéutica para el tratamiento de proteinopatías que afectan al cerebro.

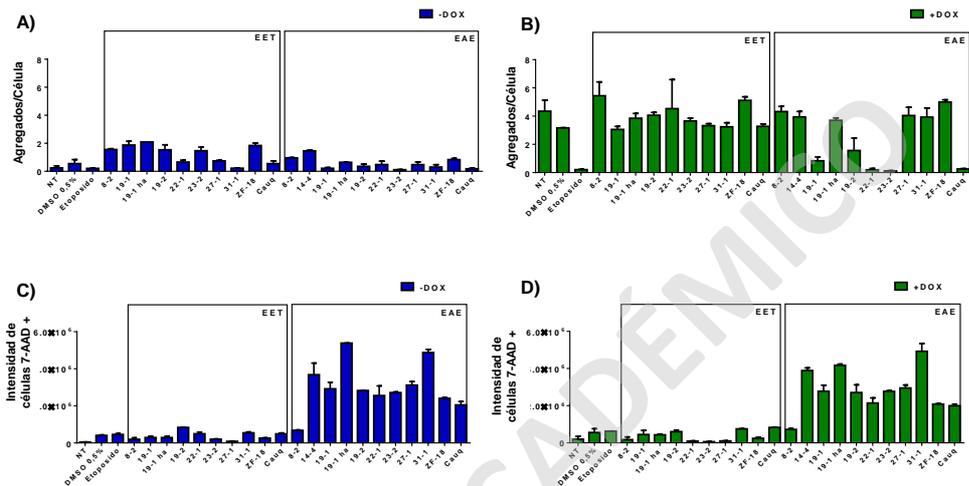


Figura 13. Análisis del efecto de compuestos naturales de hoja de murtila en la agregación proteica y muerte celular en modelos *in vitro* de la EH: (A) Las células HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP fueron incubadas con diferentes extractos de hoja de murtila y se realizó la cuantificación de número agregados por célula en ausencia y presencia de doxiciclina **(B)**. En las mismas células se determinó la viabilidad celular mediante la medición del fluoroforo 7-AAD por célula en ausencia **(C)** y presencia de doxiciclina **(D)**.

8.1 Modelos celulares de proteinopatías

La búsqueda de modelos *in vitro* de proteinopatías sigue siendo un área de intenso desarrollo. Diferentes grupos de investigación han postulado posibles modelos celulares, los cuales en gran medida utilizan agentes químicos que promueven la agregación proteica (Narkiewicz et al. 2014), por ejemplo inhibidores de proteosoma como MG-132 (McLean et al. 2001, Nonaka et al. 2013), así como la utilización de algunos metales tales como el cobre (Paik et al. 1999). Además mediante la manipulaciones genéticas de variantes patológicas se han logrado generar modelos celulares que recapitulan ciertas características de estas enfermedades (Lazaro et al. 2014).

En este trabajo se establecieron diferentes métodos de generación de modelos *in vitro* de proteinopatías. Estos modelos se basaron en que incorporan establemente el gen de interés (gen de la proteína patogénica) en el genoma y que la expresión proteica es inducible por tetraciclina.

Uno de los modelos celulares de agregación proteica más reproducible y agresiva es la expresión de la proteína mHtt que remeda la condición patológica descrita en la enfermedad de Huntington (**Figura 1**). Este modelo fue establecido en células HEK FLP FRT/TO y se utilizó para el estudio de agregación proteica desarrollado en el presente trabajo el cual ya ha sido publicado como modelo *in vitro* de la EH (Hageman et al. 2010).

Además se estableció un modelo de ELA en las células HEK FLP FRT/TO, basado en la expresión de la proteína SOD1. En estas nuevas líneas celulares no se observó la formación de inclusiones proteicas. Con el fin de

resolver esta dificultad se decidió establecer estos modelos celulares en líneas celulares tipo neuronales, considerando los resultados obtenidos previamente en el laboratorio en los cuales se ha logrado observar la formación de inclusiones proteicas en estos tipos celulares (Hetz et al. 2009, Vidal et al. 2012). Se establecieron modelos *in vitro* de la EH en células N2A y de ELA en NSC34. En ambos modelos propuestos de agregación proteica no fue posible observar dicho fenómeno (**Figura 3**), por lo que se propuso utilizar una metodología diferente a las anteriormente implementadas con la finalidad de generar un sistema más agresivo de expresión y poder obtener un modelo de agregación en una línea celular tipo neuronal.

A lo largo de los años, diferentes métodos de transferencia de genes de interés en líneas celulares han sido utilizadas. Uno de ellos son los vectores lentivirales portadores de genes de interés combinado con sistemas inducibles que han sido validados como un método eficiente de expresión proteica obteniéndose inserciones estables del gen junto con un aumento de expresión proteica cerca de 10.000 veces (Benabdellah et al. 2011, Heinz et al. 2011). El sistema de expresión tetraciclina (Tet-ON) (Xie et al. 2008), es el más utilizado y validado para regular la expresión de genes de interés tanto *in vitro* (Xu et al. 2012, Yang et al. 2013, Nair et al. 2014, Wakasa et al. 2015) como en modelos *in vivo* (Szulc et al. 2006, Sato et al. 2013, Dogbevia et al. 2015). En este trabajo se utilizaron dos sistemas basados en el Tet-On: el sistema FLP FRT/TO y el sistema pLVX Tet-On, los cuales son transcripcionalmente controlados de manera diferente. El sistema FLP FRT/TO posee el inserto de manera estable junto con la expresión del represor tR

unido al promotor híbrido CMV/TetO2, el cual en presencia de doxiciclina es separado de este promotor permitiendo la traducción de la proteínas de interés (**Esquema 1**). El sistema lentiviral pLVX, en cambio, posee un sistema todo en uno, en donde la modulación de la expresión de las proteínas de interés es regulado por el transactivador tA el cual en presencia de doxiciclina se une al promotor P_{TRE3GS} iniciándose la traducción proteica (**Esquema 2**). Además el sistema pLVX, posee la capacidad de generar un modelo inducible en cualquier línea celular de interés debido al amplio tropismo de este tipo de partículas virales.

Mediante el sistema pLVX se establecieron 3 modelos celulares de proteinopatías basados en los biosensores SOD1G85R::EGFP, α -SYN WT::EGFP y polyQ79::EGFP. Estos biosensores fueron utilizados previamente en nuestro laboratorio como modelos de agregación proteica, pero usando expresión transitoria (Hetz et al. 2009, Vidal et al. 2012). Aun cuando la expresión de los biosensores fue inducida de manera correcta los niveles proteicos alcanzados no fueron suficientes para generar inclusiones proteicas. Esto puede ser explicado por la regulación de los promotores que utiliza este tipo de sistema de expresión inducible por la droga tetraciclina, que impide alcanzar niveles proteicos citotóxicos.

Finalmente aun cuando los modelos celulares de proteinopatías desarrollados en líneas de tipo neuronal, no pudieron ser usados para el estudio anti-agregación de los extractos de murtila, constituyen una importante contribución a la investigación de proteinopatías, ya que será posible establecer

otros fenotipos gatillados por la expresión de estos biosensores en estos tipos celulares, como degeneración de neuritas, citotoxicidad, estrés oxidativo, daño mitocondrial, entre otras.

8.2 Propiedades anti-agregación de extractos de hoja de murtila

A lo largo de los años, diferentes metodologías han sido utilizadas en la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas para el tratamiento de enfermedades que actualmente carecen de una cura efectiva. En el último tiempo la necesidad de realizar estas búsquedas a mayor escala se ha intensificado, de hecho metodologías basadas en ensayos bioquímicos han sido desplazadas por la utilización de ensayos en modelos celulares y posterior análisis basada en microscopía automatizada a gran escala (Moore et al. 2001, Taylor et al. 2001, Rausch 2005). La tecnología Cellomics es una de ella y se ha posicionado como pionera en la búsqueda de nuevas drogas a gran escala. Es por esto que en esta tesis desarrollamos esta tecnología con el objetivo de identificar de manera automatizada la propiedad anti-agregación que poseen extractos naturales de hoja de murtila.

El modelo celular HEK FLP FRT/TO mHtt-PolyQ74::EGFP (**Figura 1**) se validó como un modelo viable para realizar HTS (**Figura 10B**), mediante la determinación del factor-Z el cual está definido por los promedios y las desviaciones estándar de los controles positivos y controles negativos (Zhang et al. 1999), que proporcionan un rango dinámico óptimo para determinar el porcentaje de aumento o disminución de inclusiones proteicas frente a un

tratamiento farmacológico en este caso extractos de hojas de murtila. Además se analizó el rango de concentración de los extractos que no genere citotoxicidad en líneas celulares. Los resultados obtenidos mostraron que estos extractos son inocuos en un rango de acción entre 1µg/ml y al menos 50µg/ml en líneas celulares tipos neuronales (**Figura 11 y 12**). Este rango fue utilizado para definir el rol de los extractos de hoja de murtila como agentes anti-agregación en nuestro modelo de la EH.

Mediante microscopía Cellomics, se identificaron cinco extractos de hoja de murtila (acetato de etilo) 19-1,19-2,22-1,23-2 y la muestra cauques los cuales disminuyen significativamente los agregados de mHtt-PolyQ74::EGFP en células HEK293 FLP FRT/TO (**Figura 13B**).

La actividad anti-agregación de estos extractos se suman a estudios previos donde han descrito la capacidad anti-oxidante de extractos de murtila en eritrocitos tratados con HClO y su capacidad anti-inflamatoria tópica en modelos *in vivo* (Aguirre et al. 2006, Suwalsky et al. 2007).

Las hojas de *Ugni molinae* han sido identificadas como una fuente de polifenoles importante (Rubilar et al. 2006). A su vez la actividad neuroprotectora de los polifenoles ha sido comprobada en diferentes modelos de enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo en una mejora en déficits motores y de comportamiento en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Joseph et al. 2003) y en modelos *in vitro* en los cuales se han identificado compuestos polifenólicos con propiedad citoprotectora (Savaskan et al. 2003, Rezai-Zadeh et al. 2005). Es posible que la actividad anti-agregación observada en extractos de hoja de

murtilla se deba en parte a la presencia de este tipo de moléculas que actúan como agentes antioxidantes.

Además, extractos de *Aristotelia chilensis* un tipo de berries chilenos han sido identificados como posibles agentes neuroprotectores, debido a que interfiere directamente con los péptidos de A β disminuyendo el proceso de agregación de estos, generando una disminución de la toxicidad de estas inclusiones proteicas en modelos *in vitro* (Fuentelba et al. 2011).

En la constante búsqueda de adquirir valor agregado a nuestra flora Chilena diversos grupos de investigación han enfocado sus investigaciones a este fin. La Dra. Carla Delporte colaboradora de esta investigación en conjunto con el Dr. Leon Goity posterior a la extracción seriada de hoja de murtilla, analizaron los diferentes extractos de hoja de murtilla en donde identificaron además de compuestos fenólicos en la fracción de Acetato de Etilo la presencia de triterpenoides pentacíclicos (Delporte et al. 2007, Goity 2013). Dentro de la investigación se identificó en mayor proporción la presencia de los ácidos corosólico, ursólico y oleanólico. El ácido corosólico un triterpenoide pentacíclico ha sido identificado como un potente agente antitumoral en diferentes modelos de cáncer (Fujiwara et al. 2014, Kim et al. 2014, Ku et al. 2015), así como también el ácido oleanólico el cual inhibe la proliferación de células tumorales de glioblastoma (Fujiwara et al. 2011). A diferencia de estos últimos dos compuestos, el ácido ursólico ha sido estudiado en modelos *in vitro* de Alzheimer. Este triterpenoide se identificó como un inhibidor directo de los péptidos de A β y su unión al receptor CD356, el cual ha sido descrito como biomarcador en

muestras postmortem de pacientes con Alzheimer (Wilkinson et al. 2011). La presencia de compuestos fenólicos con polaridades más baja a diferencia de los detectados en la fracción de extracción etanólica también fueron detectados en las muestras de los extractos de hoja de murtila en la fracción de acetato de etilo. En conjunto con estos resultados y los obtenidos en este trabajo de tesis se sugiere que la propiedad bioactiva de anti-agregación identificada en los compuestos 19-1,19-2,22-1,23-2 y la muestra cauquenes sería brindada tanto por la presencia de polifenoles y potenciada por estos compuestos triterpenoides.

Las diferentes propiedades bioactivas de murtila aún no están totalmente definidas. Las hojas de este berrie chileno a lo largo del tiempo han sido utilizadas en medicina tradicional, y se le atribuye propiedades astringentes, estimulantes y aromáticas, además de diversas propiedades terapéuticas frente a las afecciones de la piel y para el tratamiento de dolores del tracto urinario (Montenegro, 2000; Montes y Wilkomirsky, 1985). La infusión de sus hojas es empleada para suavizar el cutis reseco y aumentar la elasticidad de la piel (Montenegro, et al. 2005).

Finalmente promover el consumo de este berrie endémico chileno sería un posible tratamiento preventivo frente a posibles enfermedades de tipo inflamatoria como aquellas enfermedades asociadas a neuropatías previniendo la formación de estos cúmulos proteicos tóxicos. En el ámbito biotecnológico generar un producto dando un nuevo valor agregado a nuestra flora chilena, específicamente a la murtila donde nuestros ancestros predijeron sus propiedades desde tiempos remotos.

9. Proyecciones

Este trabajo contribuye por primera vez a la exploración del uso de extractos naturales de hoja de murtila en modelos celulares de proteinopatías. El desarrollo biotecnológico en el área de la biomedicina en la utilización de compuestos naturales de plantas endémicas chilenas como posible terapia en diferentes enfermedades neurodegenerativas es realmente bajo, aún más la utilización de tecnología de punta de microscopía automatizada abre una área poco explorada en Chile con un alto valor agregado.

Aun cuando los modelos *in vitro* de proteinopatías generados en este trabajo no fueron utilizados en el estudio inicial resulta interesante realizar un estudio secundario utilizando microscopía automatizada por ejemplo, para evaluar la acción terapéutica en la denditrogenesis, un efecto patológico crucial dentro de la progresión de las enfermedades neurodegenerativas (Liu et al. 2007, Radio et al. 2010).

Por otro lado, las líneas celulares que expresan los biosensores SOD1G85R::EGFP, α -SYN WT::EGFP y polyQ79::EGFP resultan una herramienta única debido a que en todos estos fue posible identificar especies de alto peso molecular por western blot. Estas especies corresponden a oligómeros proteicos que debido a su tamaño no son observados a nivel celular por microscopía, pero dado sus propiedades bioquímicas pueden ser visualizadas por otros métodos.

Otro análisis que se requiere abordar en un nuevo estudio es identificar los compuestos que componen estos extractos de hoja de murtila que estarían

participando en la disminución de estas inclusiones proteicas. Para ello es necesario realizar un estudio de identificación con nuestros colaboradores utilizando tecnología disponible de HPLC-MS con la finalidad de obtener un producto biotecnológico el cual ayude a prevenir la aparición de estas inclusiones proteicas, y por qué no generar una patente del mismo.

Dentro del objetivo general del proyecto en el que se enmarca esta tesis es utilizar compuestos derivados de otras plantas endémicas chilenas a lo largo de todo Chile. Por este motivo la metodología generada en esta tesis permitiría dilucidar si estos nuevos extractos también poseen propiedades bioactivas de anti-agregación utilizando la variedad de los modelos celulares de proteinopatías generados.

10. Conclusiones

- Mediante el sistema pLVX se logró establecer modelos celulares de proteinopatías tipo neuronales inducibles y estables.
- La tecnología Cellomics es una herramienta apropiada para identificar y cuantificar inclusiones proteicas de forma automatizada en modelos celulares de proteinopatías.
- Los extractos naturales de hoja de murtila de la fracción de Acetato de Etilo 19-1,19-2,22-1,23-2 y la muestra cauqueses disminuyen inclusiones proteicas de mHtt-PolyQ74::EGFP analizadas y cuantificadas por microscopía Cellomics en células HEK.

11. Referencias

Aguirre, M. C., C. Delporte, N. Backhouse, S. Erazo, M. E. Letelier, B. K. Cassels, X. Silva, S. Alegria and R. Negrete (2006). "Topical anti-inflammatory activity of 2alpha-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*." Bioorg Med Chem **14**(16): 5673-5677.

Ah-Hen, K., Zambra, C., Aguëro, J., Vega-Gálvez, A., & Lemus-Mondaca, R (2011). "Moisture diffusivity coefficient and convective drying modelling of murta (*Ugni molinae* Turcz): Influence of temperature and vacuum on drying kinetics." Food and Bioprocess Technology **6**(4), 919–930.

Almholt, D. L., F. Loechel, S. J. Nielsen, C. Krog-Jensen, R. Terry, S. P. Bjorn, H. C. Pedersen, M. Praestegaard, S. Moller, M. Heide, L. Pagliaro, A. J. Mason, S. Butcher and S. W. Dahl (2004). "Nuclear export inhibitors and kinase inhibitors identified using a MAPK-activated protein kinase 2 redistribution screen." Assay Drug Dev Technol **2**(1): 7-20.

Amer, D. A., G. B. Irvine and O. M. El-Agnaf (2006). "Inhibitors of alpha-synuclein oligomerization and toxicity: a future therapeutic strategy for Parkinson's disease and related disorders." Exp Brain Res **173**(2): 223-233.

Arosio, P., M. Vendruscolo, C. M. Dobson and T. P. Knowles (2014). "Chemical kinetics for drug discovery to combat protein aggregation diseases." Trends Pharmacol Sci **35**(3): 127-135.

Bates, G. (2003). "Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease." Lancet **361**(9369): 1642-1644.

Benabdellah, K., M. Cobo, P. Munoz, M. G. Toscano and F. Martin (2011). "Development of an all-in-one lentiviral vector system based on the original TetR for the easy generation of Tet-ON cell lines." PLoS One **6**(8): e23734.

Bertram, L. and R. E. Tanzi (2005). "The genetic epidemiology of neurodegenerative disease." J Clin Invest **115**(6): 1449-1457.

Bieschke, J. (2013). "Natural compounds may open new routes to treatment of amyloid diseases." Neurotherapeutics **10**(3): 429-439.

Bieschke, J., M. Herbst, T. Wiglenda, R. P. Friedrich, A. Boeddrich, F. Schiele, D. Kleckers, J. M. Lopez del Amo, B. A. Gruning, Q. Wang, M. R. Schmidt, R. Lurz, R. Anwyl, S. Schnoegl, M. Fandrich, R. F. Frank, B. Reif, S. Gunther, D. M. Walsh and E. E. Wanker (2012). "Small-molecule conversion of

toxic oligomers to nontoxic beta-sheet-rich amyloid fibrils." Nat Chem Biol **8**(1): 93-101.

Bieschke, J., J. Russ, R. P. Friedrich, D. E. Ehrnhoefer, H. Wobst, K. Neugebauer and E. E. Wanker (2010). "EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(17): 7710-7715.

Bores, G. M., F. P. Huger, W. Petko, A. E. Mutlib, F. Camacho, D. K. Rush, D. E. Selk, V. Wolf, R. W. Kosley, Jr., L. Davis and H. M. Vargas (1996). "Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine." J Pharmacol Exp Ther **277**(2): 728-738.

Bove, J., M. Martinez-Vicente and M. Vila (2011). "Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights." Nat Rev Neurosci **12**(8): 437-452.

Brayne, C. (2007). "The elephant in the room - healthy brains in later life, epidemiology and public health." Nat Rev Neurosci **8**(3): 233-239.

Caruana, M., T. Hogen, J. Levin, A. Hillmer, A. Giese and N. Vassallo (2011). "Inhibition and disaggregation of alpha-synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds." FEBS Lett **585**(8): 1113-1120.

Castillo, K., M. Nassif, V. Valenzuela, F. Rojas, S. Matus, G. Mercado, F. A. Court, B. van Zundert and C. Hetz (2013). "Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons." Autophagy **9**(9): 1308-1320.

Ciechanover, A. and Y. T. Kwon (2015). "Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies." Exp Mol Med **47**: e147.

Citron, M., D. Westaway, W. Xia, G. Carlson, T. Diehl, G. Levesque, K. Johnson-Wood, M. Lee, P. Seubert, A. Davis, D. Kholodenko, R. Motter, R. Sherrington, B. Perry, H. Yao, R. Strome, I. Lieberburg, J. Rommens, S. Kim, D. Schenk, P. Fraser, P. St George Hyslop and D. J. Selkoe (1997). "Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice." Nat Med **3**(1): 67-72.

Delporte, C., N. Backhouse, V. Inostroza, M. C. Aguirre, N. Peredo, X. Silva, R. Negrete and H. F. Miranda (2007). "Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain." J Ethiopia **112**(1): 162-165.

Dogbevia, G. K., R. Marticorena-Alvarez, M. Bausen, R. Sprengel and M. T. Hasan (2015). "Inducible and combinatorial gene manipulation in mouse brain." Front Cell Neurosci **9**: 142.

Ehrnhoefer, D. E., J. Bieschke, A. Boeddrich, M. Herbst, L. Masino, R. Lurz, S. Engemann, A. Pastore and E. E. Wanker (2008). "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers." Nat Struct Mol Biol **15**(6): 558-566.

Evert, B. O., U. Wullner and T. Klockgether (2000). "Cell death in polyglutamine diseases." Cell Tissue Res **301**(1): 189-204.

Forsberg, K., P. A. Jonsson, P. M. Andersen, D. Bergemalm, K. S. Graffmo, M. Hultdin, J. Jacobsson, R. Rosquist, S. L. Marklund and T. Brannstrom (2010). "Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients." PLoS One **5**(7): e11552.

Fuentealba, J., A. J. Dibarrart, M. C. Fuentes-Fuentes, F. Saez-Orellana, K. Quinones, L. Guzman, C. Perez, J. Becerra and L. G. Aguayo (2011). "Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by amyloid-beta aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract." J Neurosci Res **89**(9): 1499-1508.

Fujiwara, Y., Y. Komohara, R. Kudo, K. Tsurushima, K. Ohnishi, T. Ikeda and M. Takeya (2011). "Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3." Oncol Rep **26**(6): 1533-1537.

Fujiwara, Y., M. Takeya and Y. Komohara (2014). "A novel strategy for inducing the antitumor effects of triterpenoid compounds: blocking the protumoral functions of tumor-associated macrophages via STAT3 inhibition." Biomed Res Int **2014**: 348539.

Giese, A., B. Bader, J. Bieschke, G. Schaffar, S. Odoy, P. J. Kahle, C. Haass and H. Kretzschmar (2005). "Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation." Biochem Biophys Res Commun **333**(4): 1202-1210.

Goity (2013). "Caracterización de los compuestos activos de *Ugni molinae* (Murtilla) y sus potenciales efectos hipoglicemiantes, anti-inflamatorios y antioxidantes.(No publicado)."

Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-5551.

Hageman, J., M. A. Rujano, M. A. van Waarde, V. Kakkar, R. P. Dirks, N. Govorukhina, H. M. Oosterveld-Hut, N. H. Lubsen and H. H. Kampinga (2010). "A DNAJB chaperone subfamily with HDAC-dependent activities suppresses toxic protein aggregation." Mol Cell **37**(3): 355-369.

Heinz, N., A. Schambach, M. Galla, T. Maetzig, C. Baum, R. Loew and B. Schiedlmeier (2011). "Retroviral and transposon-based tet-regulated all-in-one vectors with reduced background expression and improved dynamic range." Hum Gene Ther **22**(2): 166-176.

Hetz, C. and B. Mollereau (2014). "Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **15**(4): 233-249.

Hetz, C., P. Thielen, S. Matus, M. Nassif, F. Court, R. Kiffin, G. Martinez, A. M. Cuervo, R. H. Brown and L. H. Glimcher (2009). "XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy." Genes Dev **23**(19): 2294-2306.

Ignatova, Z. and L. M. Gierasch (2006). "Extended polyglutamine tracts cause aggregation and structural perturbation of an adjacent beta barrel protein." J Biol Chem **281**(18): 12959-12967.

Joseph, J. A., N. A. Denisova, G. Arendash, M. Gordon, D. Diamond, B. Shukitt-Hale and D. Morgan (2003). "Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model." Nutr Neurosci **6**(3): 153-162.

Kang, K. S., N. Yamabe, Y. Wen, M. Fukui and B. T. Zhu (2013). "Beneficial effects of natural phenolics on levodopa methylation and oxidative neurodegeneration." Brain Res **1497**: 1-14.

Kim, J. H., Y. H. Kim, G. Y. Song, D. E. Kim, Y. J. Jeong, K. H. Liu, Y. H. Chung and S. Oh (2014). "Ursolic acid and its natural derivative corosolic acid suppress the proliferation of APC-mutated colon cancer cells through promotion of beta-catenin degradation." Food Chem Toxicol **67**: 87-95.

Kostka, M., T. Hogen, K. M. Danzer, J. Levin, M. Habeck, A. Wirth, R. Wagner, C. G. Glabe, S. Finger, U. Heizelmann, P. Garidel, W. Duan, C. A. Ross, H. Kretschmar and A. Giese (2008). "Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers." J Biol Chem **283**(16): 10992-11003.

Ku, C. Y., Y. R. Wang, H. Y. Lin, S. C. Lu and J. Y. Lin (2015). "Corosolic Acid Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Migration by Targeting the VEGFR2/Src/FAK Pathway." PLoS One **10**(5): e0126725.

Lazaro, D. F., E. F. Rodrigues, R. Langohr, H. Shahpasandzadeh, T. Ribeiro, P. Guerreiro, E. Gerhardt, K. Krohnert, J. Klucken, M. D. Pereira, B. Popova, N. Kruse, B. Mollenhauer, S. O. Rizzoli, G. H. Braus, K. M. Danzer and T. F. Outeiro (2014). "Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation." PLoS Genet **10**(11): e1004741.

Liu, D., H. B. McIlvain, M. Fennell, J. Dunlop, A. Wood, M. M. Zaleska, E. I. Graziani and K. Pong (2007). "Screening of immunophilin ligands by quantitative analysis of neurofilament expression and neurite outgrowth in cultured neurons and cells." J Neurosci Methods **163**(2): 310-320.

Lundholt, B. K., V. Linde, F. Loechel, H. C. Pedersen, S. Moller, M. Praestegaard, I. Mikkelsen, K. Scudder, S. P. Bjorn, M. Heide, P. O. Arkhammar, R. Terry and S. J. Nielsen (2005). "Identification of Akt pathway inhibitors using redistribution screening on the FLIPR and the IN Cell 3000 analyzer." J Biomol Screen **10**(1): 20-29.

Masuda, M., N. Suzuki, S. Taniguchi, T. Oikawa, T. Nonaka, T. Iwatsubo, S. Hisanaga, M. Goedert and M. Hasegawa (2006). "Small molecule inhibitors of alpha-synuclein filament assembly." Biochemistry **45**(19): 6085-6094.

Matus, S., L. H. Glimcher and C. Hetz (2011). "Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER." Curr Opin Cell Biol **23**(2): 239-252.

McLean, P. J., H. Kawamata and B. T. Hyman (2001). "Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons." Neuroscience **104**(3): 901-912.

Meng, X., L. A. Munishkina, A. L. Fink and V. N. Uversky (2009). "Molecular mechanisms underlying the flavonoid-induced inhibition of alpha-synuclein fibrillation." Biochemistry **48**(34): 8206-8224.

Moore, K. and S. Rees (2001). "Cell-based versus isolated target screening: how lucky do you feel?" J Biomol Screen **6**(2): 69-74.

Morris, M. C., D. A. Evans, J. L. Bienias, C. C. Tangney, D. A. Bennett, N. Aggarwal, R. S. Wilson and P. A. Scherr (2002). "Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study." JAMA **287**(24): 3230-3237.

Nair, G. G., R. K. Vincent and J. S. Odorico (2014). "Ectopic Ptf1a expression in murine ESCs potentiates endocrine differentiation and models pancreas development in vitro." Stem Cells **32**(5): 1195-1207.

Narkiewicz, J., G. Giachin and G. Legname (2014). "In vitro aggregation assays for the characterization of alpha-synuclein prion-like properties." Prion **8**(1): 19-32.

Nonaka, T., M. Masuda-Suzukake, T. Arai, Y. Hasegawa, H. Akatsu, T. Obi, M. Yoshida, S. Murayama, D. M. Mann, H. Akiyama and M. Hasegawa (2013). "Prion-like properties of pathological TDP-43 aggregates from diseased brains." Cell Rep **4**(1): 124-134.

Ono, K. and M. Yamada (2006). "Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro." J Neurochem **97**(1): 105-115.

Paik, S. R., H. J. Shin, J. H. Lee, C. S. Chang and J. Kim (1999). "Copper(II)-induced self-oligomerization of alpha-synuclein." Biochem J **340** (Pt **3**): 821-828.

Radio, N. M., T. M. Freudenrich, B. L. Robinette, K. M. Crofton and W. R. Mundy (2010). "Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis." Neurotoxicol Teratol **32**(1): 25-35.

Ramm, P., Y. Alexandrov, A. Cholewinski, Y. Cybuch, R. Nadon and B. J. Soltys (2003). "Automated screening of neurite outgrowth." J Biomol Screen **8**(1): 7-18.

Rao, J. N., V. Dua and T. S. Ulmer (2008). "Characterization of alpha-synuclein interactions with selected aggregation-inhibiting small molecules." Biochemistry **47**(16): 4651-4656.

Rausch, O. (2005). "Use of high-content analysis for compound screening and target selection." IDrugs **8**(7): 573-577.

Reiner, A., I. Dragatsis and P. Dietrich (2011). "Genetics and neuropathology of Huntington's disease." Int Rev Neurobiol **98**: 325-372.

Rezai-Zadeh, K., D. Shytle, N. Sun, T. Mori, H. Hou, D. Jeanniton, J. Ehrhart, K. Townsend, J. Zeng, D. Morgan, J. Hardy, T. Town and J. Tan (2005). "Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates amyloid precursor protein cleavage and reduces cerebral amyloidosis in Alzheimer transgenic mice." J Neurosci **25**(38): 8807-8814.

Rogaeva, E. (2002). "The solved and unsolved mysteries of the genetics of early-onset Alzheimer's disease." Neuromolecular Med **2**(1): 1-10.

Rojas, P., P. Montes, C. Rojas, N. Serrano-Garcia and J. C. Rojas-Castaneda (2012). "Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginko biloba extract 761, in an animal model of Parkinson's disease: therapeutic perspectives." Nutrition **28**(11-12): 1081-1088.

Rubilar, M., M. Pinelo, M. Ihl, E. Scheuermann, J. Sineiro and M. J. Nunez (2006). "Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols." J Agric Food Chem **54**(1): 59-64.

Rubinsztein, D. C., G. Marino and G. Kroemer (2011). "Autophagy and aging." Cell **146**(5): 682-695.

Sato, T., Y. Muroyama and T. Saito (2013). "Inducible gene expression in postmitotic neurons by an in vivo electroporation-based tetracycline system." J Neurosci Methods **214**(2): 170-176.

Savaskan, E., G. Olivieri, F. Meier, E. Seifritz, A. Wirz-Justice and F. Muller-Spahn (2003). "Red wine ingredient resveratrol protects from beta-amyloid neurotoxicity." Gerontology **49**(6): 380-383.

Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, C. Remesy and L. Jimenez (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases." Crit Rev Food Sci Nutr **45**(4): 287-306.

Schreckinger, M. E., J. Lotton, M. A. Lila and E. G. de Mejia (2010). "Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization." J Med Food **13**(2): 233-246.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens and P. H. St George-Hyslop (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-760.

Shibata, N., A. Hirano, M. Kobayashi, T. Siddique, H. X. Deng, W. Y. Hung, T. Kato and K. Asayama (1996). "Intense superoxide dismutase-1 immunoreactivity in intracytoplasmic hyaline inclusions of familial amyotrophic lateral sclerosis with posterior column involvement." J Neuropathol Exp Neurol **55**(4): 481-490.

Skovronsky, D. M., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2006). "Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications." Annu Rev Pathol **1**: 151-170.

Suwalsky, M., P. Orellana, M. Avello and F. Villena (2007). "Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes." Food Chem Toxicol **45**(1): 130-135.

Szulc, J., M. Wiznerowicz, M. O. Sauvain, D. Trono and P. Aebischer (2006). "A versatile tool for conditional gene expression and knockdown." Nat Methods **3**(2): 109-116.

Tanaka, M., Y. Machida, S. Niu, T. Ikeda, N. R. Jana, H. Doi, M. Kurosawa, M. Nekooki and N. Nukina (2004). "Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease." Nat Med **10**(2): 148-154.

Taylor, D. L., E. S. Woo and K. A. Giuliano (2001). "Real-time molecular and cellular analysis: the new frontier of drug discovery." Curr Opin Biotechnol **12**(1): 75-81.

Trippier, P. C., K. Jansen Labby, D. D. Hawker, J. J. Mataka and R. B. Silverman (2013). "Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers." J Med Chem **56**(8): 3121-3147.

Vassallo, N. J. o. (2008). "Polyphenols and Health: New and Recent Advances." Nova Science Publishers, Inc., New York.

Vidal, R., B. Caballero, A. Couve and C. Hetz (2011). "Converging pathways in the occurrence of endoplasmic reticulum (ER) stress in Huntington's disease." Curr Mol Med **11**(1): 1-12.

Vidal, R. L., A. Figueroa, F. A. Court, P. Thielen, C. Molina, C. Wirth, B. Caballero, R. Kiffin, J. Segura-Aguilar, A. M. Cuervo, L. H. Glimcher and C. Hetz (2012). "Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy." Hum Mol Genet **21**(10): 2245-2262.

Wakasa, K., R. Kawabata, S. Nakao, H. Hattori, K. Taguchi, J. Uchida, T. Yamanaka, Y. Maehara, M. Fukushima and S. Oda (2015). "Dynamic modulation of thymidylate synthase gene expression and Fluorouracil sensitivity in human colorectal cancer cells." PLoS One **10**(4): e0123076.

Wilkinson, K., J. D. Boyd, M. Glicksman, K. J. Moore and J. El Khoury (2011). "A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36." J Biol Chem **286**(40): 34914-34922.

Wollen, K. A. (2010). "Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners." Altern Med Rev **15**(3): 223-244.

Xie, J., A. Nair and T. W. Hermiston (2008). "A comparative study examining the cytotoxicity of inducible gene expression system ligands in different cell types." Toxicol In Vitro **22**(1): 261-266.

Xu, Z., E. Liu, C. Peng, Y. Li, Z. He, C. Zhao and J. Niu (2012). "Role of hypoxia-inducible-1alpha in hepatocellular carcinoma cells using a Tet-on inducible system to regulate its expression in vitro." Oncol Rep **27**(2): 573-578.

Yang, W. H., C. Yang, Y. Q. Xue, T. Lu, J. Reiser, L. R. Zhao and W. M. Duan (2013). "Regulated expression of lentivirus-mediated GDNF in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and its neuroprotection on dopaminergic cells in vitro." PLoS One **8**(5): e64389.

Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." J Biomol Screen **4**(2): 67-73.

Zhang, X., S. Chen, L. Song, Y. Tang, Y. Shen, L. Jia and W. Le (2014). "MTOR-independent, autophagic enhancer trehalose prolongs motor neuron survival and ameliorates the autophagic flux defect in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis." Autophagy **10**(4): 588-602.

Zhao, H., Q. Li, Z. Zhang, X. Pei, J. Wang and Y. Li (2009). "Long-term ginsenoside consumption prevents memory loss in aged SAMP8 mice by decreasing oxidative stress and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus." Brain Res **1256**: 111-122.

Zhu, M., S. Rajamani, J. Kaylor, S. Han, F. Zhou and A. L. Fink (2004). "The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of alpha-synuclein and disaggregates existing fibrils." J Biol Chem **279**(26): 26846-26857.