



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

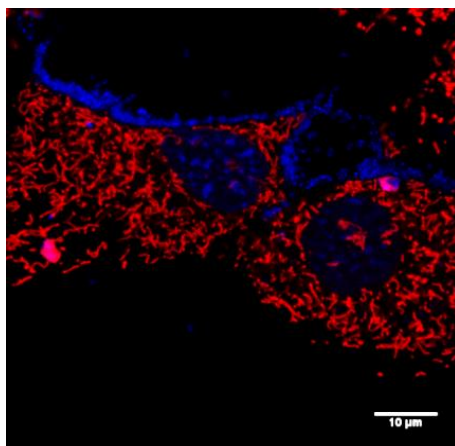


INSTITUTE
FOR RESEARCH
IN BIOMEDICINE

ESTUDIO DEL EFECTO DE DOS NUEVOS COMPUESTOS EN LA FUNCIÓN Y DINÁMICA MITOCONDRIAL

Patricia Urios Gutiérrez

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica Dra. Maria Montserrat Poblet (URV)

En cooperació amb Institut for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)

Supervisado por el Dr. David Sebastián Muñoz (IRB Barcelona)

Junio de 2022

ÍNDICE

1.	Datos del centro.....	3
2.	Resumen y palabras clave.....	4
3.	Introducción.....	5-13
	I. Esteatohepatitis no alcohólica (NASH o EHNA).....	5-6
	II. Características mitocondriales.....	6-8
	III. Dinámica mitocondrial.....	8-10
	- Fusión mitocondrial	
	- Fisión mitocondrial	
	IV. Mfn1 y Mfn2.....	10-12
	V. Trabajo realizado previamente.....	12-13
4.	Hipótesis y objetivos del trabajo.....	14
5.	Metodología.....	14-17
	a) Cultivos celulares.....	14-15
	b) Obtención de extractos proteicos celulares.....	16
	c) Cuantificación de extractos proteicos celulares.....	16-18
	d) Western Blot.....	18-22
	i. Preparación de geles.....	18-19
	ii. Preparación de muestras.....	19
	iii. Electroforesis.....	20
	iv. Transferencia.....	20-21
	v. Incubación anticuerpo primario.....	21
	vi. Incubación anticuerpo secundario.....	22
	vii. Revelado y cuantificación.....	22
	e) Ensayo de consumo de oxígeno de cultivos celulares.....	23-25
6.	Resultados y discusión.....	25-30
	- Efecto de los compuestos C4 y C5 en la expresión de proteínas de dinámica mitocondrial en células de hígado.....	25-28
	- Efecto de los compuestos C4 y C5 en la respiración mitocondrial en células de músculo.....	28-30
	- Análisis estadístico.....	30
7.	Conclusiones.....	31
8.	Bibliografía.....	32-33
9.	Autoevaluación.....	34

1. Datos del centro

Complex Metabolic Diseases and Mitochondria Research Group

Aging and Metabolism Program

Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona)

Parc Científic de Barcelona

C/ Baldiri Reixac 10

08028 Barcelona, España

2. Resumen

Varias enfermedades metabólicas como la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), presentan una predominancia de mitocondrias disfuncionales con una morfología fragmentada, debido a alteraciones en ciertas proteínas que intervienen en la dinámica mitocondrial.

La morfología, la calidad y la masa mitocondrial están determinadas por la fusión y fisión mitocondrial, la biogénesis y la mitofagia. La morfología mitocondrial está estrictamente relacionada con la funcionalidad del orgánulo; por ello, mutaciones o alteraciones en las proteínas de fusión y fisión (Mfn1, Mfn2, OPA1 y DRP1), provocan la incapacidad de mantener una función mitocondrial normal y ser capaces de adaptarse al estrés, provocando efectos patológicos.

Por esta razón y con la intención de encontrar un fármaco que pueda revertir los efectos de este tipo de alteraciones y usarse en estas enfermedades, pero más concretamente de NASH, en el laboratorio se han desarrollado dos nuevos compuestos (C4, C5) capaces de mejorar la morfología y la función mitocondrial en células de hígado humano. Sin embargo, no se ha estudiado aún si estos compuestos modulan la dinámica mitocondrial y si son efectivos en otros tipos celulares involucrados en enfermedades metabólicas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es indagar sobre el efecto de estos compuestos en la expresión de proteínas de dinámica mitocondrial y evaluar su efecto sobre la función mitocondrial en células de músculo.

Los resultados obtenidos muestran que tanto C4 como C5 aumentan la expresión de Mitofusina 2 (Mfn2) y OPA1 en células de hígado, y mejoran la función mitocondrial en células de músculo en situaciones de disfunción mitocondrial inducida por lipotoxicidad.

Palabras clave

Mitofusina 1, Mitofusina 2, respiración mitocondrial, fusión y fisión mitocondrial, morfología y estructura mitocondrial, NAFLD y NASH

3. Introducción

I. *Esteatohepatitis no alcohólica (NASH o EHNA)*

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) presenta un gran espectro clínico, que va desde la esteatosis simple y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH o EHNA), hasta la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC) (Mansouri, Gattolliat and Asselah, 2018).

Este estudio se centrará en la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que es una forma progresiva de la enfermedad NAFLD caracterizada por una inflamación crónica y una acumulación de grasa en el tejido hepático. NASH afecta a unos 35 millones de personas en todo el mundo, es la enfermedad hepática crónica más común en la población occidental y con un número de pacientes cada vez más elevado.

A pesar de esta necesidad clínica, aun no hay terapias aprobadas tanto por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), como por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Desafortunadamente, aún no se ha podido encontrar un fármaco, o combinación de fármacos capaces de superar las complejidades de esta enfermedad metabólica (Fraile *et al.*, 2021).

Durante las primeras etapas de esta enfermedad, los pacientes suelen mostrar pocos síntomas o inespecíficos, como cansancio, fatiga o dolor abdominal, por lo que el NASH no se diagnostica hasta etapas posteriores de la progresión de la enfermedad, haciendo uso de técnicas invasivas como la biopsia hepática. Debido a la falta de una prueba diagnóstica mínimamente invasiva y rentable, la prevalencia de esta enfermedad no puede estimarse con certeza. Incluso con un diagnóstico temprano, las personas que padecen esta enfermedad no pueden beneficiarse de una variedad de opciones de tratamiento que normalmente estarían disponibles en otras enfermedades, como la artritis reumatoide o algunos tipos de cáncer. Desafortunadamente, las modificaciones del estilo de vida, centradas en una dieta saludable y ejercicio, son las principales recomendaciones para los pacientes (Fraile *et al.*, 2021).

La enfermedad de NASH va acompañada de inflamación, muerte celular y fibrosis, y se caracteriza histológicamente por la presencia de hepatocitos en forma de balón y por una inflamación con o sin fibrosis perisinusoidal y esteatosis. En el curso del proceso inflamatorio, los hepatocitos mueren frecuentemente por apoptosis. Se cree que el ciclo continuo de inflamación y regeneración de hepatocitos aumenta el riesgo de mutaciones genéticas en los mismos, por lo que promueven la supervivencia y expansión de las células. Como resultado, se obtiene un mayor crecimiento celular que puede conducir al desarrollo de tumores (Mansouri, Gattolliat and Asselah, 2018).

Se sabe que hay varios factores que influyen en la progresión de NASH, como el estrés del retículo endoplásmico (RE), el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la lipotoxicidad. La función mitocondrial se rige por la conservación de una composición normal de lípidos, que depende de la capacidad de las mitocondrias para sintetizar fosfolípidos y del tráfico de lípidos desde el RE a las mitocondrias (Navaratnarajah *et al.*, 2021).

Estudios previos del grupo de investigación del Dr. Zorzano han demostrado la implicación de alteraciones mitocondriales con el desarrollo de NASH (Hernández-Álvarez *et al.*, Cell 2019). En concreto, la expresión de la proteína mitocondrial Mitofusina 2 (Mfn2) se encuentra disminuida en biopsias de hígado de pacientes con NASH y en modelos de NASH en ratón. Además, la re-expresión a niveles normales de esta proteína revierte el fenotipo de NASH en ratón. Mfn2 es una proteína de dinámica mitocondrial y que juega un papel relevante en el mantenimiento del metabolismo mitocondrial, la señalización de insulina y la homeostasis energética (Sebastián *et al.*, 2012). Por todo ello, nuestra hipótesis es que la activación de la función mitocondrial podría ser una diana terapéutica para el tratamiento de NASH.

II. Características mitocondriales

Las mitocondrias son unos orgánulos celulares que, a partir de un antepasado bacteriano, evolucionaron a través de un proceso endosimbiótico. Presentan ciertos caracteres típicos bacterianos, como una doble cadena de ADN

mitocondrial circular (ADNmt), proteínas N-formiladas y una doble membrana formada por la membrana mitocondrial externa (MOM), que delimita el espacio intermembrana, y una membrana mitocondrial interna (MIM), que delimita la matriz mitocondrial. El ADNmt codifica para 13 péptidos pertenecientes a los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (MRC), 22 ARN de transferencia (ARNt) y para 2 ARN ribosomales (ARNr) que permiten la traducción intra-mitocondrial. El resto de las proteínas mitocondriales, que están codificadas por el ADN nuclear (ADNn), se encuentran en el citoplasma y posteriormente son importadas a las mitocondrias (Mansouri, Gattolliat and Asselah, 2018).

Las mitocondrias intervienen en muchos procesos, son necesarias para la producción de energía, el metabolismo de las grasas, de aminoácidos y hierro, regulando las vías de señalización de estos procesos. Además, regulan la respuesta inmunitaria innata que controla la inflamación y otras enfermedades asociadas (Mansouri, Gattolliat and Asselah, 2018).

Las funciones esenciales de las mitocondrias han sido atribuidas gracias a su naturaleza dinámica única, que les permite migrar, fusionarse y dividirse constantemente y regular su forma, tamaño, número y función bioenergética. Los cambios de morfología y movimiento mitocondrial a través del citoesqueleto les permiten tener una comunicación activa y el intercambio de contenido entre ellas u otros orgánulos como el retículo endoplásmico (RE). Estas características les permiten satisfacer las demandas energéticas celulares, regular la entrada de Ca^{2+} y hacer frente al daño oxidativo (Chandhok, Lazarou and Neumann, 2018).

La morfología, la calidad y la masa mitocondrial están determinadas por la fusión y fisión mitocondrial, la biogénesis y la mitofagia. La morfología mitocondrial está estrictamente relacionada con la funcionalidad del orgánulo, ya que puede cambiar rápidamente en respuesta a ciertas condiciones celulares. Una morfología continua y fusionada está asociada a una mayor producción de adenosina trifosfato (ATP), cosa que permite promover la supervivencia celular. Por el contrario, una fragmentación mitocondrial se asocia a una respiración reducida, observada con frecuencia en células cancerosas (Navaratnarajah *et al.*, 2021).

En los últimos años se ha logrado avanzar significativamente en mejorar la comprensión de la dinámica mitocondrial, aunque aún queda un largo camino para lograr comprender totalmente este proceso tan complejo y así, poder dar con tratamientos para muchas enfermedades asociadas a alteraciones en la dinámica mitocondrial.

III. Dinámica mitocondrial

La fusión mitocondrial es única ya que, en comparación a otras fusiones intracelulares, involucra dos membranas, la MOM y la MIM, por lo que debe reorganizarse de manera coordinada para mantener la integridad del orgánulo. Brevemente, GTPasas como la Mfn1 y la Mfn2 son responsables de la fusión de la MOM, mientras que la proteína OPA1 media la fusión de la MIM (Sebastián, Palacín and Zorzano, 2017). La fisión mitocondrial esta mediada, en cambio, por una GTPasa citosólica llamada Drp1 que es reclutada a la MOM a través de la interacción con el factor de fusión mitocondrial (Mff), Mid51 y Mid49 (Filadi, Pendin and Pizzo, 2018), (Figura 1).

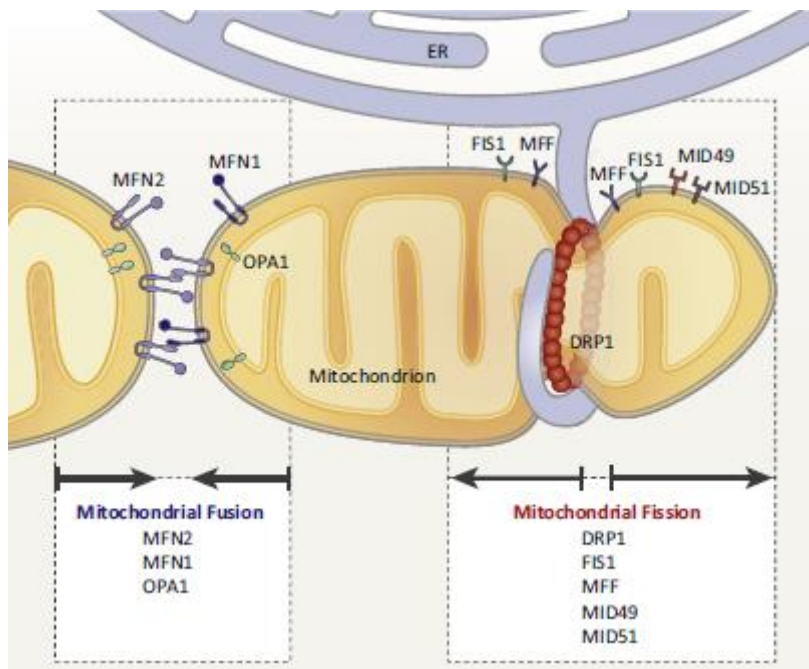


Figura 1. Proteínas que intervienen en la dinámica mitocondrial (Sebastián, Palacín and Zorzano, 2017).

- **Fusión mitocondrial**

La fusión mitocondrial es un proceso mediante el cual dos membranas mitocondriales, originalmente distintas, se fusionan físicamente en una sola. Este proceso permite el intercambio de contenido entre mitocondrias, permitiendo así a las mitocondrias defectuosas recuperar los componentes esenciales de la cadena respiratoria y el ADN mitocondrial (Navaratnarajah *et al.*, 2021).

Dado que las mitocondrias son orgánulos de doble membrana, es necesaria la fusión de ambas membranas, la externa y la interna. La fusión de la membrana externa esta mediada, como se ha comentado anteriormente, por las mitofusinas (Mfn1 y Mfn2), que son grandes GTPasas capaces de atravesar la membrana externa dos veces. Estas proteínas se presentan en complejos homooligoméricos (Mfn1-Mfn1 o Mfn2-Mfn2) y en complejos heterooligoméricos (Mfn1-Mfn2) en trans, entre mitocondrias opuestas. Antes de fusionarse las membranas, se promueve una curvatura de estas mediante la hidrólisis de la cardiolipina a ácido fosfatídico, un proceso mediado por la fosfatasa-D. Mutaciones en humanos de Mfn2, pero no de Mfn1, conducen a la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2^a, un trastorno degenerativo caracterizado por pérdidas progresivas tanto sensoriales como motoras de las extremidades (Chandhok, Lazarou and Neumann, 2018) y al desarrollo de lipodistrofia caracterizada por una hiperplasia del tejido adiposo en la parte superior del cuerpo (Rocha N *et al.*, Elife 2017).

La proteína requerida para la fusión de las membranas internas es la proteína de atrofia óptica 1 o OPA1. Es importante destacar que la fusión de la MIM parece depender del potencial de membrana mientras que la fusión de la MOM requiere altos niveles de GTP (Liu *et al.*, 2020). La proteína OPA1, además, participa en el mantenimiento de la forma de las crestas mitocondriales, por lo que tiene un efecto metabólico directo al estabilizar los supercomplejos de la cadena respiratoria. Alteraciones en uno o ambos procesos ocasionan una ceguera progresiva, un trastorno óptico causado por mutaciones en humanos en OPA1 (Chandhok, Lazarou and Neumann, 2018).

- ***Fisión mitocondrial***

La fisión mitocondrial es un proceso mediante el cual una sola mitocondria se divide en dos. Este proceso es necesario para la remodelación y reordenamiento de las redes mitocondriales, para tener un transporte mitocondrial adecuado, para facilitar la apoptosis y para la eliminación de mitocondrias disfuncionales (Chandhok, Lazarou and Neumann, 2018).

Para la fisión se requiere, como se ha dicho anteriormente, el reclutamiento de la proteína similar a la dinamina 1 o Drp1, una gran GTPasa relacionada con la dinamina del citoplasma (Liu *et al.*, 2020). Estas proteínas se asocian físicamente entre sí, formando estructuras curvas que envuelven todo el exterior de la superficie mitocondrial al contraerse y, posteriormente, usando la energía proveniente de la hidrólisis de GTP para “pellizcar” las mitocondrias. La proteína dinamina 2 juega un papel fundamental en este proceso ya que se ha demostrado que la fisión ocurre en dos pasos: primero, Drp1 proporciona una constricción parcial de la membrana mitocondrial y posteriormente, la unión y constricción por parte de Dinamina 2 permite la división del orgánulo en dos (Chandhok, Lazarou and Neumann, 2018).

IV. *Mfn1 y Mfn2*

Mfn1 y Mfn2 son dos proteínas homólogas pertenecientes a la gran familia de GTPasas mitocondriales transmembrana que fueron caracterizadas por primera vez en *Drosophila melanogaster* (Filadi, Pendin and Pizzo, 2018). Esta familia tiene homólogos desde la levadura hasta los humanos cuyas propiedades estructurales se han conservado entre diferentes especies, como podemos observar en la Figura 2. En particular, los mamíferos presentan un 80% de similitud en estas dos proteínas con las humanas (Filadi, Pendin and Pizzo, 2018).

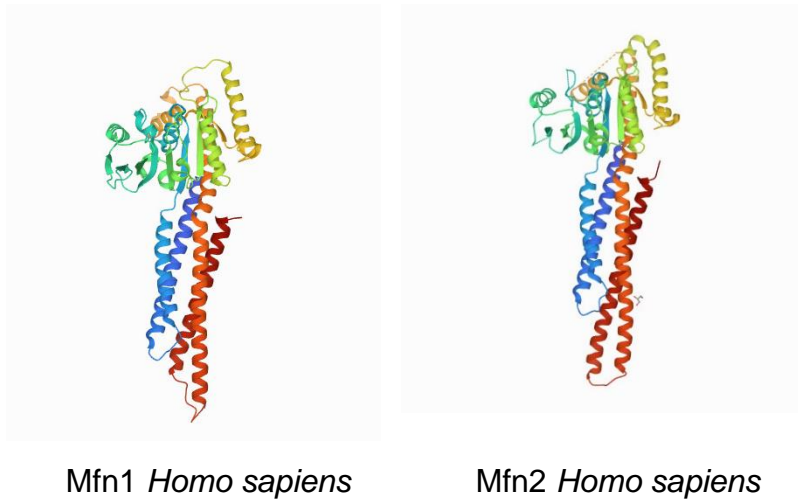


Figura 2. Representación estructural de las proteínas de dinámica mitocondrial Mfn1 y Mfn2 en Homo Sapiens (RCSB PDB - 6JFM: Mitofusina2 (MFN2)_T111D, no date).

Las mitofusinas presentan un gran dominio N-terminal seguido de un espaciador, un primer dominio HR1 (heptad-repeat), otro espaciador, dos dominios transmembrana (TM) que cruzan la MOM, otro espaciador y un segundo dominio HR2 (Figura 3). Concretamente, el dominio HR1 permite la fusión de las membranas externas mientras que el HR2 conduce a la oligomerización intramolecular en cis y a la interacción intermolecular en trans de las mitofusinas (Cohen and Tareste, 2018).

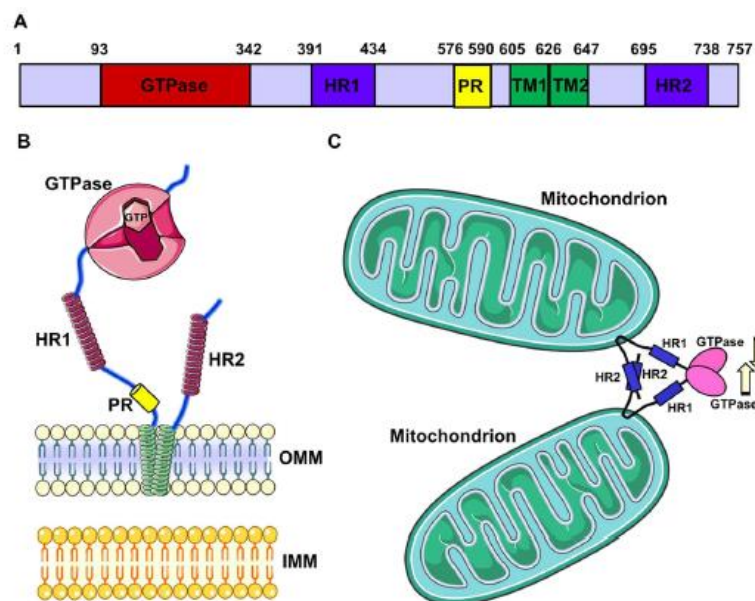


Figura 3. Estructura de la proteína Mfn2 (Filadi, Pendin and Pizzo, 2018).

Las proteínas Mfn1, Mfn2 , OPA1 y Drp1 son reguladores clave de la fusión y fisión mitocondrial (Sebastián, Palacín and Zorzano, 2017). Alteraciones en estos procesos pueden contribuir al desarrollo y progresión de enfermedades metabólicas y neurodegenerativas principalmente, por lo que una dinámica mitocondrial funcional es crucial para la homeostasis celular. Así, un correcto balance entre los procesos de fusión y fisión es clave para mantener un correcto metabolismo mitocondrial (Sebastián, Palacín and Zorzano, 2017).

V. Trabajo realizado previamente

Dada la estrecha relación entre la morfología y la función mitocondrial, y la implicación de alteraciones mitocondriales en el desarrollo de NASH y otras enfermedades metabólicas, en el laboratorio del Dr. Zorzano se realizó un screening fenotípico con el objetivo de encontrar compuestos capaces de promover la elongación y la función mitocondrial como posibles fármacos para combatir estas enfermedades. Tras este screening inicial, se obtuvo el compuesto RC, que mostró una gran capacidad de promover la elongación y la función mitocondrial en células MEF (fibroblastos embrionarios de ratón) deficientes en Mfn1, así como en modelos celulares de hígado y músculo con disfunción mitocondrial inducida por lipotoxicidad.

A raíz de este compuesto RC, y con el objetivo de ampliar la serie química, se obtuvieron análogos estructurales mediante estudios de relación estructura-actividad (SAR). A partir de estos nuevos compuestos, mediante screening en células KO para Mfn1, se vio que los más efectivos en inducir la elongación mitocondrial eran los compuestos C4 y C5. Con el objetivo de evaluar su eficacia en un modelo *in vitro* de NASH, se realizaron ensayos de respiración mitocondrial en células de hepatoma humano (células PLC) incubadas con palmitato. Este tratamiento se ha descrito que induce acumulación de lípidos, lipotoxicidad e inflamación, mimetizando gran parte de las alteraciones moleculares que ocurren durante el desarrollo de NASH (Ogawa *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos mostraron que tanto C4 como C5 eran altamente efectivos en mejorar la disfunción mitocondrial inducida por palmitato (tanto la respiración basal, como

la ligada a la producción de ATP), con unos valores de EC50 de aproximadamente 1 μ M; como se puede observar en la Figura 4.

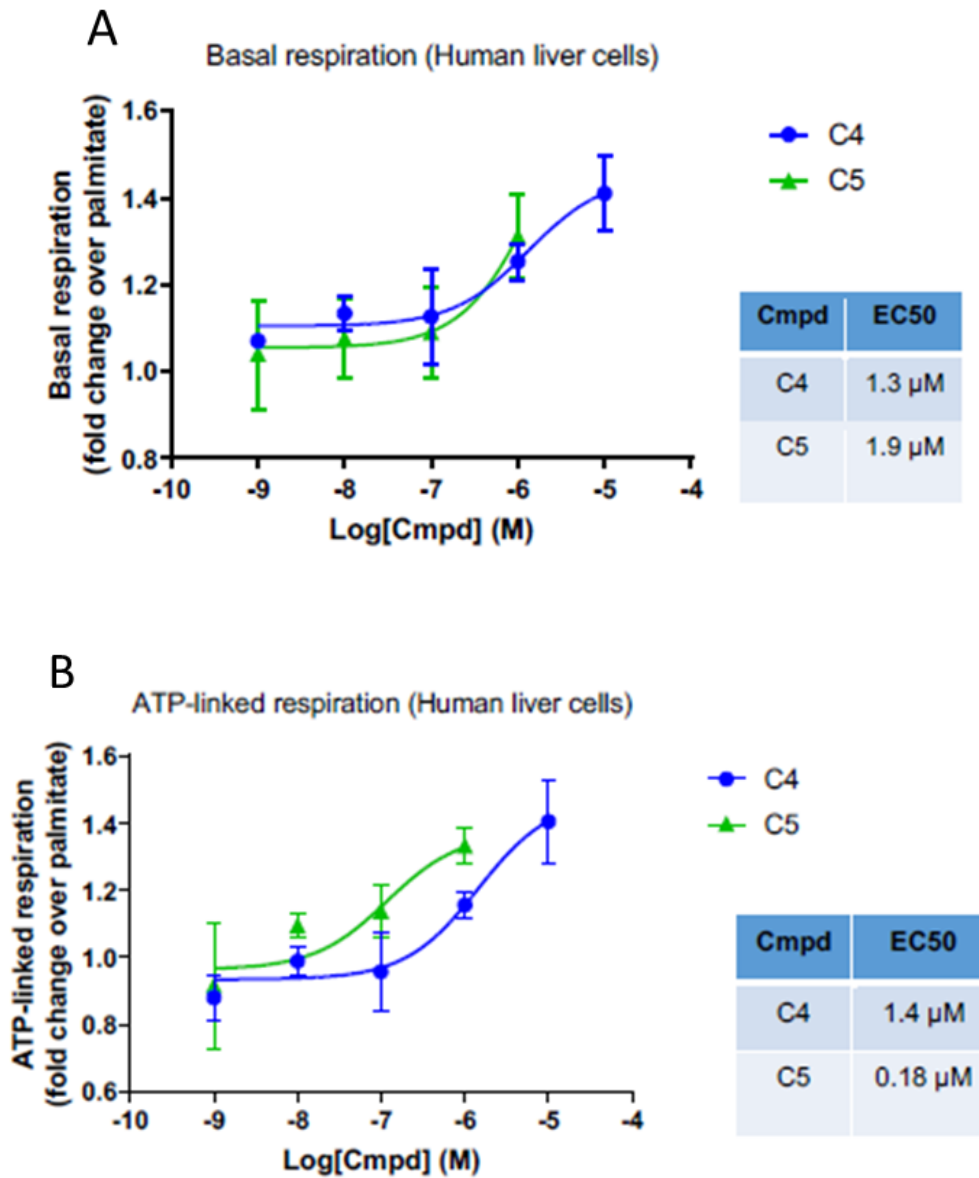


Figura 4. Curvas dosis-respuesta del efecto de C4 y C5 sobre la respiración mitocondrial en células PLC. Las células PLC se trataron con varias dosis de C4 que van desde 10 μ M a 1 nM y C5 de 1 μ M a 1 nM. La respiración basal y ligada a ATP fueron determinadas y representadas como 'fold change' respecto a la respiración en células tratadas con palmitato. Los valores de EC50 se muestran en la tabla (n=4). Figura obtenida del TFG de Pol Pérez.

4. Hipótesis y objetivos

Alteraciones en la morfología y función mitocondrial juegan un papel clave en el desarrollo de NASH, así como de otras enfermedades metabólicas. Por lo tanto, nuestra **hipótesis de trabajo es que la corrección de estas alteraciones mitocondriales podría constituir una posible diana terapéutica para el tratamiento de estas enfermedades**. En el laboratorio del Dr. Zorzano se ha trabajado intensamente en ello durante los últimos años, y actualmente cuentan con dos compuestos (C4 y C5) capaces de promover la función mitocondrial en modelos celulares de NASH.

A raíz de todos estos datos, el objetivo general de este TFG es indagar sobre los posibles mecanismos de acción de los compuestos C4 y C5, así como estudiar los efectos de estos en otros modelos celulares asociados a enfermedades metabólicas.

Los objetivos específicos son:

- Estudio del efecto de los compuestos C4 y C5 sobre la expresión de proteínas de dinámica mitocondrial en células PLC.
- Estudio del efecto de los compuestos C4 y C5 en la función mitocondrial en células musculares C2C12.

5. Metodología

a) Cultivos celulares

Se han utilizado dos líneas celulares, células humanas de hepatocarcinoma (PLC), y células C2C12, una línea celular de mioblastos de ratón inmortalizada. El medio de cultivo utilizado ha sido DMEM al 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Invitrogen) y Hepes 25 mM.

Para mantener las líneas celulares, se han colocado en la estufa a 37°C con una atmósfera humidificada a 5% CO₂/95% O₂.

Para la congelación de las líneas celulares a -80°C , se ha utilizado el mismo medio suplementado con el crioprotector Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%.

Para los diferentes ensayos, las células se dividen en cuatro grupos: células incubadas con BSA 0.05 mM y 0.1% DMSO como vehículo (grupo control), células tratadas con palmitato 0.25 mM y DMSO 0.1% (grupo palmitato), células tratadas con palmitato 0.25 mM y C4 a $1\ \mu\text{M}$ (grupo C4), y células tratadas con palmitato 0.25 mM y C5 a $1\ \mu\text{M}$ (grupo C5).

Preparación de palmitato 0.25 mM

El palmitato se ha utilizado en los diferentes ensayos ya que se ha descrito que induce una mayor inflamación en el hígado que cualquier otro ácido graso y mimetiza gran parte de las alteraciones moleculares que ocurren en el hepatocito durante el desarrollo de NASH (Ogawa *et al.*, 2018). De este modo se puede recrear una situación similar a la que tienen las células de pacientes con NASH, caracterizadas por la presencia de disfunción mitocondrial, un aumento de acumulación de grasa, un aumento del estrés oxidativo y lipotoxicidad.

Para la preparación de 10 mL de la solución de palmitato 0.25 mM, se ha seguido el siguiente protocolo:

- Se pesa 6.97 mg de palmitato en la balanza analítica
- Se disuelve el ácido graso con 1 mL de NaOH 0.1M
- Se calienta la mezcla a 80°C hasta que la solución sea transparente
- Por otro lado, se disuelve 0.325 g de BSA libre de ácidos grasos en 8 mL de NaCl 0.9%
- Se calienta la mezcla a 45°C durante 15 minutos
- Se añade, gota a gota, la solución de palmitato en la solución de BSA en agitación
- Se filtra la solución mediante una jeringa de 10 mL y un filtro de 0.45 micras
- Se realizan alícuotas de 1 mL y se congelan a -20°C

b) Obtención de extractos proteicos celulares

Con el objetivo de obtener extractos proteicos con los que posteriormente realizar un Western Blot, primero de todo, se siembra el cultivo celular en placas de 6 pocillos a una densidad de 900.000 células/pocillo, tanto de células PLC como C2C12. A las 24 h de la siembra, las células se incuban con palmitato y los diferentes compuestos durante 24 h. Pasado este tiempo, se retira el medio, se añade PBS para lavar las células y se añaden en cada pocillo 150 µL de tampón de lisis que contiene: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, inhibidores de fosfatasa (2 mM Ortovanadato de sodio, 50 mM NaF i 20 mM pirofosfato de sodio) e inhibidores de proteasas (una tableta complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail 04693159001 ROCHE per cada 10 mL de tampón). Se recoge el extracto mediante un raspado haciendo uso de una espátula y se transfieren a sus correspondientes tubos eppendorf.

A continuación, con una jeringuilla de 20G se homogeniza cada suspensión de células haciendo pasar el volumen 10 veces por la jeringa, para así romper las células. Posteriormente, se centrifugan los extractos durante 10 minutos a 4°C y 700 x g. Una vez terminado, se recoge el sobrenadante (donde tendremos las proteínas solubilizadas) y se recupera en nuevos tubos eppendorf. Por último, se cuantifica la concentración proteica de los extractos y se guardan a -20°C hasta su posterior uso.

c) Cuantificación de los extractos proteicos celulares

El kit de ensayo de proteínas Thermo Scientific Pierce BCA es compatible con agentes reductores y permite la cuantificación de la proteína total en muestras con una mínima interferencia de los agentes reductores de puentes disulfuro. El ensayo BCA se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino y la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva de la cuprosa catión usando el ácido bicinconínico (BCA).

Este ensayo también es compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos en presencia de un agente reductor de disulfuro. La purificación

de proteínas de membrana presenta desafíos inusuales para la cuantificación de proteínas, ya que estas proteínas a menudo requieren la presencia de detergentes y un agente reductor de disulfuro para mantener la solubilidad y la estabilidad. La doble compatibilidad de este kit permite a los investigadores determinar con mayor precisión la concentración de proteínas para dichas muestras.

Por todo ello, para cuantificar la cantidad de proteína obtenida en los extractos proteicos celulares, se utiliza el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* de ThermoFisher Scientific. Se utilizan placas de 96 pocillos y se define la recta patrón con una solución BSA de 1 mg/mL, añadiendo 0, 2.5, 5, 10 y 20 μL de BSA en los diferentes pocillos. A continuación, se añade por duplicado 2.5 μL de cada extracto en los diferentes pocillos, a los cuales se les añade 200 μL del reactivo (mezcla de 5 mL el reactivo A 50x con 100 μL del B), que también se añadirá a los pocillos correspondientes a la recta patrón. El resumen de este proceso se encuentra en la Figura 5.

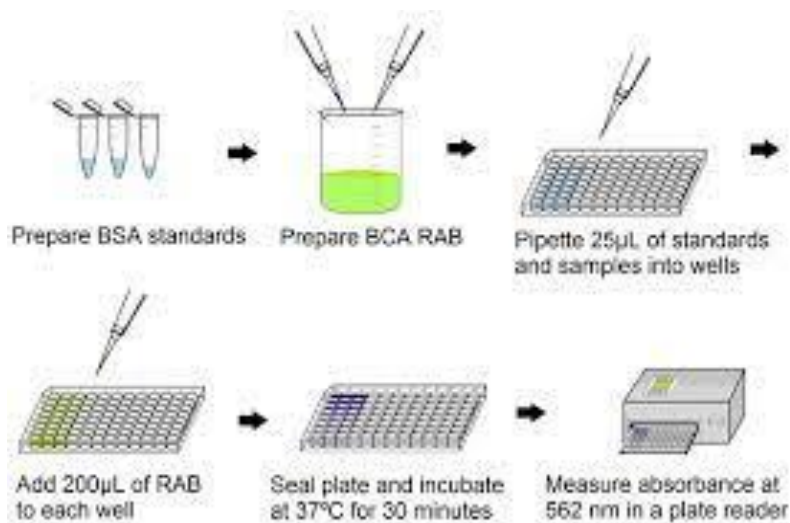


Figura 5. Protocolo utilizado para cuantificación de proteínas mediante el el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* de ThermoFisher Scientific (*Kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce™ compatible con agentes de reducción, no date*).

Finalmente, se incuba la placa en la estufa a 37°C durante 15 minutos y posteriormente, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm

mediante el espectrofotómetro *Tecan Sunrise 96-well Microplate Reader* y los datos se procesan en el *MagellanTM-Data analysis software*.

d) Western Blot

i. Preparación de geles

Para este ensayo se requiere preparar geles de acrilamida al 10%. Para ello, prepararemos dos soluciones, una que corresponderá al gel separador (10%) y la otra al gel apilador (6%).

Componentes	Gel separador (9 mL) 10%	Gel apilador (2.5 mL) 6%
Agua destilada	4.05 mL	1.7 mL
Acrilamida 30%	3 mL	0.5 mL
Tris-HCl 1.875M pH 8.8 4x	1.8 mL	
Tris-HCl 0.5M pH 6.4 4x		0.25 mL
SDS 10%	90 µL	25 µL
Persulfato de amonio 10%	30 µL	8.5 µL
TEMED	4.5 µL	2.5 µL

Tabla 1. Reactivos para realizar geles de acrilamida al 10%.

Para la preparación se sigue el siguiente proceso:

1. Se añaden las cantidades correspondientes de cada reactivo, dependiendo del número de geles que se quiera preparar, de gel separador.
2. Rápidamente, antes de que el gel polimerice, se vierte la solución en los cristales y se añade unas gotas de isopropanol para evitar que se formen irregularidades en el extremo superior del gel.
3. Mientras polimeriza el gel separador, se prepara la solución de gel apilador, pero sin añadir las dos últimas sustancias, el persulfato de amonio (APS) y el TEMED, ya que estas son las que provocan su polimerización.

4. Una vez polimerizado el gel separador, se eliminan los restos de isopropanol con un papel de filtro y se añaden el APS y el TEMED al gel apilador.
5. Se añade el gel apilador hasta rebosar por el cristal y se colocan los peines de 10 o 15 pocillos, dependiendo del número de las muestras que tengamos que cargar en el gel.
6. Por último, se deja polimerizar antes de ser utilizado.

ii. Preparación de muestras

A partir de los extractos proteicos obtenidos, tanto de células PLC como C2C12, prepararemos las muestras para cargarlas en los geles de acrilamida. Para ello, se debe haber cuantificado la cantidad de proteína presente de cada extracto para así poder realizar los cálculos pertinentes y cargar la cantidad de proteína de nuestro interés.

Generalmente, al tratarse de extractos celulares, queremos tener entre 20-30 μg de proteína por pocillo. Dependiendo del número de geles que queramos cargar, prepararemos una mayor o menor cantidad de muestra. La muestra se prepara con los extractos correspondientes, agua destilada y LSB 4x.

El LSB se mezcla con DTT, un agente reductor que romperá los puentes disulfuro de las proteínas y permitirá una mayor desnaturalización de éstas, diluyéndose 20 veces en el primero (1 mL LSB + 50 μL DTT), que contiene glicerol para dotar de mayor densidad a la muestra y de azul de bromofenol para poder seguirla mientras avanza en el gel.

Una vez añadidas las respectivas cantidades en cada eppendorf, se hierven las muestras durante 5 min a 95°C. Una vez hervidas, se procede a cargar la cantidad correspondiente en el gel.

iii. Electroforesis

Una vez preparados los geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida y de 1.5 mm de grosor, se colocan en el soporte y se añade 500 mL de tampón de electroforesis o "Running Buffer" 1x. A continuación, se retiran los peines y se procede a cargar los geles con las muestras correspondientes, además de 10 μ L del marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder de ThermoFisher Scientific™.

Una vez terminado, se conecta el sistema a la fuente de alimentación y realiza la electroforesis a 30 mA por gel, a amperaje constante durante aproximadamente 1h 30 minutos a temperatura ambiente.

iv. Transferencia

Una vez terminada la electroforesis, se apaga la fuente, se retira la tapa y se sacan los geles de los vidrios. Para realizar la transferencia, se utilizan membranas PVDF (8.5 cm x 5.5 cm), que previamente han de activarse con metanol. A continuación, se realiza el montaje de transferencia que corresponde a una esponja, dos papeles de filtro Whatman, el gel, la membrana, dos papeles Whatman más y otra esponja en cada soporte de transferencia o 'sándwich'. Se introducen los dos soportes en la cubeta; además de un recipiente de agua destilada congelada que evitará un calentamiento excesivo del sistema, tal y como se indica en la Figura 6.

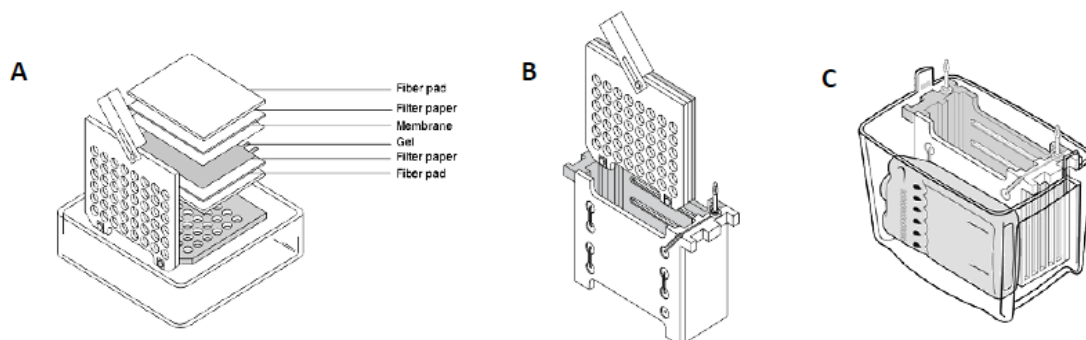


Figura 6. Montaje correspondiente a una transferencia de Western Blot.

Tanto el montaje del sándwich como el de la cubeta se realiza en contacto con tampón de transferencia o Transfer buffer (20% metanol).

Una vez montada, se añaden 800 mL del tampón, se conecta la cubeta a la fuente de alimentación y se corre a 250 mA, a amperaje constante durante 1 h 50 min a temperatura ambiente.

v. Incubación anticuerpo primario

Una vez terminada la transferencia, se obtienen las membranas PVDF transferidas de los soportes y se bloquean con una solución de PBS-Tween (0.1%) 5% de leche en polvo durante una hora en agitación a temperatura ambiente.

Posteriormente, se cortan las membranas, dependiendo del peso molecular de la proteína que se desea mirar, y se incuba el trozo correspondiente con su anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos:

Anticuerpo	Proveedor	Dilución	Disolvente	kDa	Origen
Actina	Sigma Aldrich	1/1000	PBS-T (0.1%) + Leche (5%)	45	Ratón
DRP1	BD Transduction Laboratories	1/1000	PBS-T (0.1%) + Leche (5%)	78-82	Ratón
P-DRP1	Cell Signaling	1/1000	PBS-T (0.1%) + Leche (5%)	78-82	Conejo
Mitofusina 1 (Mfn 1)	Santa Cruz Biotec	1/1000	PBS-T (0.1%) + Leche (5%)	82	Conejo
Mitofusina 2 (Mfn 2)	Abcam	1/1000	PBS-T (0.1%) + Leche (5%)	80	Ratón
OPA1	BD Transduction Laboratories	1/1000	PBS-T (0.1%) + Leche (5%)	80-100 varias bandas	Conejo

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de Western Blot.

vi. Incubación anticuerpo secundario

Al día siguiente, se retiran los trozos de membranas de los recipientes con los anticuerpos primarios y se realizan tres lavados con PBS-T de 10 minutos. Posteriormente, se incuban con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-conejo, anti-ratón), a una dilución 1/10000, a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora.

vii. Revelado y cuantificación proteica

Una vez terminada la incubación con el anticuerpo secundario, se realizan otros tres lavados con PBS-T y se procede al revelado. Se colocan las membranas en un recipiente y se añade 2 mL de reactivo de revelado por membrana y se deja actuar durante 1 minuto. La detección se ha realizado utilizando el reactivo de revelado Luminata™ Classico Western HRP Substrate, que dejándolo actuar un minuto, produce una quimioluminiscencia que queda impresa en los films fotográficos Fuji Super RX-N Blue Film 18x24 cm de Fujifilm.

En la cámara oscura, se expone los films a ciertos tiempos (5", 30", 1' y 3'). A menor cantidad de proteína cargada, mayor tiempo de exposición es necesario para ver la señal. El revelado de los films se realiza en un revelador automático HYPERPROCESSOR de GE Healthcare Life Sciences.

En el caso de que de una misma membrana se haya querido cuantificar más de una proteína y, por tanto, utilizar otro anticuerpo, se realiza un stripping. Para ello, se incuba la membrana durante 25 minutos utilizando Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) y posteriormente se realizan los lavados correspondientes con PBS-T. A continuación, se bloquea con PBS-Tween 5% leche y se incuban con el anticuerpo primario y secundario y se vuelve a revelar.

Finalmente, se han cuantificado con densitometría las diferentes proteínas usando el software Quantity One.

**e) Ensayo de consumo de oxígeno de un cultivo celular de C2C12
(XFe24 Extracellular Flux Assay, Seahorse)**

Esta técnica permite analizar el consumo de oxígeno y con ello la respiración mitocondrial. Para ello, se utiliza del Analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24.

El ensayo se ha realizado utilizando células C2C12, sembrando 50.000 células por pocillo en una placa de Seahorse Bioscience XF24, de 24 pocillos, a los cuales se les añadió 500 µL del medio correspondiente. Los grupos de células que se han formado han sido los mismos que en el Western Blot, el control con BSA, control con palmitato, C4 y palmitato y C5 y palmitato. Los compuestos se incuban 24 horas antes de realizar el análisis. El día antes del experimento se pone a hidratar el cartucho con los sensores de oxígeno, añadiendo 1 mL de XF Seahorse calibrant buffer en cada pocillo y se deja hidratando en una estufa libre de CO₂ durante toda la noche.

Al día siguiente, se retira el medio de la placa con células y se añaden 700 µL de medio de Seahorse a cada pocillo. Para preparar 25 mL de medio de Seahorse, es necesario añadirle: 137,5 µl de glucosa 1 M (concentración final 5,5 mM), 250 µl de piruvato de sodio 100 mM (concentración final 1 mM) y 250 µl de glutamina 200 mM (concentración final 2 mM). Una vez terminado, se deja incubando la placa durante 45 minutos en la estufa libre de CO₂.

En el tiempo en que se incuban las células, se preparan las soluciones de los diferentes compuestos que se introducirán en los diferentes puertos del cartucho y permitirán evaluar la función mitocondrial. A cada pocillo le corresponden cuatro puertos, que se usarán para inyectar: puerto 1, oligomicina 2,5 µM (inhibidor de la ATPsintasa y del complejo V); puertos 2 y 3: CCCP 1 µM (crea poros en la membrana mitocondrial interna y nos da el valor de respiración máxima); puerto 4: antimicina A 1 µM y rotenona 1 µM (inhibidor del complejo III y I respectivamente). De cada uno de los inhibidores se añade 75 µL en cada puerto (Figura 7).

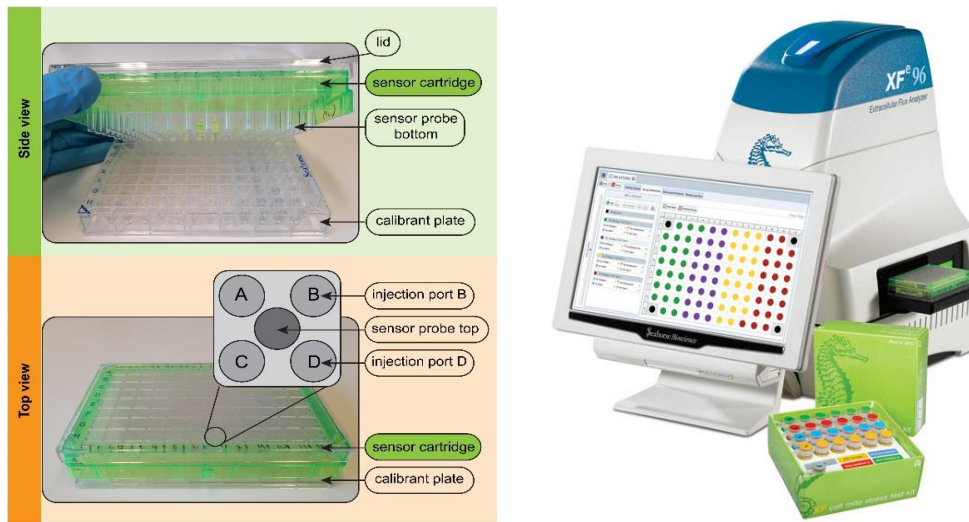


Figura 7. Esquema de los diferentes puertos pertenecientes al cartucho y el propio analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24.

Una vez cargados todos los puertos, se introduce el cartucho y la placa con la solución de calibración en el equipo para que se calibre (tarda unos 30 minutos) y una vez terminado, se retira la placa con la solución de calibración y se introduce la que contiene las células. La medición tardará unas 2 horas aproximadamente y nos dará los valores de OCR (Oxygen Consumption Rate), es decir, el consumo de oxígeno. El resumen de este proceso se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Protocolo de ensayo de consumo de oxígeno mediante el analizador de flujo extracelular Seahorse XFe24 (Technologies, no date).

Una vez terminado el ensayo, se procede a cuantificar las proteínas de cada pocillo para normalizar los valores obtenidos por cantidad de proteína. Para ello, se aspira el medio y se añade 100 µl en cada pocillo de tampón de lisis (NaOH 0.1N, SDS 10%), de los cuales 10 µl de cada uno se sembrarán en una placa de 96 pocillos. Además, se preparan los controles para la recta patrón, tal y como se ha explicado anteriormente en el apartado de extractos proteicos celulares, y se cuantifica la cantidad de proteína haciendo uso del kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante.

6. Resultados y discusión

- Efecto de los compuestos C4 y C5 en la expresión de proteínas de dinámica mitocondrial en células de hígado

Para evaluar si los efectos C4 y C5 sobre la respiración mitocondrial están relacionados con un posible efecto sobre la dinámica mitocondrial, se han realizado ensayos de Western Blot en los cuales se ha determinado el efecto de los compuestos sobre la expresión de proteínas de dinámica mitocondrial: Mfn1, Mfn2, OPA1, DRP1 y P-DRP1.

Como se ha mencionado anteriormente, Mfn1, Mfn2 y OPA1 intervienen en el proceso de fusión mitocondrial; mientras que la proteína DRP1 interviene en la fisión mitocondrial.

La proteína de fisión mitocondrial DRP1 es citosólica y tras su fosforilación en la serina 616 se transloca a la mitocondria para inducir fisión mitocondrial. Esta fosforilación se ha observado que conduce a una disfunción mitocondrial al aumentar los mecanismos de fisión (Roe and Qi, 2018); por lo que sería interesante observar también si estos compuestos afectan a los niveles de fosforilación de DRP1.

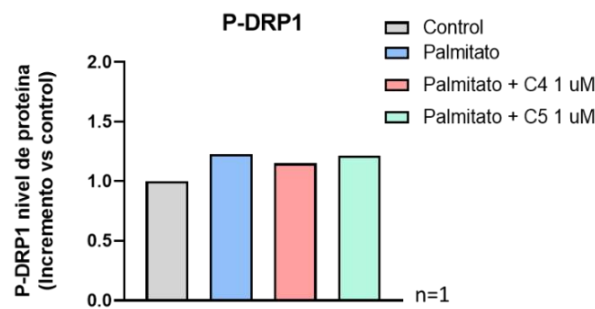
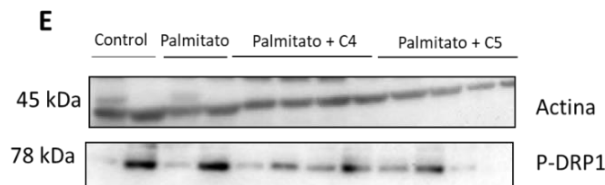
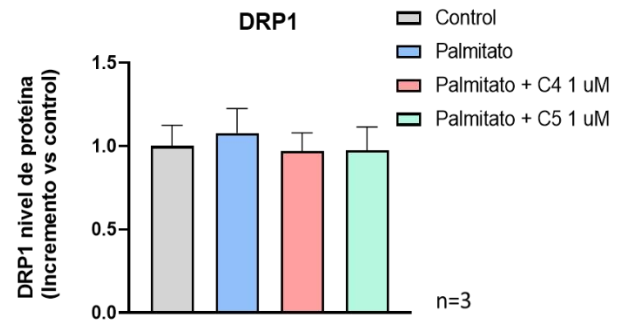
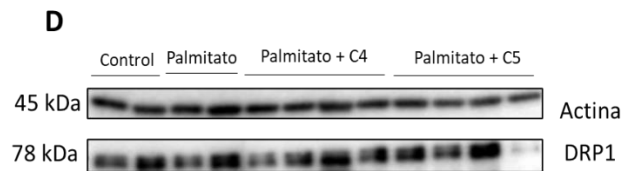
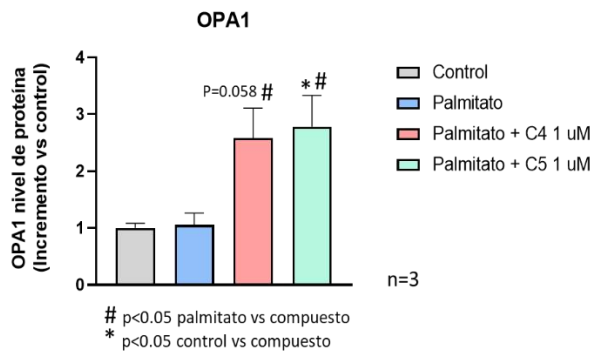
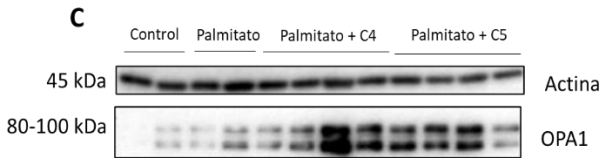
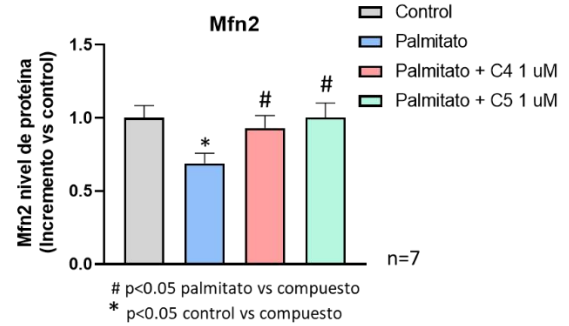
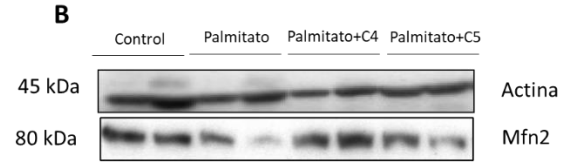
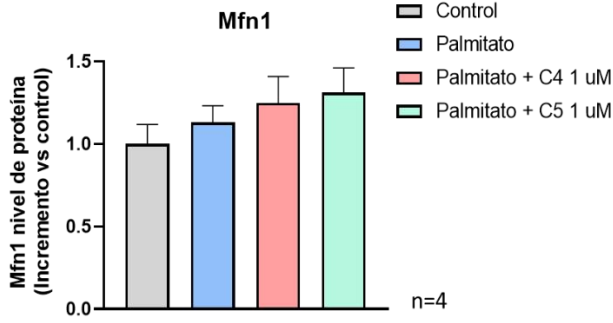
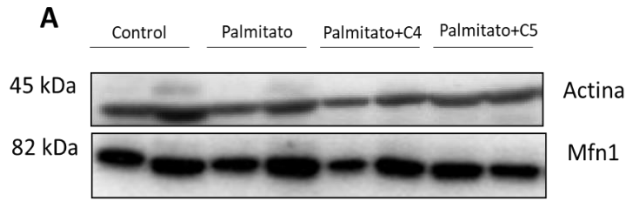


Figura 9. Cuantificación de Mfn1 (A), Mfn2 (B), OPA1 (C), DRP1 (D) y p-Ser616 DRP1 (E) en células PLC. Las células han sido tratadas con BSA 0.05 mM (control), con palmitato 2.5 mM, con palmitato y C4 1 μ M y con palmitato y C5 1 μ M durante 24 horas. Los datos han sido representados mediante la media \pm SEM (excepto en el caso de la proteína P-DRP1). # $p < 0.05$ palmitato vs compuesto; * $p < 0.05$ control vs compuesto.

Por un lado, como podemos observar en la Figura 9B, el palmitato ha sido el causante de una disminución en la expresión de Mfn2; pero no disminuye la expresión de ninguna otra proteína.

Por otro lado, los compuestos C4 y C5 han sido capaces de aumentar la expresión de las proteínas Mfn2 y OPA1, como se puede observar en las Figuras 9B y 9C.

Para el resto de las proteínas (Mfn1, DRP1 y P-DRP1), no se observa ningún efecto en el nivel de expresión proteica por parte del palmitato ni de los compuestos. Respecto a la proteína P-DRP1, solo se ha llevado a cabo un ensayo, por lo que sería de interés realizar más y obtener más resultados y ver realmente si los compuestos afectan a los niveles de fosforilación de DRP1.

A partir de los datos obtenidos, podemos sugerir que, probablemente, la disfunción mitocondrial originada en células PLC tratadas con palmitato (modelo *in vitro* de NASH) y observada en estudios anteriores viene causada por una disminución en los niveles de expresión de Mfn2. Además, estos datos sugieren que la acción de C4 y C5 restaurando la función mitocondrial en células PLC tratadas con palmitato observada previamente, podría estar mediada por el incremento en la expresión de Mfn2 originada por estos compuestos.

En perspectiva de futuro, sería necesario realizar más estudios, tanto para estudiar el mecanismo de acción de los compuestos, como para comprobar que dosis de los compuestos es más efectiva. Además, se deberían realizar modelos *in vitro* de otras líneas celulares, como pueden ser las C2C12, y observar si los compuestos producen algún efecto en ellas. También, se deberían de probar los compuestos C4 y C5 en un modelo *in vivo*, para así probar si los efectos positivos en revertir la disfunción mitocondrial se observan también en un modelo más complejo, y no solo en un modelo celular simple.

- ***Efecto de los compuestos C4 y C5 en la respiración mitocondrial en células de músculo***

Para analizar el efecto de los compuestos seleccionados C4 y C5 sobre la función mitocondrial en otro modelo distinto al previamente observado por el laboratorio (células de hígado), se realizaron ensayos de respiración mitocondrial utilizando el analizador de flujo extracelular (Seahorse, Agilent). Este ensayo se ha llevado a cabo en un modelo de disfunción mitocondrial inducida por palmitato en células musculares C2C12, como ya se ha comentado anteriormente. En este experimento, se ha analizado la respiración mitocondrial midiendo la tasa de consumo de oxígeno (OCR) y diferentes parámetros: respiración basal, Leak, respiración ligada a la producción de ATP (ATP-linked) y capacidad respiratoria máxima.

En el ensayo de consumo de oxígeno, primero se mide el valor basal del OCR celular, a partir del cual se puede calcular la respiración basal. A continuación, se añade la oligomicina, inhibidor de la ATP sintasa, que nos da el consumo de oxígeno no acoplado a la síntesis de ATP (Leak). Si este valor de OCR se le resta al valor de la respiración basal, se obtiene la respiración ligada a la producción de ATP (ATP-linked). Después, se añade el CCCP, un agente que permeabiliza la membrana mitocondrial interna y permite el flujo de protones a través de ésta, por lo que se obtiene una tasa máxima de la cadena de transporte de electrones. Por último, se añade la rotenona y la antimicina A, inhibidores del complejo I y III respectivamente, por lo que bloquean la cadena de transporte electrónico y gracias a los cuales se obtienen los valores correspondientes a la respiración no mitocondrial. Este valor se resta del resto de valores para poder obtener todos los datos de respiración mitocondrial descritos anteriormente (Figura 10).

Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile Mitochondrial Respiration

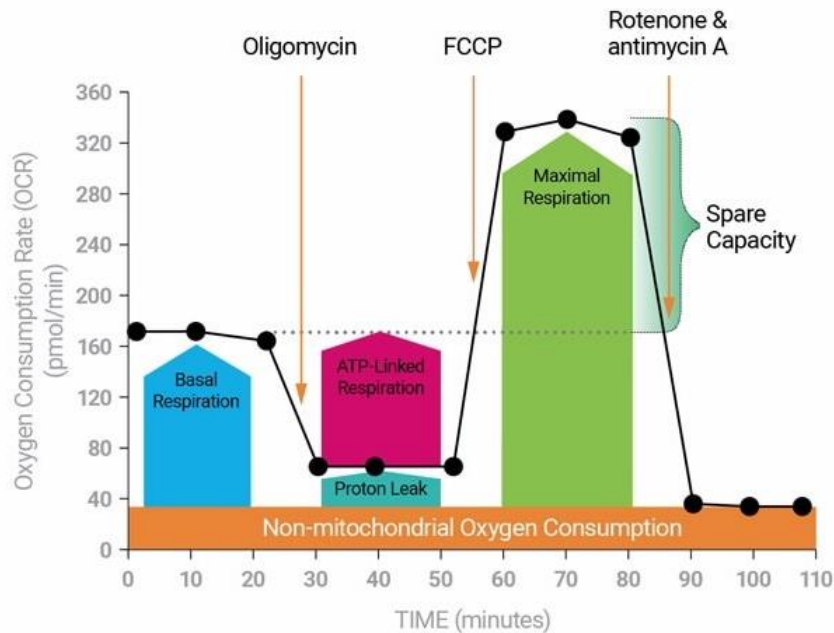


Figura 10. Perfil del ensayo de consumo de oxígeno Seahorse XF Cell MitoStress.

Mediante el uso de esta técnica se ha evaluado el efecto de los compuestos C4 y C5 sobre la función mitocondrial en células musculares C2C12 incubadas con palmitato. Tal y como puede observarse en la Figura 11, el tratamiento con palmitato indujo una disfunción mitocondrial en las células C2C12, caracterizada por una disminución en los valores de consumo de oxígeno. Mediante el análisis estadístico ANOVA de dos vías se ha determinado que el efecto del palmitato es significativo estadísticamente respecto el grupo control ($p < 0.0001$). El C4 muestra una tendencia a aumentar la respiración mitocondrial respecto el grupo con palmitato ($p = 0.08$) y el C5 lo hace de manera significativa ($p = 0.015$). Así, estos resultados indican que ambos compuestos son capaces de revertir la disfunción mitocondrial causada por palmitato en estas células, de manera similar a lo observado anteriormente para las células PLC. Sin embargo, aunque ambos compuestos rescatan la disfunción mitocondrial, sería necesario utilizar más dosis para acabar de caracterizar su potencia en estas células.

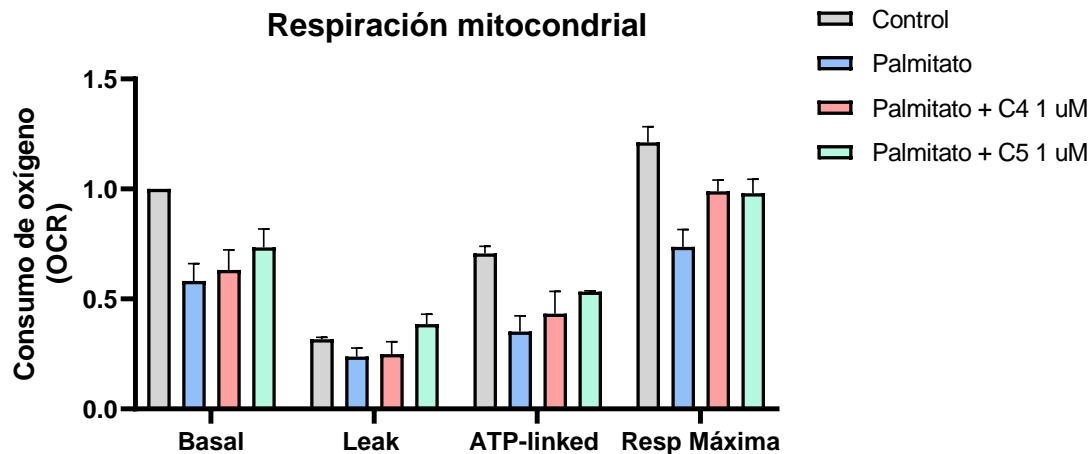


Figura 11. Efecto de los compuestos C4 y C5 en el consumo de oxígeno mitocondrial en células C2C12. Las células han sido tratadas con BSA 0.05 mM (control), con palmitato 2.5 mM, con palmitato y C4 1 μ M y con palmitato y C5 1 μ M durante 24 horas (n=4). Los datos han sido representados mediante la media \pm SEM; y han sido normalizados frente al control basal.

- **Análisis estadístico**

Los datos presentados en este trabajo han sido analizados usando la prueba de T de student o realizando un análisis de varianza (ANOVA). Los datos se han representado como la media \pm SEM a menos que se indique lo contrario. La significancia de los resultados obtenidos se ha establecido a $p < 0.05$.

En el análisis estadístico realizado para los valores de la Figura 9B, podemos ver que hay una diferencia significativa del C5 y el C4 frente al palmitato y, además, una diferencia significativa del palmitato frente al control

Como podemos observar en la Figura 9C, el C4 presenta un aumento significativo de la expresión de OPA1 respecto al palmitato y una tendencia a aumentar respecto al grupo control. En cambio, el C5 aumenta significativamente la expresión de esta proteína, tanto frente al control con BSA como frente al control con palmitato.

7. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en el proyecto han sido las siguientes:

- El C5 es capaz de rescatar de manera significativa la disfunción mitocondrial originada por el palmitato en células de músculo C2C12.
- Tanto el C4 como el C5 son capaces de restaurar los niveles disminuidos de Mfn2 en células tratadas con palmitato.
- El incremento de la expresión de Mfn2 por parte de ambos compuestos en células PLC podría explicar parte de los efectos de estos compuestos sobre la mejora de la función y morfología mitocondrial observada en estas células.
- Aunque el palmitato por sí solo no tiene efecto sobre los niveles de OPA1 en células PLC, el compuesto C4 y C5 aumentan sus niveles en células tratadas con palmitato.

8. Bibliografía

Chandhok, G., Lazarou, M. and Neumann, B. (2018) 'Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease', *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. Biol Rev Camb Philos Soc, 93(2), pp. 933–949. doi: 10.1111/BRV.12378.

Cohen, M. M. and Taresté, D. (2018) 'Open Peer Review Recent insights into the structure and function of Mitofusins in mitochondrial fusion [version 1; referees: 2 approved]'. doi: 10.12688/f1000research.16629.1.

Filadi, R., Pendin, Di. and Pizzo, P. (2018) 'Mitofusin 2: from functions to disease', *Cell death & disease*. Cell Death Dis, 9(3). doi: 10.1038/S41419-017-0023-6.

Fraile, J. M. *et al.* (2021) 'Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) - A Review of a Crowded Clinical Landscape, Driven by a Complex Disease', *Drug design, development and therapy*. Drug Des Devel Ther, 15, pp. 3997–4009. doi: 10.2147/DDDT.S315724.

Kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce™ compatible con agentes de reducción (no date). Available at: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23250> (Accessed: 25 May 2022).

Liu, Y. J. *et al.* (2020) 'Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease', *Mechanisms of ageing and development*. Mech Ageing Dev, 186. doi: 10.1016/J.MAD.2020.111212.

Mansouri, A., Gattolliat, C. H. and Asselah, T. (2018) 'Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases', *Gastroenterology*. Gastroenterology, 155(3), pp. 629–647. doi: 10.1053/J.GASTRO.2018.06.083.

Navaratnarajah, T. *et al.* (2021) 'The relevance of mitochondrial morphology for human disease', *The international journal of biochemistry & cell biology*. Int J Biochem Cell Biol, 134. doi: 10.1016/J.BIOCEL.2021.105951.

Ogawa, Y. *et al.* (2018) 'Palmitate-induced lipotoxicity is crucial for the

pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in cooperation with gut-derived endotoxin', *Scientific reports*. Sci Rep, 8(1). doi: 10.1038/S41598-018-29735-6.

RCSB PDB - 6JFM: *Mitofusina2 (MFN2)_T111D* (no date). Available at: <https://www.rcsb.org/structure/6JFM> (Accessed: 25 May 2022).

Roe, A. J. and Qi, X. (2018) 'Drp1 phosphorylation by MAPK1 causes mitochondrial dysfunction in cell culture model of Huntington's disease', *Biochemical and biophysical research communications*. NIH Public Access, 496(2), p. 706. doi: 10.1016/J.BBRC.2018.01.114.

Sebastián, D. *et al.* (2012) 'Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Proc Natl Acad Sci U S A, 109(14), pp. 5523–5528. doi: 10.1073/PNAS.1108220109.

Sebastián, D., Palacín, M. and Zorzano, A. (2017) 'Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging', *Trends in molecular medicine*. Trends Mol Med, 23(3), pp. 201–215. doi: 10.1016/J.MOLMED.2017.01.003.

Technologies, A. (no date) 'Agilent Technologies Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit User Guide □ Kit 103015-100'.

9. Autoevaluación


La estancia de prácticas que he realizado en el laboratorio del Dr. Antonio Zorzano ha sido increíble. Tenía muchas ganas de ver lo que realmente era un laboratorio de investigación, el día a día de los investigadores, como se organizaban y trabajaban. Me ha sorprendido gratamente el ambiente, tanto del laboratorio como el del IRB, y las diferentes reuniones periódicas que se realizan para hacer saber al resto los avances que se van obteniendo.

He podido aprender cómo se trabaja en un laboratorio, además de las diferentes técnicas que he podido aprender durante los meses de mi estancia, que han sido fantásticos.

Durante estas prácticas, además de aprender diferentes técnicas, he aprendido a ser más autónoma y, por tanto, he podido desarrollar un crecimiento personal que me será muy útil en un futuro. Por ello, me gustaría agradecer el apoyo recibido por parte del Dr. Antonio Zorzano, por acogerme y brindarme la oportunidad de ver un ambiente científico por primera vez. Por otro lado, a la Dra. Andrea del Campo, por animarme siempre a seguir adelante, aconsejarme y ayudarme. Y, por último, gracias al Dr. David Sebastián por mostrarme su pasión por la ciencia, por enseñarme que no siempre salen las cosas como uno quiere, y que para la ciencia hay que tener paciencia, constancia y perseverancia.

Yo, Patricia Urios Gutiérrez, con DNI 20916191Z, soy concedora de la guía de prevención de plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio de 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio para la URV.

Tarragona, 03 de julio de 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Patricia Urios', with a stylized flourish above the name.