



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

“EFECTO DE LA ASTAXANTINA SOBRE NLRP3 Y LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES, EN UNA LÍNEA HIPOCAMPAL DE RATÓN.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en
Biología Celular y Molecular

Camila Uribe Tapia

Director de Tesis: Pablo Muñoz Carvajal

Codirector de Tesis: Álvaro Ardiles Araya

MARZO / 2024



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

“EFECTO DE LA ASTAXANTINA EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y LA NEUROINFLAMACIÓN, EN UNA LÍNEA CELULAR INMORTALIZADA DE HIPOCAMPO DE RATÓN.”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en
Biología Celular y Molecular

Camila Uribe Tapia

Director de Tesis: Pablo Muñoz Carvajal

Codirector de Tesis: Álvaro Ardiles Araya

MARZO / 2024



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

**“EFECTO DE LA ASTAXANTINA EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y
LA NEUROINFLAMACIÓN, EN UNA LÍNEA CELULAR
INMORTALIZADA DE HIPOCAMPO DE RATÓN.”**

Camila Uribe Tapia

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Pablo Muñoz Carvajal en el laboratorio de Laboratorio de plasticidad neuronal de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Juan Villena
Presidente Comisión

Dr. José Bucarey
Profesor Informante

Dr. Andrea Lima
Profesor Informante

Dr. Pablo Muñoz
Director de Tesis

**Viña del mar, Chile
2024**

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres, Angelica Tapia y Orlando Uribe por su apoyo incondicional, brindándome inspiración y motivación en todo este periodo, como siempre lo han hecho. Mencionar también a mis hermanos Belén Uribe y Orlando Uribe, que con esfuerzo y perseverancia se puede cumplir todo lo que te propones. Agradecer a mi pareja Nicolas Silva, por ser mi compañero incondicional en la vida, como en la ciencia.

Finalmente, pero no menos importante a mi tutor, el Dr. Pablo Muñoz y a mi co-tutor, el Dr. Álvaro Ardiles por su dedicación, conocimiento, experiencia y apoyo en cada paso de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a las siguientes personas que hicieron posible la realización de mi tesis:

Me gustaría comenzar con el Dr. Pablo Muñoz como tutor de tesis, quien estuvo presente en todo este proceso, con gran dedicación y profesionalismo, transmitiéndome habilidades y conocimientos que fueron fundamentales en el desarrollo de mi tesis. Agradecer a mi co-tutor, el Dr. Álvaro Ardiles por su apoyo constante y respaldo en cada paso. Asimismo, agradezco al Dr. Claudio Córdoba por su buena disposición y ayuda en el análisis de imágenes y estadísticos.

Por último, agradezco a los revisores de mi tesis, los Dres. Andrea Paula Lima, Juan Villena y José Bucarey, por su valioso tiempo y comentarios, que me ayudaron a mejorar continuamente en este trabajo.

En resumen, gracias a la valiosa contribución de cada uno de ustedes que hizo posible esto, su dedicación, sabiduría y experiencia han sido invaluable para mí.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPA: Receptores de ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol

ASX: Astaxantina

BSA: Albumina sérica bovina

Ca₂₊: Calcio

DAMP: Patrones moleculares asociados al daño

DMEM: Dulbeccos Modified Eagles Medium

Drp-1: Proteína 1 relacionada con dinamina

Dyn2: Dinamina 2

EA: Enfermedad de Alzheimer

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EP: Enfermedad de Parkinson

Fis 1: fisión mitocondrial 1

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IFN: Interferones

IL: Interleucinas

iNOS: Óxido nítrico sintasa

KA: Receptores de kainato

LPS: Liposacaridos

LRR: Región de repetición rica en leucina

Mfn1 y Mfn2: Mitofusina 1 y Mitofusina 2

MT: Mitotracker

MTT: Bromuro de

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NF-KB: Factor nuclear kappa B

NLRP3: Criopirina

NMDAR: Receptor NMDA

NOD: Factores de nodulación

Opa1: Atrofia óptica 1

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Buffer salino fosfato

PFA: Paraformaldehido

PGC-1a: Coactivador 1 alfa

RE: Retículo endoplasmático

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SNC: Sistema nervioso central

TNF-a: Factor de necrosis tumoral

Índice

Dedicatoria.....	2
Agradecimientos.....	3
Resumen.....	4
Abreviaturas.....	5
Índice.....	7
Resumen.....	8
Introducción.....	9
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Metodología.....	20
Materiales.....	20
Cultivos celulares HT22.....	20
Tratamientos ASX y H ₂ O ₂	20
Ensayo colorimétrico MTT para viabilidad celular.....	21
Ensayo colorimétrico mitotracker.....	22
Técnica inmunofluorescencia para detección de antígenos.....	23
Obtención imágenes por microscopia confocal.....	24
Análisis estadístico.....	24
Resultados.....	25
Discusión.....	33
Conclusión.....	36
Bibliografía.....	37

RESUMEN

La astaxantina (ASX) es un pigmento carotenoide antioxidante y neuroprotector que puede atravesar la barrera hematoencefálica, previniendo la formación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), la sobrecarga de calcio y la disfunción mitocondrial en distintos modelos celulares de excitotoxicidad y enfermedades neurodegenerativas. Estudios previos han mostrado que la ASX mejora la función mitocondrial disminuyendo la muerte celular en modelos celulares de estrés oxidativo; y en ratas envejecidas, datos no publicados de nuestro laboratorio muestran que ASX disminuye la translocación nuclear del factor nuclear κB (NF- κB) sugiriendo que la ASX puede actuar como un agente antiinflamatorio. En este trabajo estudiamos el efecto de la ASX a nivel mitocondrial y en la respuesta inflamatoria usando un modelo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células inmortalizadas de hipocampo HT22. Encontramos que el peróxido disminuyó la función mitocondrial medida por el ensayo de MTT, lo que fue asociado a un mayor número de objetos de volumen pequeño determinados con Mitotracker e ImageJ, sugiriendo que el peróxido induce fragmentación mitocondrial. El peróxido indujo también la expresión de un componente clave del inflamosoma como es la proteína NLRP3, sugiriendo la activación de la respuesta inflamatoria celular. La incubación con ASX mejoró la función mitocondrial y disminuyó el número de mitocondrias y la expresión de NLRP3 en células HT22 tratadas con peróxido. De manera interesante, la sola incubación con ASX produjo un aumento en el número de mitocondrias, pero de volumen similar a los controles, sugiriendo que ASX induce biogenesis mitocondrial.

PALABRAS CLAVE.

HT22 - Toxicidad – NLRP3 - Mitocondria – Función mitocondrial

INTRODUCCIÓN

1. Excitotoxicidad y toxicidad

Los trastornos neurológicos y psiquiátricos son los principales contribuyentes a la carga mundial de morbilidad y tienen un grave impacto en la calidad de vida tanto de los pacientes como de sus familiares. Aunque los eventos moleculares que subyacen a estas enfermedades heterogéneas siguen sin comprenderse bien, algunos estudios han planteado la idea de estudiar mecanismos comunes involucrados [1]. Se ha sugerido que la excitotoxicidad, las especies reactivas de oxígeno (ROS), la neuroinflamación y la disfunción mitocondrial es el mecanismo convergente final involucrado en varios trastornos neurológicos como la epilepsia, la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otros [2,3].

La muerte de las células neuronales y gliales después de un trauma mecánico, como lesión primaria, inicia una cascada progresiva de daños (denominada lesión secundaria) caracterizada por isquemia, hemorragia, edema, inflamación, aumento de radicales libres, peroxidación lipídica, excitotoxicidad por glutamato y disfunción mitocondrial [4].

Durante la excitotoxicidad, la sobreactivación de los receptores de glutamato ionotrópicos controlados por ligandos en las neuronas glutamatérgicas conduce a la entrada excesiva de calcio (Ca^{2+}) desde el espacio extracelular hacia la célula, lo que provoca toxicidad neuronal, desencadenando una regulación ascendente de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), disfunción de las mitocondrias, producción de ROS, estrés del retículo endoplasmático (RE), liberación de enzimas lisosomales y el inicio de la señalización apoptótica [5,6,7].

El glutamato es el neurotransmisor más comúnmente involucrado en el sistema nervioso central de los mamíferos y actúa para mediar en la neurotransmisión excitatoria. Sin embargo, la liberación glutamatérgica excesiva provoca excitotoxicidad,

lo que contribuye a la muerte de las células neuronales [4]. El glutamato se une a receptores ionotrópicos permeables al calcio llamados receptores de N -metil- D -aspartato (NMDAR), receptores de ácido propiónico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), receptores de Kainato (KA), y así como receptores de tipo metabotrópico de glutamato (mGluR) [8,9].

Hay que destacar, que el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), sobregeneradas durante el proceso de estrés oxidativo, da como resultado la muerte neuronal progresiva en una variedad de regiones del cerebro, particularmente el hipocampo, la corteza y la sustancia negra [10]. En el contexto de toxicidad, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) genera radicales de superóxido e hidroxilos, los componentes principales de ROS, y por lo tanto ha sido ampliamente empleado para imitar el estrés oxidativo en diferentes paradigmas celulares [11,12,13,14]. Dado que existe un desequilibrio entre la generación y la eliminación de ROS en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, las moléculas que podrían proteger la toxicidad inducida por H_2O_2 [15] pueden tener importancia terapéutica en el tratamiento de estas enfermedades devastadoras

1.1 ROS

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas químicamente reactivas derivadas del oxígeno [16]. Las ROS se mantienen en un equilibrio dinámico balanceado por los procesos celulares generadores de ROS y las defensas antioxidantes. El estrés oxidativo describe el daño que ocurre cuando las ROS abrumen los sistemas de defensa antioxidantes. Este fenómeno es consecuencia de la alteración de la homeostasis, de modo que la producción de ROS se vuelve excesiva o debido a la disminución de los sistemas de defensa [17]. Los sistemas de defensa antioxidantes constan de varias enzimas, algunas de las cuales contribuyen a la síntesis y transporte de glutatión. El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NF-E2) (Nrf2) es un factor de transcripción sensible a redox que activa la transcripción de genes antioxidantes, citoprotectores y antiinflamatorios [18]. En circunstancias normales, Nrf2 se une a su regulador negativo, la proteína asociada al citoesqueleto, la proteína 1

asociada a ECH similar a Kelch (Keap1), que ubiquitina a Nrf2 y conduce a su degradación [19]. En respuesta al estrés oxidativo, Nrf2 se disocia de Keap1 y se traslada al núcleo. La heterodimerización de Nrf2 con pequeñas proteínas Maf en el núcleo activa la transcripción de sus genes diana, que contienen elementos de respuesta antioxidante (ARE) en sus regiones promotoras [20]. Numerosos estudios han sugerido que los activadores de Nrf2, como la melatonina y los compuestos naturales, inhiben la activación del inflammasoma NLRP3 [21]. Hasta ahora, el papel del factor de transcripción Nrf2 en el efecto inhibidor de la melatonina sobre la activación del inflammasoma NLRP3 en células microgliales sigue siendo en gran medida desconocido [22].

En resumen, la producción de las ROS debe estar en equilibrio con los procesos antioxidantes en la célula, cuando no es así, se produce estrés oxidativo. La inflamación es una respuesta protectora contra infecciones y lesiones que repara y regenera tejidos o células dañados y elimina patógenos. Sin embargo, la sobreproducción de ROS puede provocar una respuesta inflamatoria exagerada, la liberación de factores neurotóxicos y, en última instancia, la pérdida de la estructura y función neuronal. Los procesos neuroinflamatorios pueden vincularse a múltiples vías, incluidas las que conducen a la depresión y la demencia, ambas consecuencias de la neurodegeneración. El mecanismo subyacente de la enfermedad involucra citoquinas proinflamatorias y, por lo tanto, la neuroinflamación está involucrada en la patogénesis de los deterioros funcionales y mentales [23].

Por otro lado, para comprender la desregulación de la producción de ROS asociada con la neuroinflamación, es fundamental comprender la fuente de ROS en el sistema neuroinmune y su regulación fisiológica. Además, se ha visto que la producción de oxidantes y la inflamación están estrechamente relacionadas y es imperativo determinar adecuadamente la secuencia correcta de eventos [24].

El estrés oxidativo es un actor importante en la patología de los trastornos neurodegenerativos. La relación entre el estrés oxidativo y la muerte neuronal se ha

investigado extensamente. El estrés oxidativo daña los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos y potencialmente abre el poro de transición de permeabilidad mitocondrial, que a su vez puede estimular aún más la producción de ROS, empeorar el fallo de energía y liberar factores pro-apoptóticos tales como el citocromo c en el citoplasma [25].

En las neuropatologías como la epilepsia, la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA), entre otros, el estrés oxidativo se atribuye principalmente a la generación acelerada de ROS, incluido el anión superóxido, el radical hidroxilo y los peróxidos. Las altas concentraciones de glutamato aumentan la generación de ROS tanto radicales como no radicales [26]. La formación de ROS inducida por glutamato se ha asociado con un metabolismo mitocondrial aberrante que conduce a la activación de una cascada de eventos tóxicos intracelulares que dan como resultado la peroxidación lipídica, el Ca^{2+} mitocondrial elevado y finalmente la muerte celular. Por lo tanto, la regulación de la producción de ROS es un objetivo clave para el tratamiento o prevención de enfermedades neurodegenerativas [27].

1.2 Dinámica mitocondrial

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo caracterizado por una disminución progresiva de las funciones fisiológicas y anatómicas del sistema nervioso. La etiología de estas patologías aún se desconoce, pero se ha propuesto la función mitocondrial como un factor común entre ellas debido al alto requerimiento energético que tienen las neuronas para realizar sus funciones fisiológicas [28,29]. Además, las mitocondrias también participan en la señalización intracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la apoptosis [30,31].

La mitocondria es un orgánulo altamente dinámico que cambia su morfología y función en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y, por tanto, la dinámica mitocondrial regula la supervivencia celular. La dinámica mitocondrial comprende diferentes procesos como la generación de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial), su eliminación (mitofagia) y, particularmente, la fusión, fisión, transporte y distribución dentro de la célula (tráfico) [32].

Como se mencionó anteriormente, las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos que sufren fisión y fusión constantes (Figura 1), y estos cambios morfológicos son necesarios para un metabolismo energético eficiente, la amortiguación del calcio y la regulación de la supervivencia celular [33].

La alteración del equilibrio entre fisión y fusión mitocondrial está constantemente implicada en enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer [34]. En cerebros afectados por la EA se han observado alteraciones en la función bioenergética, dinámica mitocondrial anormal y aumento de la liberación de citocinas proinflamatorias [35,36].

La dinámica mitocondrial son parámetros esenciales del control de calidad mitocondrial, por lo que la generación y eliminación de mitocondrias son contribuyentes esenciales. El mecanismo opuesto de la degradación mitocondrial es la generación de nuevas mitocondrias, denominada biogénesis mitocondrial (mitogénesis) [37].

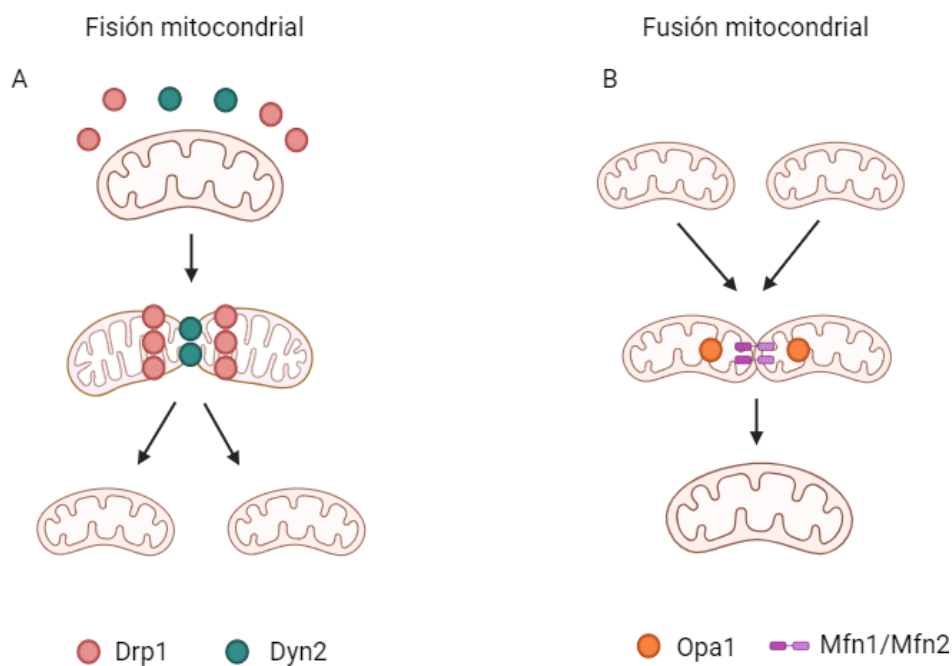


Figura 1. Dinámica mitocondrial. A. La fisión mitocondrial, es ejecutada por la proteína 1 relacionada a dinamina (Drp1), la cual se recluta y ancla en la membrana externa mitocondrial por proteínas de transmembrana como la proteína de fisión mitocondrial (Fis1), todo esto provoca la constricción parcial de la membrana mitocondrial, y para reforzar más este efecto participa dinamina 2 (Dyn2). B. La fusión mitocondrial, se lleva a cabo a partir de 2 pasos. Primero la fusión de la membrana externa, que está mediada por interacciones de dominio en espiral de mitofusinas 1 y 2 (Mfn 1 y 2), formando complejos para unir así a la membrana. Segundo, tenemos la participación de una GTPasa relacionada a la dinamina (Opa1), que está involucrado en la fusión de la membrana interna mitocondrial.

Los procesos de biogénesis mitocondrial regulan la función mitocondrial y están involucrados en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas [38]. El coactivador del receptor y activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α), el principal regulador de la biogénesis mitocondrial activa la expresión de varios factores de transcripción posteriores, como el factor respiratorio nuclear 1 y 2 (NRF1 y 2) y el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) [39]. El deterioro de la función de PGC1 α y sus genes diana mitocondriales posteriores altera el metabolismo energético y la función mitocondrial y finalmente conduce a la muerte neuronal [40].

Las mitocondrias también son reguladores clave de los sistemas inmunológicos innato y adaptativo. Existe evidencia de que el trastorno de la dinámica mitocondrial y el daño estructural pueden promover la producción de citocinas y desencadenar la neuroinflamación [41]. Por lo tanto, la acumulación y liberación de productos mitocondriales de señalización de peligro (ROS, ADN, proteínas y lípidos) son impulsores de la activación del inflamasoma NLRP3. Una vez ensamblado y activado, NLRP3 induce la escisión proteolítica y la liberación de citocinas proinflamatorias, incluidas la interleucina (IL) -1 β y la IL-18, lo que provoca la muerte celular piroptótica y exacerba las respuestas inflamatorias [42].

La disfunción de las mitocondrias neuronales y la neuroinflamación son dos características patológicas destacadas que se consideran cada vez más mecanismos patogénicos importantes para las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, se han hecho pocos esfuerzos para investigar las posibles interacciones entre ellos. [43]. Cada vez se reconoce más que la disfunción mitocondrial y la inflamación son lesiones interdependientes [44].

1.3 Neuroinflamación

La neuroinflamación es el mecanismo de inflamación del sistema nervioso central (SNC) que se produce en respuesta a traumas, infecciones o enfermedades neurodegenerativas. La neuroinflamación es un factor clave de la patología de diversas enfermedades neurológicas, este es un proceso complejo y ordenado que depende de varios tipos de células gliales y células inmunitarias periféricas [45].

Es de relevancia destacar que la microglía son las principales células inmunitarias residentes que desempeñan un papel importante en la mediación de las respuestas inflamatorias en el Sistema nervioso central (SNC) y la activación excesiva sostenida de éstas, contribuyen al daño neuronal y a la liberación de mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleucina (IL)-6 y la IL-1 β , en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos (LPS). Además, la sobreproducción de estos mediadores puede contribuir a la progresión del trastorno neurodegenerativo [46].

Las células neuronales son muy susceptibles al daño inducido por citocinas proinflamatorias, y se ha demostrado que la exposición a citocinas proinflamatorias provoca la apoptosis de las células neuronales [47]. Además, la neuroinflamación puede aumentar el estrés oxidativo por la liberación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) dañinas, que promueven aún más el daño neuronal y la inflamación posterior, lo que da como resultado un ciclo de neurodegeneración de retroalimentación positiva [48].

Varias piezas de evidencia sugieren que factores como mutación génica, disfunción mitocondrial y acumulación de hierro, entre otros factores, pueden generar ROS, y la neuroinflamación es una respuesta protectora a diversos tipos de lesiones en el tejido. Una vez que el tejido se inflama, provoca la acumulación de ROS, lo que puede conducir a la muerte celular [49].

La respuesta inflamatoria se modula mediante el estrés oxidativo. Mientras que en un equilibrio redox, la respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa, en el caso de una pérdida crónica de este equilibrio redox, como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, las vías de señalización que modulan el sistema inmunitario se alteran, lo que conduce a la desregulación de la respuesta inmunitaria, favoreciendo el predominio de respuestas proinflamatorias [50,51].

Las ROS también pueden mediar la activación de microglías y astrocitos, por ende, son capaces de activar rutas proinflamatorias y producción de quimiocinas, como IL-1, IL-6, TNF- α e interferones (IFN) que inducen la generación de ROS en células no fagocíticas, así como fibroblastos, músculo liso vascular células, células endoteliales, renales células mesangiales y células tubulares [52]. A su vez las ROS, especialmente derivadas de las mitocondrias, son uno de los mediadores críticos de la activación del inflamasoma NLRP3 [53]. Por lo tanto, la inflamación y el estrés oxidativo son mecanismos patológicos que están estrechamente interrelacionados y a menudo coexisten [54].

1.4 NLRP3

Los NLR forman una gran familia de proteínas de sensores intracelulares, cuyos miembros comparten un dominio de oligomerización (NOD) de unión a nucleótidos central conservado, una región de repetición rica en leucina (LRR) y un dominio efector N-terminal variable [53]. Los miembros de la familia del inflamasoma son numerosos, pero el inflamasoma NLRP3 es el mejor caracterizado [54].

El NLRP3 suele estar inactivo, pero puede responder a desencadenantes estériles comúnmente asociados con trastornos neurodegenerativos, incluido el mal plegamiento y la agregación de proteínas, el estrés oxidativo y mitocondrial y la exposición a tóxicos ambientales asociados a enfermedades [55].

La activación del inflamasoma conduce a la activación de caspasa-1, la escisión de la interleucina activa (IL) -1 β e IL-18 y la muerte celular dependiente de caspasa-1 [56].

El inflamasoma NLRP3 se activa mediante varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluidos proteínas o ácidos nucleicos microbianos, y patrones moleculares asociados al daño (DAMP) [57,58]. Múltiples mecanismos de señalización celular pueden participar en la activación de NLRP3, incluida la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la salida de potasio, el daño lisosomal y la desestabilización o daño mitocondrial. Además, NLRP3 podría estar regulado directamente por ROS [59].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente derivadas de las mitocondrias, son uno de los mediadores críticos de la activación del inflamasoma NLRP3. Además, la inflamación impulsada por el inflamasoma NLRP3 recluta células inflamatorias, incluidos macrófagos y neutrófilos, que a su vez provocan la producción de ROS, lo que sugiere un circuito de retroalimentación entre ROS y el inflamasoma [51].

2. Terapia con Astaxantina

Se ha dado lugar a un creciente cuerpo de investigación que se centra en la comprensión de los mecanismos asociados con el insulto tóxico y en el descubrimiento de posibles estrategias terapéuticas dirigidas a estos mecanismos. Para que sean tratamientos eficaces para las enfermedades neurodegenerativas deben ser capaces de penetrar en la barrera hematoencefálica, sin embargo, la mayoría de las aplicaciones terapéuticas están limitadas por una falta de permeabilidad hacia esta barrera [60].

En el caso de la astaxantina (ASX) o 3,3'-dihidroxi- B- B-4,4'-diona es un carotenoide de xantofila, sintetizado naturalmente por una serie de bacterias marinas como la *Agrobacterium aurantiacum*, microalgas como la *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella zofingiensis* y levaduras rojas como la *Xanthophyllomyces dendrorhous* [61]. Se ha encontrado que la ASX es segura para el consumo humano, con mínima mutagenicidad, teratogenicidad, embriotoxicidad y toxicidad para la reproducción [62]. También mantiene la función mitocondrial, demuestra una mayor actividad antioxidante que la vitamina E y es más fuerte que otros carotenoides [63]. Además de su alta capacidad antioxidante, destaca también sus propiedades lipofílicas por lo que puede pasar fácilmente la barrera hematoencefálica y actuar directamente sobre el

sistema nervioso central (SNC), otorgando cierto efecto neuroprotector [64]. La ASX se ha considerado una molécula prometedora para el tratamiento de la inflamación, el cáncer y las enfermedades relacionadas con la edad [65]. Por lo tanto, el cerebro se considera el órgano diana más importante de la astaxantina [66]. Sin embargo, este carotenoide también ha tenido un protagonismo como potencial anti-aterosclerótico [67] y un enfoque terapéutico para sujetos con pre-diabetes y diabetes mellitus tipo 2 [68].

En relación con lo anterior mencionado, se ha mostrado que la ASX, como caroteno de origen marino protege a las neuronas hipocampales en cultivos de los efectos nocivos de los oligómeros del péptido amiloide-B [69] y, previene la producción excesiva de ROS que inducen un aumento sostenido en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático [65]. Además, ASX reduce los depósitos de beta-amiloide y proteína tau [70], mejora la disfunción cognitiva en algunos modelos de enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson y la epilepsia [71,73]. También se ha observado una mejora por parte de la ASX en alteraciones bioquímicas y de comportamiento utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* de dolor neuropático [57].

Por otro lado, estudios recientes (aún no publicados) realizados en ratas envejecidas alimentadas con ASX mejoraron la memoria de reconocimiento, atenuaron el daño oxidativo al ADN y previnieron la translocación nuclear de un factor de transcripción que conduce la respuesta inflamatoria (NF- κ B). En relación con este último, se ha visto que la ASX actúa como un inhibidor para NF- κ B en ratones SNL y en ratas envejecidas [22,58]. Además, en el contexto de la depresión, ASX tenía un efecto antidepresivo al disminuir los niveles de IL-1beta, IL-6, ciclooxigenasa-2, caspasa-3 escindida y GFAP [72].

A partir de todo lo anterior planteado, surge como pregunta de investigación, si ¿El efecto neuroprotector de la astaxantina en una línea hipocampal de ratón involucra cambios en la expresión del inflamasoma NLRP3 afectando la viabilidad celular y la integridad mitocondrial?

HIPÓTESIS

ASX mejora la funcionalidad mitocondrial y disminuye la neuroinflamación, en células neuronales de ratón sometidas a estrés oxidativo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la ASX en la función, dinámica mitocondrial y activación del inflamosoma en células hipocampales de ratón en un modelo de toxicidad por estrés oxidativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la ASX en la función mitocondrial, en una línea hipocampal de ratón HT22 tratada con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
2. Evaluar el efecto de la ASX en la dinámica mitocondrial, en una línea hipocampal de ratón HT22 tratada con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
3. Evaluar el efecto de la ASX en la activación del inflamosoma NLRP3, en una línea hipocampal de ratón HT22 tratada con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

METODOLOGÍA

Materiales cultivo

DMEM alto en glucosa (GIBCO; Thermo Scientific), Penicilina/Streptomycin 10.000 U/ml, suero fetal de caballo (FHS) inactivado (GIBCO; Thermo Scientific, Nueva Zelanda), poli-D-lisina de 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, MA, EE. UU.), tripsina-EDTA 0.025% (GIBCO; Thermo Scientific, IL, EE. UU.), tubos de centrifugas plásticos 50 ml y 15 ml (Falcon), pipetas Pasteur plásticas desechables, filtros tamaño de poro 0,2 µm Costar, placas 96 pocillos fondo plano (Falcon), placas 60 mm y 30 mm petri (Falcon), azul de tripán, Tampón fosfatos salino 10X (PBS), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), astaxantina (extracto etanólico), alcohol etílico (100%), MTT (bromuro-3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (Invitrogen, Thermo Scientific), HCL, Dodecil fosfato de Sodio 10% (SDS), lector de placas modelo Synergy HT, mitotracker red FM (Invitrogen, Thermo Scientific), DMSO, PFA 4%, anticuerpo primario (anti-h/mNLRP3, Merck Millipore), anticuerpo secundario (Goat anti-Rabbit IgG, Alexa fluor 546, Invitrogen), BSA al 1% y 5%, Tritón X-100, medio de montaje Dako (Invitrogen, ThermoScientific), microscopio confocal de barrido láser (Nikon C1 D1-ECLIPSE).

Cultivos celulares HT22

Se utilizaron células HT22 inmortalizadas de ratón de hipocampo no diferenciadas. Para esto se sembró en una placa Petri de 60 mm y en placas de 96 pocillos tratada previamente con poli-D-lisina de 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, MA, EE. UU.) a una densidad de 20.000 células/placa y 3000 células/pocillo respectivamente, con 3 ml (placa 60 mm) y 200 µl (placa 96 pocillos) de medio DMEM alto en Glucosa con FHS 10%. Las células se cultivaron en una atmósfera de humedad saturada con 95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37°C. Cuando estas células cumplieron el 70% de confluencia, se disocian con 1 ml al 1X tripsina-EDTA 0.025% (GIBCO; Thermo Scientific, IL, EE. UU.) para la ejecución del sub-cultivo.

Tratamiento con ASX y H₂O₂

En las placas de 96 pocillos se trabajó con varias concentraciones de ASX (100 nM, 1 μ M y 10 μ M), H₂O₂ (50 μ M y 200 μ M), control (CT) y vehículo (VEH/EtOH absoluto 100%). Para estimular con ASX a las células se le retiró el medio DMEM 10% y se reemplazó con 200 μ l (placa 96 pocillos) de medio de DMEM alto en glucosa con FHS Gibco al 1% (DMEM 1%) con 100 nM, 1 μ M y 10 μ M de ASX, mientras que en la placa Petri de 60 mm, se reemplazó con 2 ml de medio DMEM 1% junto a ASX a la concentración determinada en el ensayo MTT, previamente diluida por 24 horas.

Para estimular con peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se retiró el medio agregado anteriormente de DMEM 1% con ASX, añadiendo H_2O_2 a una concentración de 50 μM y 200 μM en las placas de 96 pocillos y a una concentración determinada en el ensayo MTT en las placas Petri de 60 mm, por un tiempo de 1 hora de incubación a 37°C. Finalizado este último, se eliminó el tratamiento de H_2O_2 , y se agregó medio DMEM 1% por 24 horas.

Tabla 1. Distribución de las condiciones experimentales en placa 96 pocillos.

[illegible]

Ensayo colorimétrico MTT o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio para función mitocondrial

A las placas de 96 pocillos con la condición control, vehículo, ASX, H_2O_2 y ASX/ H_2O_2 (Tabla 1), se les eliminó el medio DMEM 1% añadido anteriormente, para agregar medio DMEM 1% fresco junto a 10 μ l de la solución stock MTT (12mM) en PBS 1X, y se incubó por 4 horas a 37°C. A continuación, se añadió a cada pocillo una solución de SDS 10% en HCL (0,01M), y se incubó por 18 horas a 37°C (Figura 2). Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm con un lector de placas modelo Synergy HT.

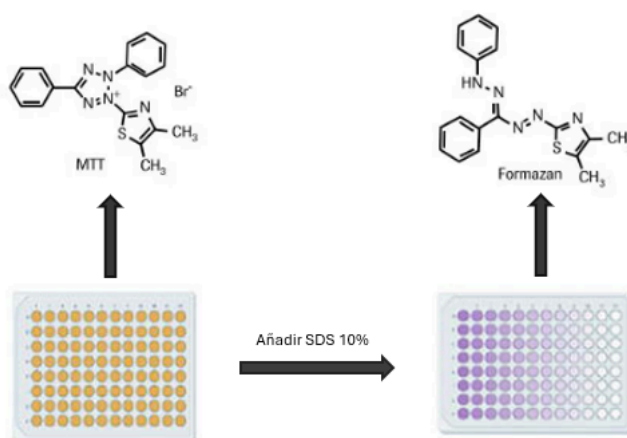


Figura 2. Fundamento ensayo de MTT. El MTT es un compuesto soluble que se agrega directamente al medio de cultivo, absorbiéndose por las células vivas a través de la membrana celular. Dentro de las células vivas, el MTT es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a formazan. Este precipitado formado se solubiliza a través de algún solvente orgánico como SDS 10%, para así medir su absorbancia a una longitud de onda específica.

Ensayo colorimétrico Mitotracker para integridad mitocondrial

A cada uno de los grupos experimentales descritos previamente con las condiciones antes mencionadas, se les retiró el medio DMEM 1%, para luego agregar 0.5 μ l de la solución stock Mitotracker Red FM (1mM, Invitrogen, en 1 ml de DMSO junto a 0.2 gramos de plurónico) en 500 μ l de medio DMEM 1% para incubar por 40 minutos a

37°C en incubadora (Figura 3). A continuación, se retiró la solución para realizar 3 lavados con PBS 1X y fijar con PFA 4% a 37°C por 10 minutos. Se lavó nuevamente con PBS 1X para montar con Dako en un portaobjeto y dejar a 4°C para su posterior visualización.

Obtenidas las imágenes se trabajó con el programa ImageJ, configurando el formato a 8-bit, el tamaño de la imagen a 500 pixels y ajustando el brillo con contraste. A continuación, se aplicó el threshold para binarizar la imagen (skeletonize, watershed y dilate respectivamente), y se aplicó un reslice Z en 0.1 (profundidad de píxel), para realizar un conteo 3D de objetos. Los datos obtenidos del conteo 3D y el volumen mitocondrial se trabajarán en Excel para el análisis estadístico. Cabe destacar, que el volumen mitocondrial, se realizó como un promedio del volumen total de cada mitocondria por célula.

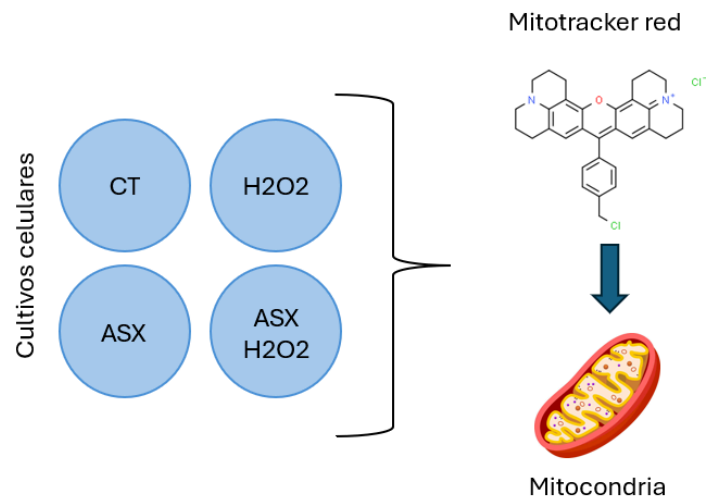


Figura 3. Mitotracker red marca mitocondria. Mitotracker red es una molécula lipofílica que atraviesa las membranas celulares, y debido a su carga positiva en su forma no ionizada se acumula en la mitocondria, las cuales poseen cargas negativas. Todo esto sucede por la diferencia del potencial de carga entre el citosol y el interior mitocondrial.

Técnica Inmunofluorescencia para detección de antígenos.

A las células sembradas en cubreobjetos de las distintas condiciones, se les retiró el medio DMEM 1% para lavar con 1ml de PBS 1X. A continuación, se agregó 1 ml de solución PFA 4% a 37°C por 10 minutos. Se añadió 1 ml de Triton X-100 (0,1%) en PBS por 30 minutos, y se agregó 1 ml BSA 5% con PBS 1X por 1 hora. Se incubaron los cubres con el anticuerpo primario (anti-h/mNLRP3, Merck Millipore) en BSA 1% a una dilución de 1:500 durante toda la noche bajo 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente los cubres se pasaron a una placa de 24 pocillos mirando hacia arriba y se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno. Se incubó el anticuerpo secundario 1:500 en BSA 1% por 1 hora bajo oscuridad. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada uno, para incubarlo con Hoechst 1:1000 en PBS 1X por 20 minutos. Se lavó nuevamente una serie de 3 lavados con PBS 1X por 10 minutos para montar finalmente con Dako en un portaobjeto y dejar a 4°C almacenado.

Obtención imágenes por microscopía confocal

Para obtener imágenes de las células, los portaobjetos tratados son observados en un microscopio confocal de barrido láser (Nikon C1 D1-ECLIPSE) utilizando objetivos de 20X, 40X y 60X. Se tomaron cortes confocales en el eje Z en los objetivos de 60X, utilizando un pinhole de 30 μm y se realizaron cada 0.8 μm en las regiones de interés para obtener imágenes representativas. Las imágenes fueron editadas en el software EZ-C1 FreeViewer 3.90 y reconstruidas con Niss Elements Viewer 4.0.

Análisis estadístico

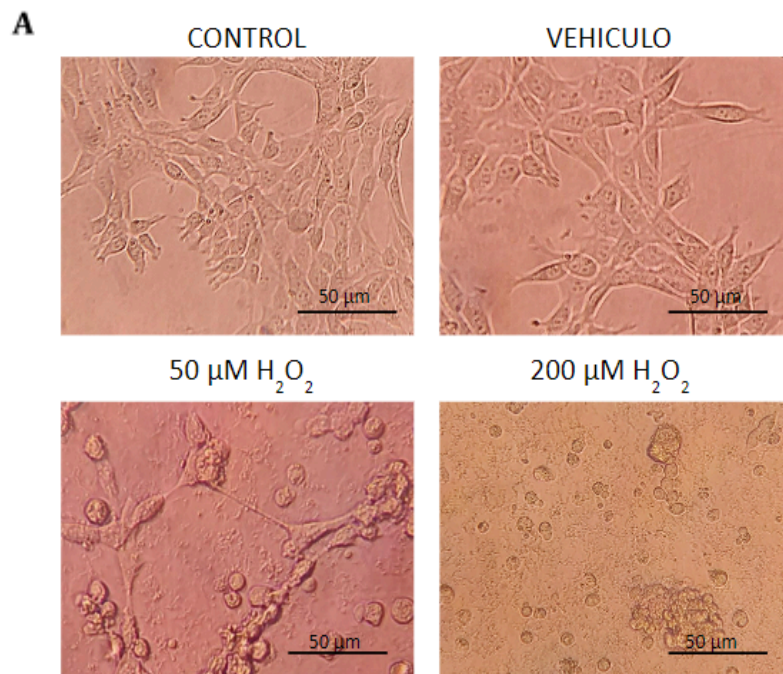
El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad. Los valores se presentaron como la media $\pm$ SEM. Se evaluó la distribución normal de los datos mediante prueba de Shapiro-Wilks. Para comparaciones múltiples de datos paramétricos se aplicó la prueba de ANOVA correspondiente, mientras que para datos no paramétricos se aplicó el test de Kruskal Wallis. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Ensayo de viabilidad celular

A. Efecto del H_2O_2 en la función mitocondrial

Inicialmente, se evaluó la función mitocondrial en células hipocampales de ratón (HT22) expuestas a diferentes concentraciones de H_2O_2 (50 y 200 μM) durante 1 hora (Figura 4). En ambas condiciones utilizadas (50 y 200 μM) se observaron cambios en la morfología celular respecto a la condición control (27,96% y 79,56%) y a la condición vehículo (29,12% y 80.72%) respectivamente. Asociado a los cambios morfológicos se determinó una disminución significativa en la función mitocondrial respecto al control y al vehículo ($p < 0,05$, $n = 5$). No fue posible evidenciar una diferencia significativa entre el grupo control y vehículo (EtOH).



B

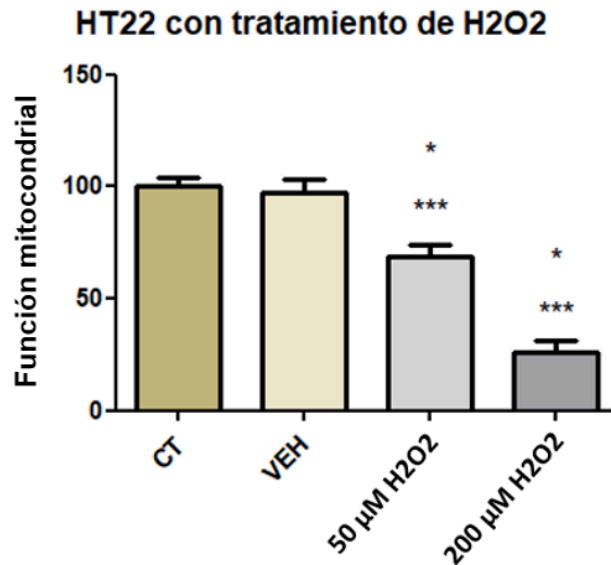


Figura 4. Efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre la función mitocondrial. A. Imágenes representativas de las células HT22 tratadas con la condición control, vehículo, 50 y 200 µM de H₂O₂. B. Cambios en la viabilidad celular con 50 y 200 µM de H₂O₂. Los resultados se expresan como porcentajes de absorbancia de las células HT22, ± error estándar medio. Los valores corresponden a un n=5 (análisis de 5 réplicas). * Indica diferencia significativa con respecto al control y *** indica diferencia significativa con respecto al vehículo (p<0.05) con Kruskal Wallis.

B. Efecto de un tratamiento con ASX en concentraciones crecientes previamente a la estimulación con H₂O₂

A continuación, La figura 5 nos muestra los cambios en la función mitocondrial expresado como porcentaje del control en células hipocampales de ratón (HT22) expuestas a diferentes concentraciones de ASX (100 nM, 1 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM y 100 µM) durante 24 horas. Donde se puede observar, una disminución en la función mitocondrial a altas concentraciones de ASX respecto a la condición control. Destacando la significancia estadística, de la baja en la actividad metabólica en las células HT22 con la condición 60 µM, 80 µM y 100 µM respecto al CT.

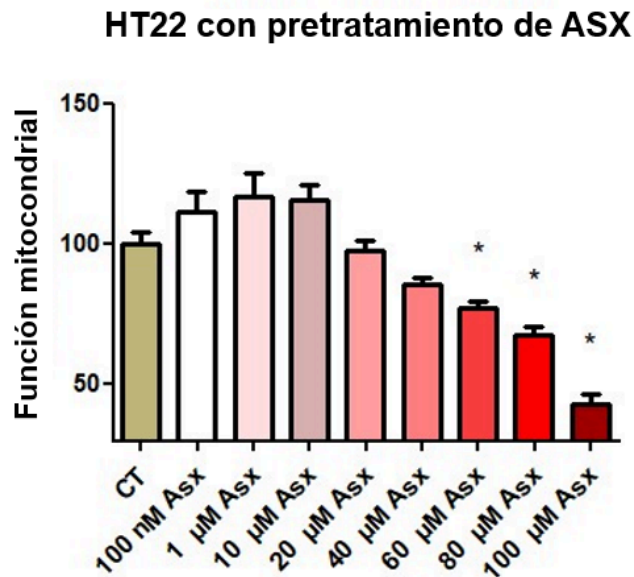


Figura 5. Efecto de la ASX en concentraciones crecientes. Cambios en la función mitocondrial en células HT22 con pretratamiento de ASX en concentraciones elevadas. Los resultados se expresan como porcentajes de absorbancia de las células HT22, $\pm$ error estándar medio. Los valores corresponden a un $n=5$ (análisis de 5 réplicas). * Indica diferencia significativa con respecto al control ($p<0.05$) con ANOVA unidireccional junto a Bonferroni.

C. Efecto neuroprotector de la ASX frente al tratamiento con H_2O_2

En el caso de la figura 6, muestra el efecto del antioxidante ASX en diferentes concentraciones (100 nM, 1 μ M y 10 μ M) antes y después del tratamiento con 50 μ M de H_2O_2 .

Donde, la función mitocondrial aumentó significativamente en presencia de 100 nM, 1 μ M y 10 μ M de ASX con tratamiento de 50 μ M de H_2O_2 en comparación a la condición de solo 50 μ M de H_2O_2 ($p<0,05$). He de destacar que no se visualiza una diferencia significativa entre las diferentes condiciones ASX en ausencia o presencia de H_2O_2 ($p<0,05$).

HT22 con pretratamiento de ASX y estimulación de 50 μM H_2O_2

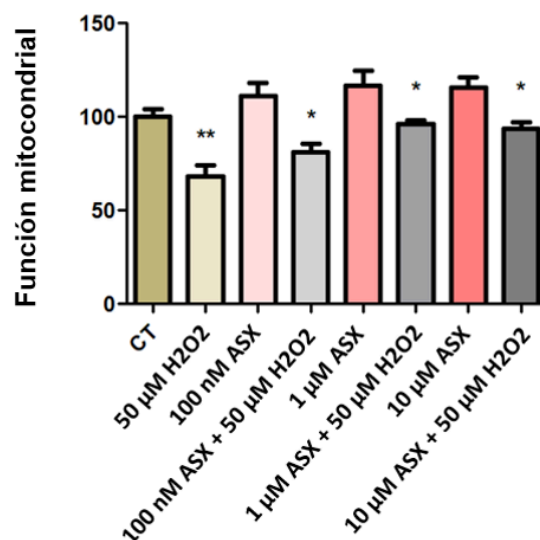


Figura 6. Efecto en la función mitocondrial de un pretratamiento con concentraciones crecientes de ASX en células HT22 estimuladas con 50 μM de H_2O_2 . Cambios en la función mitocondrial con 50 μM de H_2O_2 en presencia del antioxidante ASX. Los resultados se expresan como porcentajes de absorbancia de las células HT22, $\pm$ error estándar medio. Los valores corresponden a un $n=5$ (análisis de 5 réplicas). * Indica diferencia significativa con respecto al 50 μM de H_2O_2 y ** indica diferencia significativa con respecto al control ($p<0.05$) con ANOVA unidireccional junto a un Bonferroni. Se omitieron diferencias significativas para la simplificación del gráfico.

Por otro lado, el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo sin cambios significativos en presencia de 100 nM, 1 μM y 10 μM de ASX con los 200 μM de H_2O_2 respecto a la condición de 200 μM de H_2O_2 ($p<0,05$).

HT22 con pretratamiento de ASX y estimulación de 200 μ M H₂O₂

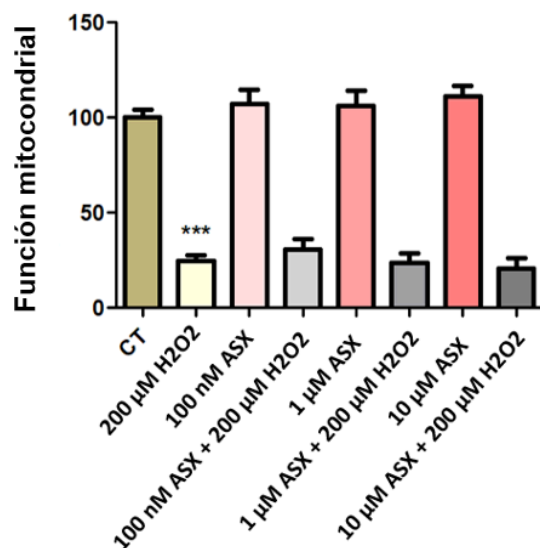


Figura 7. Efecto en la función mitocondrial de un pretratamiento con concentraciones crecientes de ASX en células HT22 estimuladas con 200 μ M de H₂O₂. Los resultados se expresan como porcentajes de absorbancia de las células HT22, $\pm$ error estándar medio. Los valores corresponden a un n=5 (análisis de 5 réplicas). *** Indica diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$) con ANOVA unidireccional junto a un Bonferroni. Se omitieron diferencias significativas para la simplificación del gráfico.

En base a las figuras 4, 5, 6 y 7, se eligió el modelo experimental que se llevara a cabo en el resto del trabajo. Respecto a la concentración de H₂O₂, se pudo visualizar que al trabajar con una concentración de 200 μ M, la función mitocondrial disminuyó más del 50%, lo que no se pudo revertir en las tres concentraciones de ASX (100 nM, 1 μ M y 10 μ M) utilizadas manteniendo una baja actividad metabólica celular de las HT22. Mientras que la concentración 50 μ M de H₂O₂ sólo afectó el 30% de las células, situación que fue revertida en todas las concentraciones de ASX antes mencionadas, restableciendo de manera significativa la actividad metabólica de estas. En relación con esto último, se eligió la concentración de 50 μ M de H₂O₂ y la concentración de 10 μ M de ASX para el resto de los experimentos. Cabe destacar que no se presenció una

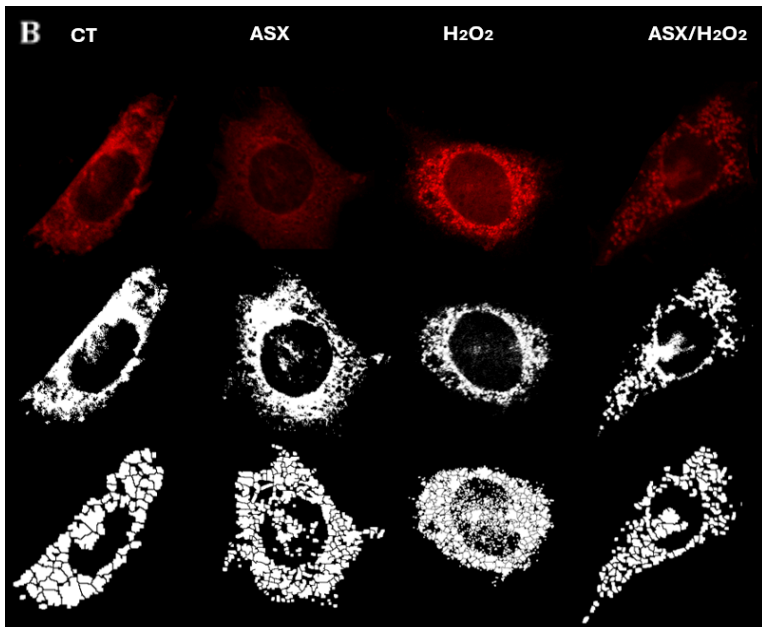
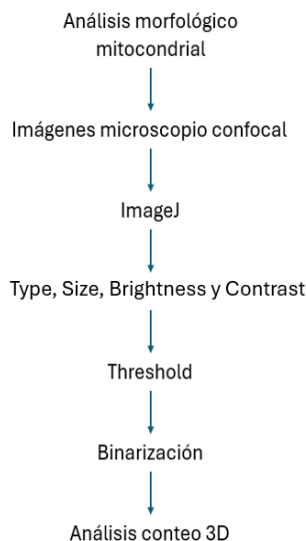
diferencia significativa entre la condición control y vehículo, por lo que se decide comparar los tratamientos respecto al control.

Mitotracker para visualizar integridad mitocondrial

A. Dinámica mitocondrial

A continuación, para estudiar fusión y fisión mitocondrial se estudió los cambios que presentaba la morfología mitocondrial, post tratamientos de ASX y H₂O₂. Las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, se sometieron a un procedimiento por medio de ImageJ con binarización, para luego realizar un conteo 3D de estas (Figura 8A). Obteniendo una diferencia significativa de la condición H₂O₂ respecto al CT, asociándolo a una fragmentación mitocondrial por el N° de objetos detectados por célula. Sin embargo, al visualizar la condición ASX/ H₂O₂, podemos ver una diferencia significativa respecto a la condición H₂O₂, muy similar a la condición CT, mejorando el daño mitocondrial por parte del H₂O₂ (Figura 8B y 8C). Por otro lado, un detalle que resalta es la condición ASX, resultando significativamente más alta que el CT en N° de objetos encontrados por célula, relacionándose a primera vista con fisión mitocondrial o algún fenómeno de colocalización con ASX (Figura 8B y 8C).

A



C

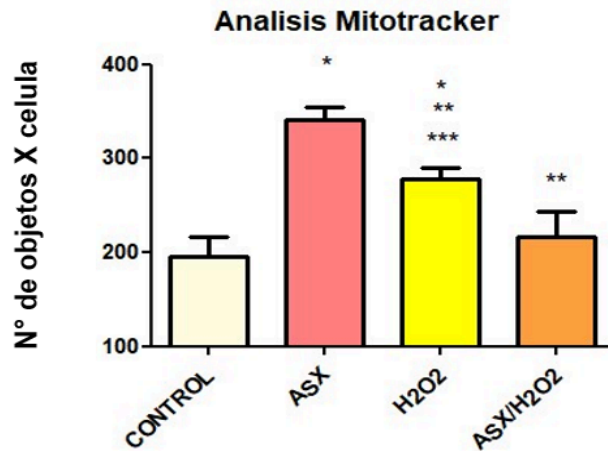


Figura 8. Morfología mitocondrial en HT22. A. Diagrama sistemático del flujo de trabajo del análisis morfológico mitocondrial. B. Imágenes de microscopia confocal, procesamiento de umbral y el análisis esquelético. C. Cuantificación del análisis morfológico mitocondrial de Mitotracker. Los resultados se expresan como un promedio de números de objetos detectados por células HT22, $\pm$ error estándar medio. Los valores corresponden a un $n=5$ (análisis de 5 réplicas). * Indica diferencia significativa con respecto al control, ** Indica diferencia significativa con respecto a ASX, y *** Indica diferencia significativa con ASX/ H_2O_2 ($p<0.05$) con Kruskal Wallis.

A. Volumen relativo mitocondrial

Respecto a los resultados obtenidos en el análisis morfológico mitocondrial, se llevó a cabo un estudio del volumen relativo mitocondrial del ensayo anterior con mitotracker (micras cubicas) de cada mitocondria detectada por el sistema promediándola. Obteniendo con la condición H_2O_2 un volumen mitocondrial significativamente menor respecto al CT, mientras que la condición ASX/ H_2O_2 es significativamente mayor a la condición H_2O_2 en volumen mitocondrial. Vinculándose con los resultados anterior de fusión y fisión mitocondrial. Cabe destacar que la condición ASX nuevamente se obtuvo un aumento significativo respecto al CT, indicándonos la presencia de un mayor volumen en los objetos detectados por célula en esta condición, asociando todo este proceso a la biogénesis mitocondrial y no solamente a la fusión o fisión mitocondrial (Figura 8C y 9).

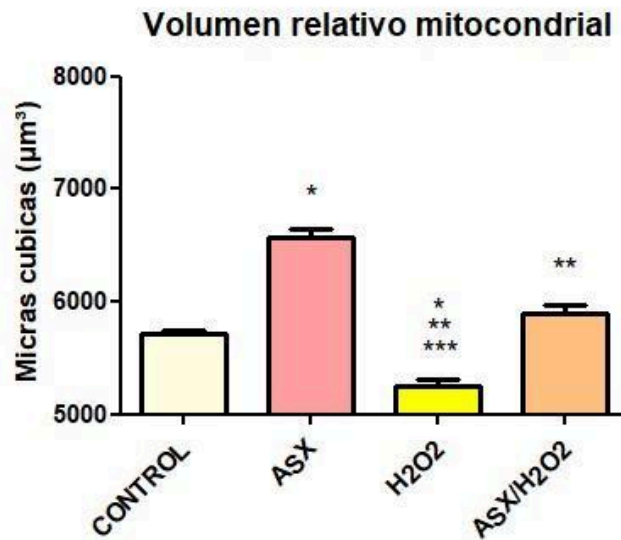
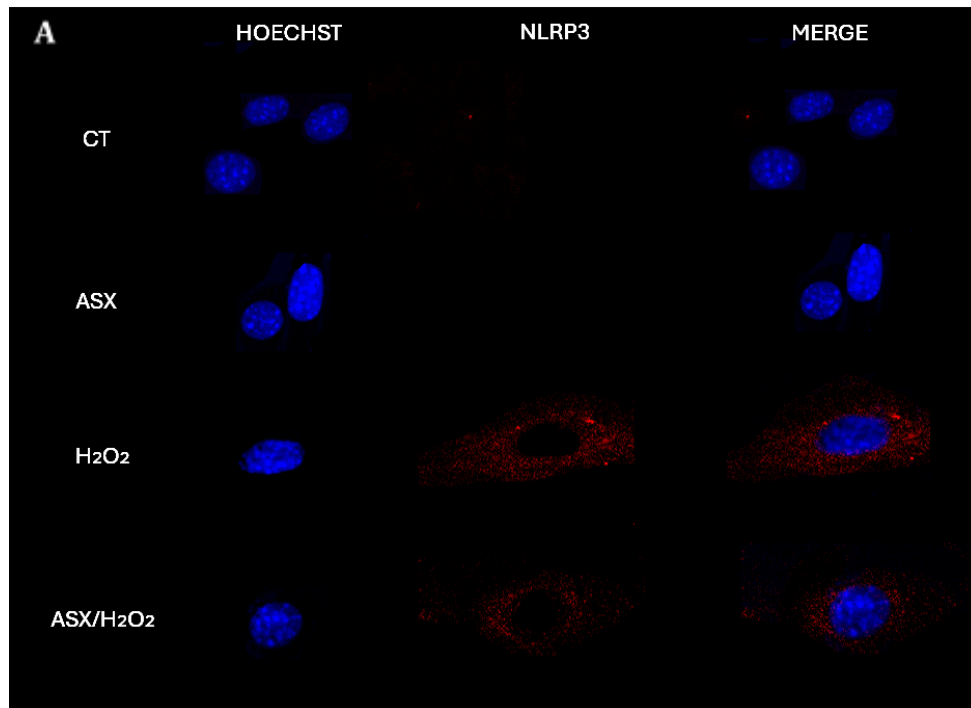


Figura 9. Volumen en micras cúbicas mitocondrial HT22. Cambios en el volumen mitocondrial con 3 condiciones. Los resultados se expresan como un promedio de números de objetos detectados por células HT22, $\pm$ error estándar medio. Los valores corresponden a un $n=5$ (análisis de 5 réplicas). * Indica diferencia significativa con respecto al control, ** Indica diferencia significativa con respecto a ASX, y *** Indica diferencia significativa con ASX/H₂O₂ ($p<0.05$) con ANOVA unidireccional junto a Bonferroni.

Expresión relativa de NLRP3

A. Análisis intensidad fluorescente para células HT22

Para investigar la respuesta inflamatoria de NLRP3 con H₂O₂, presente a ASX, las imágenes se evaluaron con el microscopio confocal y por medio de ImageJ se trabajó con la expresión relativa de NLRP3 y la intensidad fluorescente que esta emite, obteniendo lo siguiente (Figura 10). Expresión nula con la condición CT y ASX por NLRP3, mientras que, por otro lado, hubo una diferencia significativa por parte de H₂O₂ respecto a ASX/ H₂O₂ con relación a la expresión de NLRP3.



B

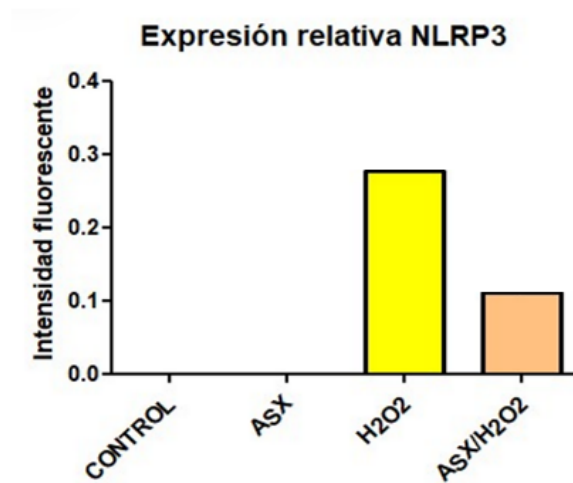


Figura 10. Expresión relativa NLRP3. A. Imágenes representativas de NRPL3. B. Condición CT y ASX no expresaron NLRP3, mientras que la condición H₂O₂ y ASX/ H₂O₂, si expresaron. Los resultados se expresan como un promedio de 12 células HT22. Los valores corresponden a un n=1 (análisis de 1 replica)

DISCUSIÓN.

Si bien existe una gran variedad de enfermedades neurodegenerativas y cada una de estas tienen características patológicas particulares, el cuadro patológico que muchas comparten, son las mitocondrias disfuncionales que junto al estrés oxidativo producido por una acumulación excesiva de ROS contribuyen a un aumento en la respuesta inflamatoria, conllevando a la muerte neuronal y finalmente a la neurodegeneración [1,2,3].

En relación con las terapias para enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson se han utilizado diversas; sin embargo, su eficacia es limitada por lo que es un área de investigación activa y en evolución. Recientemente se ha utilizado la inmunoterapia utilizando los anticuerpos monoclonales, así como también, la terapia génica y el uso de células madre [73,74,75]. A pesar de los esfuerzos hasta la fecha no existe una cura para muchas de estas enfermedades.

Varios estudios realizados en modelos in vitro e in vivo en enfermedades neurodegenerativas han mostrado algunos resultados positivos de algunos antioxidantes y aunque los antioxidantes se han estudiado ampliamente como una estrategia alternativa para prevenir o tratar estas enfermedades, todavía se necesita evidencia directa para respaldar su uso en el tratamiento de pacientes que padecen estas complicaciones [76,77]. Dentro de los antioxidantes que se han utilizado para investigación tenemos la vitamina C, la vitamina E, el resveratrol y la coenzima Q10 [78,79,80,81].

ASX es un carotenoide natural lipofílico, que tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y que en concentraciones pequeñas es neuroprotector. No obstante, de manera similar que otras moléculas antioxidantes, en concentraciones altas, tiene un efecto tóxico para la célula, disminuyendo la actividad metabólica y la funcionalidad mitocondrial. Es por esto que se debe estudiar cual es la concentración en que estas moléculas tienen un efecto terapéutico.

Aquí, estudiamos las propiedades neuroprotectoras de la ASX en la función y dinámica mitocondrial relacionado a la neuroinflamación en un modelo celular de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en cultivos de líneas celulares inmortalizadas de hipocampo (HT22).

Si bien, existen controversia sobre el ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular, se ha visto que la actividad metabólica de la mitocondria está estrechamente relacionada con las vías del estrés mitocondrial, la autofagia y la apoptosis [82]. Respecto al ensayo MTT, se pudo observar que a una concentración alta de H_2O_2 (200 μM), la función mitocondrial decayó más del 60%, probablemente debido a las altas concentraciones de ROS que se producen y la insuficiente capacidad para eliminarlo totalmente. A esta concentración el tratamiento de ASX no fue capaz de revertir el daño mitocondrial. Por el contrario, usando una concentración más baja de H_2O_2 , solo es afectada la función mitocondrial en un 30%, condición en la cual la ASX en sus 3 concentraciones (100 nM, 1 μM y 10 μM), pudo generar un efecto neuroprotector, mejorando la funcionalidad mitocondrial y, por ende, su actividad metabólica. Debido a esto se utilizó en la segunda parte de los experimentos una concentración de 50 μM de peróxido para realizar el insulto neurotóxico.

Al ser la mitocondria un organelo celular esencial en la producción de energía, el metabolismo y la regulación del estrés oxidativo en las células [83,84], en este trabajo se estudió la dinámica mitocondrial, que incluye procesos de fusión y fisión fundamentales para mantener la salud y la función adecuada de estos orgánulos. Sin embargo, la disfunción mitocondrial, causada por factores como mutaciones genéticas o estrés oxidativo, puede llevar a un desequilibrio de la dinámica mitocondrial, relacionándose a trastornos y enfermedades como neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento [34,35].

Para estudiar la dinámica mitocondrial se visualizó la mitocondria usando el marcador mitocondrial Mitotracker, el cual es una sonda fluorescente cargada que llega al interior mitocondrial debido a su potencial de membrana [85]. Con la ayuda de las extensiones

del programa Image J (NHI) pudimos contar el número de objetos detectados en las distintas condiciones calculando también el volumen relativo de cada uno de los objetos detectados. Respecto a lo obtenido, tenemos que al exponer las HT22 al insulto neurotóxico, el número de mitocondrias aumentó y su volumen relativo disminuyó lo que sugiere que las mitocondrias sufrieron un proceso de fragmentación causado por fisión mitocondrial (Figura 4). Este efecto que tiene el H_2O_2 en la mitocondria es consistente con otros trabajos previos, que muestran activación de proteínas vinculadas con la fisión mitocondrial, inhibición de la fusión mitocondrial o daño directo en las membranas de la mitocondria [86]. Cabe destacar el efecto neuroprotector de la ASX disminuyendo el daño y la fragmentación mitocondrial inducida por el H_2O_2 , consistente con el aumento en la función mitocondrial, observado en el ensayo de MTT.

De manera interesante e inesperadamente, la condición con células HT22 pre-tratadas sólo con ASX, destacó en el análisis de objetos 3D, por el gran número de objetos detectados, asociándose a un gran número de mitocondrias. En un inicio, se pensó que ASX estaba generando un efecto tóxico en las células HT22, vinculando este proceso a fisión mitocondrial, sin embargo, esta hipótesis no era coherente al analizar la condición ASX/ H_2O_2 . Por esta razón, se hizo un segundo análisis, pero esta vez del volumen mitocondrial (μm^3), mostrando que el volumen en esta condición de objetos encontrados era similar a la condición control, mientras que el volumen de los objetos encontrados con la condición H_2O_2 era mucho menor, comprobando que estábamos frente a otro proceso celular que sugiere fuertemente que se trata de biogénesis mitocondrial. Lamentablemente, el uso de mitotracker no permite discriminar si uno está viendo, fisión mitocondrial o biogénesis mitocondrial [87]. Debido a lo anterior, se hace necesario el uso de otras técnicas como microscopia electrónica para poder decir que ASX induce biogénesis mitocondrial. No obstante, diversos artículos mostraron que ASX promueve la formación de mitocondrias, vinculándose con la biogénesis mitocondrial (mitogenesis) mediante el regulador PGC-1 α y la activación de TFAM [88,89]. Como también se demostró que la ASX induce mitofagia mediante la activación de PINK1 y PARKIN y la inhibición de AKT/ mTOR [89].

Por esta razón, se propone que en futuros trabajos que se quiera estudiar la dinámica mitocondrial o la biogénesis, se haga por medio de microscopia electrónica o que se complemente por medio de qPCR, Western-blots o inmunofluorescencia para ver la expresión de Drp-1, que regula la fisión mitocondrial por medio de la membrana externa, junto a la expresión de PGC-1a, como regulador clave en la biogénesis mitocondrial.

En el contexto inflamatorio, se ha visto que la producción de ROS y el daño mitocondrial son esenciales para la activación del inflamasoma NLRP3 [90], y estudios anteriores han aclarado que las ROS desempeñan un papel en la producción de citocinas inflamatorias en respuesta al LPS [92,93], como también se ha demostrado que desempeña un papel importante en la activación del inflamasoma NLRP3 [91]. Lo anterior es consistente con nuestro modelo de toxicidad por H₂O₂ que activa mecanismos inflamatorios por medio del estrés oxidativo, desencadenando en este caso la activación del inflamasoma NLRP3.

En nuestro trabajo pudimos visualizar que en condiciones control NLRP3 no se puede detectar lo que sugiere que el inflamasoma no está activo. Sin embargo, al inducir un estímulo tóxico, aumenta la expresión de NLRP3 lo cual es consistente con la activación de la respuesta inflamatoria. En células pretratadas con ASX disminuyeron la respuesta inflamatoria respecto a células estimuladas con H₂O₂. No se pudo calcular la estadística debido a que realizamos solo una réplica, por lo que esperamos en el futuro realizar más repeticiones para tener resultados consistentes. Además, se pretende próximamente complementar con el estudio de otros marcadores inflamatorios como ASC, caspasa-1 o NF-KB.

Es interesante que datos de la literatura indican que PGC1a es el principal regulador de la biogénesis mitocondrial activando la expresión de varios factores de transcripción posteriores, como el factor NRF1 y 2 [92]. Nrf2 regula el inflamasoma NLRP3 y es uno de los blancos de la ASX a nivel transcripcional [93], siendo el eje NLRP3-Nrf2 un foco interesante para estudios posteriores.

CONCLUSIONES

Este estudio proporciona evidencia del potencial neuroprotector y antiinflamatorio que posee ASX en el contexto de enfermedades neurodegenerativas, destacando de manera prometedora en el desarrollo de futuras investigaciones, aceptando la hipótesis planteada en este trabajo debido a los siguientes resultados:

1. En presencia del modelo de toxicidad planteado, ASX protege la actividad metabólica y, por ende, la función mitocondrial.
2. ASX previno la fragmentación mitocondrial inducida por H₂O₂.
3. Se sugiere que ASX promueve la biogénesis mitocondrial.
4. ASX disminuyó la expresión de la proteína del inflamasoma NLRP3 inducida por H₂O₂.

BIBLIOGRAFÍA

1.Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binvignat O, Auladell C, et al. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications. Vol. 32, Journal of Psychopharmacology. 2018.

2.Binvignat O, Olloquequi J. Excitotoxicity as a Target Against Neurodegenerative Processes. Current Pharmaceutical Design. 2020;26(12).

3.Jeong YH, Oh YC, Kim TI, Bae JS, Ma JY. The Neuroprotective Effects of Arecae Pericarpium against Glutamate-Induced HT22 Cell Cytotoxicity. Current Issues in Molecular Biology. 2022;44(12).

4. Jo HS, Kim DW, Shin MJ, Cho S bin, Park JH, Lee CH, et al. Tat-HSP22 inhibits oxidative stress-induced hippocampal neuronal cell death by regulation of the mitochondrial pathway. Molecular Brain. 2017;10(1).

5.Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. Vol. 86, Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2004.

6.Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD. Researching glutamate – induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2015;9.

7.Wu Y, Chen M, Jiang J. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and drug targets via apoptotic signaling. Vol. 49, Mitochondrion. 2019.

8.Verma M, Lizama BN, Chu CT. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. Vol. 11, Translational Neurodegeneration. 2022.

9. Guo C, Ma YY. Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. Vol. 15, *Frontiers in Neural Circuits*. 2021.
10. Fassbender JM, Whittemore SR, Hagg T. Targeting Microvasculature for Neuroprotection after SCI. Vol. 8, *Neurotherapeutics*. 2011.
11. Zhiming WU, Wang H, Fang S, Xu C. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(5).
12. Wang X, Iyaswamy A, Xu D, Krishnamoorthi S, Sreenivasmurthy SG, Yang Y, et al. Real-Time Detection and Visualization of Amyloid- β Aggregates Induced by Hydrogen Peroxide in Cell and Mouse Models of Alzheimer's Disease. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2022;
13. Wang X, He X, Deng X, He Y, Zhou X. Roles of miR-4463 in H₂O₂-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Molecular Medicine Reports*. 2017;16(3).
14. Cheng B, Lu H, Bai B, Chen J. D- β -Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H₂O₂ via inhibiting oxidative stress. *Neurochemistry International*. 2013;62(5).
15. Ghaffari H, Venkataramana M, Jalali Ghassam B, Chandra Nayaka S, Nataraju A, Geetha NP, et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sciences*. 2014;113(1–2).
16. Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. Vol. 24, *Molecules*. 2019.
17. Salim S. Oxidative stress and the central nervous system. Vol. 360, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2017.

- 18.Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. Vol. 1863, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2017.
- 19.Vriend J, Reiter RJ. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: A review of its regulation by melatonin and the proteasome. Vol. 401, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015.
- 20.Varghese N, Werner S, Grimm A, Eckert A. Dietary mitophagy enhancer: A strategy for healthy brain aging? Vol. 9, *Antioxidants*. 2020.
- 21.Sun J, Roy S. Gene-based therapies for neurodegenerative diseases. Vol. 24, *Nature Neuroscience*. 2021.
- 22.Chen L, Sun L, Liu Z, Wang H, Xu C. Protection afforded by quercetin against H₂O₂-induced apoptosis on PC12 cells via activating PI3K/Akt signal pathway. *Journal of Receptors and Signal Transduction*. 2016;36(1).
- 23.Simpson DSA, Oliver PL. Ros generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. Vol. 9, *Antioxidants*. 2020.
- 24.Nicholls D. Mitochondrial Dysfunction and Glutamate Excitotoxicity Studied in Primary Neuronal Cultures. *Current Molecular Medicine*. 2005;4(2).
- 25.Ma Z a. The role of peroxidation of mitochondrial membrane phospholipids in pancreatic β -cell failure. *Current diabetes reviews*. 2012;8(1).
- 26.Peng W, Chen Y, Tumilty S, Liu L, Luo L, Yin H, et al. Paeoniflorin is a promising natural monomer for neurodegenerative diseases via modulation of Ca²⁺ and ROS homeostasis. Vol. 62, *Current Opinion in Pharmacology*. 2022.

- 27.Grimm A, Eckert A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. Vol. 143, Journal of Neurochemistry. 2017.
- 28.Shah SZA, Zhao D, Hussain T, Yang L. Role of the AMPK pathway in promoting autophagic flux via modulating mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases: Insight into prion diseases. Vol. 40, Ageing Research Reviews. 2017.
- 29.Chen Y, Zhang H, Jenny H, Ji W, Min W. Mitochondrial redox signaling and tumor progression. Vol. 8, Cancers. 2016.
- 30.Frohman MA. Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. Vol. 93, Journal of Molecular Medicine. 2015.
- 31.Alarcon-Aguilar. Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. Gaceta medica en México. 2019.
- 32.Chan DC. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. Vol. 125, Cell. 2006.
- 33.Wang X, Xue Y, Yao Y, Li Y, Ji X, Chi T, et al. PINK1 regulates mitochondrial fission/fusion and neuroinflammation in β -amyloid-induced Alzheimer's disease models. Neurochemistry International. 2022;154.
- 34.Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. Nature Neuroscience. 2019;22(3).
- 35.Pérez MJ, Ponce DP, Aranguiz A, Behrens MI, Quintanilla RA. Mitochondrial permeability transition pore contributes to mitochondrial dysfunction in fibroblasts of patients with sporadic Alzheimer's disease. Redox Biology. 2018;19.

36. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. Vol. 98, *Physiological Reviews*. 2018.
37. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. Vol. 23, *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2017.
38. Austin S, St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. Vol. 125, *Journal of Cell Science*. 2012.
39. Zhu Z, Wang X, Song Z, Zuo X, Ma Y, Zhang Z, et al. Photobiomodulation promotes repair following spinal cord injury by restoring neuronal mitochondrial bioenergetics via AMPK/PGC-1 α /TFAM pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.
40. Culmsee C, Michels S, Scheu S, Arolt V, Dannlowski U, Alferink J. Mitochondria, microglia, and the immune system — How are they linked in affective disorders? *Frontiers in Psychiatry*. 2019;10(JAN).
41. Iorio R, Celenza G, Petricca S. Multi-Target Effects of β -Caryophyllene and Carnosic Acid at the Crossroads of Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration: From Oxidative Stress to Microglia-Mediated Neuroinflammation. Vol. 11, *Antioxidants*. 2022.
42. Harland M, Torres S, Liu J, Wang X. Neuronal mitochondria modulation of LPS-induced neuroinflammation. *Journal of Neuroscience*. 2020;40(8).
43. M. Wilkins H, H. Swerdlow R. Relationships Between Mitochondria and Neuroinflammation: Implications for Alzheimer's Disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2015;16(8).

- 44.Dai Y, Wei T, Shen Z, Bei Y, Lin H, Dai H. Classical HDACs in the regulation of neuroinflammation. *Neurochemistry International*. 2021;150.
- 45.Glezer I, Simard AR, Rivest S. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. Vol. 147, *Neuroscience*. 2007.
- 46.Castino R, Bellio N, Nicotra G, Follo C, Trincheri NF, Isidoro C. Cathepsin D-Bax death pathway in oxidative stressed neuroblastoma cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;42(9).
- 47.Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: Role of TNF. Vol. 2015, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015.
- 48.Wang X jun, Chen W, Fu X ting, Ma J kui, Wang M hong, Hou Y jun, et al. Reversal of homocysteine-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by astaxanthin: evidences for mitochondrial dysfunction and signaling crosstalk. *Cell Death Discovery*. 2018;4(1).
- 49.Jayaraj RL, Rodriguez EA, Wang Y, Block ML. Outdoor Ambient Air Pollution and Neurodegenerative Diseases: the Neuroinflammation Hypothesis. Vol. 4, *Current environmental health reports*. 2017.
- 50.Solleiro-Villavicencio H, Rivas-Arancibia S. Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. Vol. 12, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018.
- 51.Dominic A, Le NT, Takahashi M. Loop Between NLRP3 Inflammasome and Reactive Oxygen Species. Vol. 36, *Antioxidants and Redox Signaling*. 2022.

52.de Araújo Boleti AP, de Oliveira Flores TM, Moreno SE, Anjos L dos, Mortari MR, Migliolo L. Neuroinflammation: An overview of neurodegenerative and metabolic diseases and of biotechnological studies. Vol. 136, *Neurochemistry International*. 2020.

53.Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*. 2002;10(2).

54.Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. Vol. 8, *Journal of Inflammation Research*. 2015.

55.Anderson FL, Biggs KE, Rankin BE, Havrda MC. NLRP3 inflammasome in neurodegenerative disease. Vol. 252, *Translational Research*. 2023.

56.Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Vol. 10, *Nature Reviews Immunology*. 2010.

57.Sharma D, Kanneganti TD. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. Vol. 213, *Journal of Cell Biology*. 2016.

58.Zhao S, Chen F, Yin Q, Wang D, Han W, Zhang Y. Reactive Oxygen Species Interact With NLRP3 Inflammasomes and Are Involved in the Inflammation of Sepsis: From Mechanism to Treatment of Progression. Vol. 11, *Frontiers in Physiology*. 2020.

59.Li L, Gao P, Tang X, Liu Z, Cao M, Luo R, et al. CB1R-stabilized NLRP3 inflammasome drives antipsychotics cardiotoxicity. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1).

60. Choi DW. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. Vol. 14, Frontiers in Neuroscience. 2020.

61. Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Ianora A, et al. On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? Vol. 16, Marine Drugs. 2018.

62. Kidd P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. Vol. 16, Alternative Medicine Review. 2011.

63. Wu H, Niu H, Shao A, Wu C, Dixon BJ, Zhang J, et al. Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases. Vol. 13, Marine Drugs. 2015.

64. Zhang Y, Ye Y, Ding W, Mao X, Li Y, Gerken H, et al. Astaxanthin is ketolated from zeaxanthin independent of fatty acid synthesis in *chromochloris zofingiensis*. Plant Physiology. 2020;183(3).

65. García F, Lobos P, Ponce A, Cataldo K, Meza D, Farías P, et al. Astaxanthin counteracts excitotoxicity and reduces the ensuing increases in calcium levels and mitochondrial reactive oxygen species generation. Marine Drugs. 2020;18(6).

66. Grimmig B, Hudson C, Moss L, Peters M, Subbarayan M, Weeber EJ, et al. Astaxanthin supplementation modulates cognitive function and synaptic plasticity in young and aged mice. GeroScience. 2019;41(1).

67. Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin. Vol. 14, Marine Drugs. 2016.

68. Urakaze M, Kobashi C, Satou Y, Shigeta K, Toshima M, Takagi M, et al. The beneficial effects of astaxanthin on glucose metabolism and modified low-density lipoprotein in healthy volunteers and subjects with prediabetes. Nutrients. 2021;13(12).

69.Lobos P, Bruna B, Cordova A, Barattini P, Galáz JL, Adasme T, et al. Astaxanthin protects primary hippocampal neurons against noxious effects of A β -oligomers. *Neural Plasticity*. 2016;2016.

70.McCarty MF, Dinicolantonio JJ, Lerner A. A fundamental role for oxidants and intracellular calcium signals in Alzheimer's pathogenesis—and how a comprehensive antioxidant strategy may aid prevention of this disorder. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. 2021.

71.Wang M, Deng X, Xie Y, Chen Y. Astaxanthin attenuates neuroinflammation in status epilepticus rats by regulating the atp-p2x7r signal. *Drug Design, Development and Therapy*. 2020;14.

72.Zhou X yan, Zhang F, Hu X tong, Chen J, Tang R xian, Zheng K yang, et al. Depression can be prevented by astaxanthin through inhibition of hippocampal inflammation in diabetic mice. *Brain Research*. 2017;1657.

73.Staff NP, Jones DT, Singer W. Mesenchymal Stromal Cell Therapies for Neurodegenerative Diseases. Vol. 94, *Mayo Clinic Proceedings*. 2019.

74.Fields M, Marcuzzi A, Gonelli A, Celeghini C, Maximova N, Rimondi E. Mitochondria-Targeted Antioxidants, an Innovative Class of Antioxidant Compounds for Neurodegenerative Diseases: Perspectives and Limitations. Vol. 24, *International Journal of Molecular Sciences*. 2023.

75.Winiarska-Mieczan A, Baranowska-Wójcik E, Kwiecień M, Grela ER, Szwajgier D, Kwiatkowska K, et al. The role of dietary antioxidants in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and their impact on cerebral oxidoreductive balance. Vol. 12, *Nutrients*. 2020.

76.Kocot J, Luchowska-Kocot D, Kiełczykowska M, Musik I, Kurzepa J. Does vitamin c influence neurodegenerative diseases and psychiatric disorders? Vol. 9, Nutrients. 2017.

77.da Cunha Germano BC, de Moraes LCC, Idalina Neta F, Fernandes ACL, Pinheiro FI, do Rego ACM, et al. Vitamin E and Its Molecular Effects in Experimental Models of Neurodegenerative Diseases. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. 2023.

78.Fukutomi R, Ohishi T, Koyama Y, Pervin M, Nakamura Y, Isemura M. Beneficial effects of epigallocatechin-3-o-gallate, chlorogenic acid, resveratrol, and curcumin on neurodegenerative diseases. Vol. 26, Molecules. 2021.

79.Arenas-Jal M, Suñé-Negre JM, García-Montoya E. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges. Vol. 19, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2020.

80.Fukutomi R, Ohishi T, Koyama Y, Pervin M, Nakamura Y, Isemura M. Beneficial effects of epigallocatechin-3-o-gallate, chlorogenic acid, resveratrol, and curcumin on neurodegenerative diseases. Vol. 26, Molecules. 2021.

81.Arenas-Jal M, Suñé-Negre JM, García-Montoya E. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges. Vol. 19, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2020.

82.Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. Cold Spring Harbor Protocols. 2018;2018(6).

83.Frohman MA. Role of mitochondrial lipids in guiding fission and fusion. Vol. 93, Journal of Molecular Medicine. 2015.

84. Alarcon-Aguilar. Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. *Gaceta medica en México*. 2019.

85. Kholmukhamedov A, Schwartz JM, Lemasters JJ. Mitotracker probes and mitochondrial membrane potential. *Shock*. 2013;39(6).

86. Su YC, Chiu HW, Hung JC, Hong JR. Beta-nodavirus B2 protein induces hydrogen peroxide production, leading to Drp1-recruited mitochondrial fragmentation and cell death via mitochondrial targeting. *Apoptosis*. 2014;19(10).

87. Shao CS, Zhou XH, Miao YH, Wang P, Zhang QQ, Huang Q. In situ observation of mitochondrial biogenesis as the early event of apoptosis. *iScience*. 2021;24(9).

88. Wang Y, Chen X, Baker JS, Davison GW, Xu S, Zhou Y, et al. Astaxanthin promotes mitochondrial biogenesis and antioxidant capacity in chronic high-intensity interval training. *European Journal of Nutrition*. 2023;62(3).

89. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Vol. 25, *Molecules*. 2020.

90. Platnich JM, Chung H, Lau A, Sandall CF, Bondzi-Simpson A, Chen HM, et al. Shiga Toxin/Lipopolysaccharide Activates Caspase-4 and Gasdermin D to Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species Upstream of the NLRP3 Inflammasome. *Cell Reports*. 2018;25(6).

91. Rajan S, Tryphena KP, Khan S, Vora L, Srivastava S, Singh SB, et al. Understanding the involvement of innate immunity and the Nrf2-NLRP3 axis on mitochondrial health in Parkinson's disease. Vol. 87, *Ageing Research Reviews*. 2023.

92. Austin S, St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism - emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. Vol. 125, *Journal of Cell Science*. 2012.

93. Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalapour S, Wong J, et al. NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell*. 2016;164(5).