



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

Treball Final de Grau

Grau de Farmàcia

INCORPORACIÓ DE SUBSTÀNCIES UBIQUÏTINADES EN ELS WASTEOSOMES (CORPORA AMYLACEA) DEL CERVELL HUMÀ

Maria Rodríguez Barrubés

Àmbit principal: Fisiologia i Fisiopatologia

Àmbits secundaris: Immunologia i Bioquímica i Biologia Molecular

Secció de Fisiologia

Departament de Bioquímica i Fisiologia

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Universitat de Barcelona

Barcelona, juny 2025



Aquesta obra està subjecta a una llicència [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Abreviatures

AD	<i>Alzheimer's Disease</i> , Malaltia d'Alzheimer
AF555 α -mo-IgG2a	Anticòs secundari conjugat amb Alexa Fluor 555
ALP	<i>Autophagic-lysosomal pathway</i> , via autofàgica-lisosomal
ARTAG	<i>Age-related tau astrogliopathy</i> , astrogliopatia lligada a l'edat
BB	<i>Blocking buffer</i> , tampó de bloqueig
BHE	Barrera hematoencefàlica
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina sèrica bovina
CAA	<i>Cerebral amyloid angiopathy</i> , angiopatia amiloide cerebral
FLR-Ubi	Ubiquitina marcada amb fluoresceïna
IF	Immunofluorescència
IgG2a anti-p62	Anticòs primari anti-p62
IgM	Immunoglobulina M
LCR	Líquid cefalorraquidi
NEs	Neoepítops
ON	<i>Overnight</i> , incubació durant la nit
p62	Proteïna p62/SQSTM1
PB1	Phox and Bem1p
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , tampó de fosfat salí
SNC	Sistema nerviós central
SVD MILD	<i>Small vessel disease</i> , malaltia de petits vasos lleu
UBA	<i>Ubiquitin-associated domain</i> , domini associat a l'ubiquitina
Ubi	Ubiquitina
UPS	<i>Ubiquitin-proteasome System</i> , sistema ubiquitina-proteosoma

Resum

Els wasteosomes, també coneguts com a cossos amilacis, són estructures esfèriques intracel·lulars que es formen principalment als astròcits del cervell humà. Estan constituïts per una matriu de poliglucosà que encapsula proteïnes i altres substàncies de rebuig, i es consideren part d'un sistema de neteja cerebral amb un possible paper neuroprotector. La presència de la proteïna p62 als wasteosomes suggereix que podrien incorporar i retenir substàncies ubiquïtinades, però aquest aspecte encara no s'ha demostrat.

Aquest treball té com a objectiu demostrar que els wasteosomes són capaços de captar i retenir substàncies ubiquïtinades. Per assolir aquest propòsit, s'han realitzat assajos d'immunofluorescència sobre talls d'hipocamp humà, amb l'objectiu d'estudiar si la monoubiquïtina i la tetraubiquïtina marcades amb fluorescència s'incorporen in vitro als wasteosomes. Paral·lelament, s'ha estudiat la col·localització d'aquestes formes d'ubiquïtina amb la proteïna p62, utilitzant el mateix mètode de marcatge fluorescent.

Els resultats obtinguts mostren la incorporació de la ubiquïtina fluorescent en els wasteosomes i la seva col·localització amb la proteïna p62 i, per tant, confirmen la hipòtesi inicial: els wasteosomes són capaços de captar substàncies ubiquïtinades. Aquesta capacitat es manifesta principalment a la regió perifèrica dels cossos i amb una cinètica similar per ambdues formes d'ubiquïtina.

Aquestes troballes reforcen la idea que els wasteosomes poden actuar com a mecanisme alternatiu per a l'eliminació de residus proteics, especialment en condicions en què els sistemes convencionals són disfuncionals. L'aportació més rellevant del treball és la demostració experimental d'aquesta funció activa en un context humà, i l'obertura a noves línies d'investigació en l'àmbit de les malalties neurodegeneratives.

Paraules clau: wasteosomes, neteja cerebral, paper neuroprotector, ubiquïtina, proteïna p62, immunofluorescència.

Abstract

INCORPORATION OF UBIQUITINATED SUBSTANCES INTO WASTEOSOMES (CORPORA AMYLACEA) OF THE HUMAN BRAIN

Wasteosomes, also known as corpora amylacea, are spherical intracellular structures that primarily form in astrocytes of the human brain. They are composed of a polyglucosan matrix that encapsulates proteins and other waste substances and are considered part of a brain clearance system with a potential neuroprotective role. The presence of the p62 protein in wasteosomes suggests that they may incorporate and retain ubiquitinated substances, although this aspect has not yet been demonstrated.

This study aims to demonstrate that wasteosomes are capable of capturing and retaining ubiquitinated substances. To achieve this goal, immunofluorescence assays were performed on human hippocampal sections to investigate whether fluorescently labeled mono- and tetraubiquitin are incorporated in vitro into wasteosomes. In parallel, the colocalization of these forms of ubiquitin with the p62 protein was examined using the same fluorescent labeling approach.

The results obtained show the incorporation of fluorescent ubiquitin into wasteosomes and its colocalization with the p62 protein, thereby confirming the initial hypothesis: wasteosomes are capable of capturing ubiquitinated substances. This capacity is mainly observed in the peripheral region of the bodies and displays similar kinetics for both forms of ubiquitin.

These findings support the idea that wasteosomes may act as an alternative mechanism for the elimination of protein waste, especially under conditions in which conventional systems are dysfunctional. The most significant contribution of this study is the experimental demonstration of this active function in a human context, opening new lines of research in the field of neurodegenerative diseases.

Keywords: wasteosomes, brain clearance, neuroprotective role, ubiquitin, p62 protein, immunofluorescence.

Integració d'àmbits

Aquest treball s'emmarca principalment dins de l'àmbit de la Fisiologia i Fisiopatologia, i integra també coneixements d'Immunologia i Bioquímica i Biologia Cel·lular.

I. Fisiologia i Fisiopatologia

L'objectiu principal d'aquest estudi ha estat aprofundir en el coneixement dels cossos amilacis, o també anomenats wasteosomes, unes estructures cel·lulars que es formen als astròcits i que estan implicades en l'eliminació de substàncies de rebuig del cervell. La seva caracterització pot contribuir a entendre millor els mecanismes fisiològics i fisiopatològics relacionats amb la neteja cerebral, el manteniment de l'homeòstasi neuronal i les disfuncions que es produeixen en malalties neurodegeneratives com ara l'Alzheimer.

II. Immunologia

Aquest treball utilitza tècniques immunològiques per estudiar la interacció entre la proteïna p62, present als wasteosomes, i la ubiquitina. Mitjançant immunofluorescència amb anticossos específics, s'ha explorat el paper de la proteïna p62 en la captació de substàncies ubiquitinades, aportant noves dades sobre el possible paper dels wasteosomes en l'eliminació de residus cel·lulars.

III. Bioquímica i Biologia Cel·lular

Els wasteosomes estan implicats en l'eliminació de substàncies de rebuig ubiquitinades, com ara proteïnes mal plegades o agregats proteics. El seu estudi permet aprofundir en els mecanismes de resposta cel·lular davant l'estrès proteostàtic i ajuda a entendre millor una via alternativa d'eliminació que complementa els sistemes de degradació convencionals, com l'autofàgia i el proteosoma.

Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS)

Aquest treball es relaciona amb diversos Objectius de Desenvolupament Sostenible (ODS) establerts per les Nacions Unides, ja que aborda aspectes relacionats amb la salut, la gestió responsable de productes químics i la innovació científica.

En primer lloc, el treball té relació amb l'ODS 3: *“Salut i Benestar”*, una comprensió més precisa i detallada de la formació, composició i funció dels cossos amilacis al sistema nerviós central podria facilitar el diagnòstic precoç de certes malalties neurodegeneratives. Això permetria establir tractaments en fases inicials, millorant la qualitat de vida dels pacients. Aquest enfocament està directament relacionat amb l'apartat 3.D, que té com objectiu reforçar la capacitat de tots els països per millorar l'alerta primerenca, la reducció de riscos i la gestió dels riscos per a la salut nacional i mundial.

D'altra banda, aquest treball també s'alinea amb l'ODS 6: *“Aigua neta i Sanejament”*. La gestió adequada dels reactius utilitzats en el treball, seguint les directrius de la Unitat de Laboratoris Docents de la facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, contribueix directament a la fita 6.3. Aquesta té com a finalitat millorar la qualitat de l'aigua reduint la contaminació, eliminant l'abocament i minimitzant l'alliberament de productes químics i materials perillosos. També pretén reduir a la meitat la quantitat d'aigües residuals no tractades i incrementar de manera significativa el reciclatge i la reutilització segura a escala global.

Finalment, l'estudi també té un impacte positiu en l'ODS 9: *“Indústria, innovació i infraestructura”*, ja que fomenta la innovació científica en l'àmbit de les neurociències i en la recerca biomèdica en general, contribuint al progrés tecnològic i al desenvolupament de nous enfocaments diagnòstics i terapèutics. Això està alineat amb l'apartat 9.5, que pretén millorar la investigació científica, fomentar la innovació i augmentar el nombre de treballadors en recerca i desenvolupament.

Índex

INTRODUCCIÓ	1
OBJECTIUS/HIPÒTESI.....	7
MATERIAL I MÈTODES	8
1. Disseny experimental.....	8
2. Mostres d'hipocamp humà.....	8
3. Metodologia	9
3.1. IF – Anticossos primaris	9
3.2. IF – Anticossos secundaris.....	10
3.3. Incorporació de l'Ubi.....	11
3.4. Observació i anàlisi de mostres.....	11
RESULTATS.....	13
1. Prova 1: Estudi preliminar de la unió de mono-Ubi als wasteosomes.....	13
2. Prova 2: Estudi de la col·localització entre mono-Ubi i p62	14
3. Prova 3: Determinació temporal de la unió entre mono-Ubi i els wasteosomes	15
4. Prova 4: Estudi de la col·localització entre tetra-Ubi i p62	17
5. Prova 5: Determinació temporal de la unió entre tetra-Ubi i els wasteosomes	19
DISCUSSIÓ.....	21
CONCLUSIONS.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	26

INTRODUCCIÓ

La degradació de proteïnes constitueix un procés fonamental pel manteniment de l'homeòstasi cel·lular, ja que permet l'eliminació de proteïnes mal plegades, danyades o que han complert la seva funció. La seva desregulació pot conduir a l'acumulació de proteïnes tòxiques i, consegüentment, al desenvolupament de condicions patològiques, com les malalties neurodegeneratives o el càncer (1–3). El procés de degradació es duu a terme principalment mitjançant dos grans sistemes proteolítics intracel·lulars: el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) i la via autofàgica-lisosomal (ALP).

L'UPS constitueix la via principal de degradació de proteïnes solubles de vida curta, així com de proteïnes mal plegades. Aquest mecanisme es basa en la conjugació de la ubiquitina (Ubi) a les proteïnes objectiu a través dels residus de lisina 48 (K48), la qual cosa actua com a senyal de reconeixement pel proteosoma. El proteosoma és un complex proteolític multicatalític que degrada les proteïnes marcades i allibera pèptids petits i Ubi reciclable. No obstant això, quan el proteosoma se satura o esdevé disfuncional s'activa un mecanisme alternatiu de degradació: l'autofàgia (4).

L'ALP permet la degradació de components citoplasmàtics més grans i heterogenis, com ara agregats proteics, orgànuls danyats i incusions citoplasmàtiques. Es distingeixen tres tipus principals d'autofàgia: l'autofàgia mediada per xaperones, la microautofàgia i la macroautofàgia, essent aquesta última la més rellevant. La macroautofàgia implica la formació d'un autofagosoma, una estructura de doble membrana que envolta el material citoplasmàtic destinat a la degradació. Posteriorment, es fusiona amb el lisosoma, on el contingut és degradat. Tot i que inicialment es considerava que l'autofàgia era un procés no selectiu, s'ha demostrat que pot degradar de manera específica agregats proteics gràcies a la intervenció de proteïnes adaptadores com la proteïna p62/SQSTM1 (p62) (4,5).

La p62 és una proteïna adaptadora multifuncional que actua com a nexa entre l'UPS i l'ALP, facilitant l'eliminació d'agregats proteics. Conté un mòdul conservat a l'extrem N-terminal anomenat *Phox and Bem1p* (PB1), que permet la seva oligomerització i la interacció amb la proteïna quinasa C atípica. A més, presenta un domini associat a l'ubiquitina (UBA) a l'extrem C-terminal, que li permet unir-se específicament a l'Ubi. Originalment, la p62 va

ser identificada com una proteïna implicada en la degradació proteosomal, però estudis posteriors han demostrat que, quan el proteosoma esdevé disfuncional, la p62 facilita la redirecció de les proteïnes ubiquïtinades cap a l'autofagosoma. En aquest procés, la p62, amb el seu domini UBA, s'uneix a l'Ubi de les proteïnes que s'han de degradar i les transporta cap al fagòfor, la membrana inicial de l'autofagosoma, perquè siguin transferides al lisosoma. Aquest mecanisme està finament regulat per la fosforilació de la p62, que incrementa la seva afinitat per l'Ubi i, en conseqüència, la seva capacitat per arreplegar proteïnes agregades (6–8).

Un aspecte fonamental que comparteixen els sistemes UPS i ALP és l'ús de l'Ubi com a sistema de senyalització per a la degradació de substrats. Tot i unir-se a les proteïnes que s'han de degradar, l'Ubi també pot unir-se als seus residus interns de lisina, formant cadenes de diferents tipologies i funcions (9). Mentre que les cadenes de poliubiquïtina s'associen amb major freqüència a la degradació proteosomal, la monoubiquïtinació podria ser suficient com a senyal per l'autofàgia selectiva (4,5,10). No obstant això, la monoubiquïtinació presenta una menor afinitat per la p62, la qual cosa suggereix que altres factors, com l'oligomerització substrat-receptor, podrien tenir un paper determinant en la degradació selectiva de proteïnes monoubiquïtinades per autofàgia (6).

Estudis recents realitzats amb teixit cerebral han mostrat que la p62 es troba present en unes estructures cerebrals anomenades cossos amilacis o wasteosomes. Els wasteosomes van ser descrits per primera vegada al cervell humà per Purkinje i Virchow al segle XIX (11). Es formen als astròcits, especialment durant l'envelliment, i tendeixen a acumular-se en regions específiques en el curs de malalties neurodegeneratives (12) com ara la malaltia d'Alzheimer (AD) (13–15), el Parkinson (15) o l'Esclerosi Múltiple (16). Atesa la seva ubicació i composició, es considera que la seva funció principal és actuar com a dipòsit per a l'eliminació de residus del cervell (12,17).

Els wasteosomes són estructures esfèriques de poliglucosà, d'un diàmetre comprès entre 2 i 20 micròmetres (18). Estan constituïts principalment per hexoses polimeritzades (68,4%), juntament amb una fracció proteica (8,1%) i una part de composició indefinida (23,5%) (19). En relació amb la part proteica, s'ha identificat la presència de glucogen sintasa, necessària per a la formació de poliglucosà, així com d'Ubi i de p62, ambdues vinculades als

mecanismes de degradació i reciclatge de residus (20). També s'ha detectat la presència de neoepítops (NEs), que són epítops formats “de novo” en teixits o estructures que s'han d'eliminar i que no es troben en teixits sans (21). Els NEs poden ser reconeguts per anticossos naturals d'immunoglobulina M (IgM) (Figura 1), i la unió de les IgMs als NEs en facilita l'eliminació (22). L'existència de NEs als wasteosomes dificulta l'anàlisi detallada de la seva composició, ja que molts anticossos comercials utilitzats pel seu estudi presenten contaminació per IgMs. Quan aquestes interaccionen amb els NEs, poden generar falsos positius en les tincions dels cossos (22). A més, els wasteosomes contenen residus procedents de diferents tipus cel·lulars, com neurones i cèl·lules glials, i d'origen extern, probablement infeccions (20).

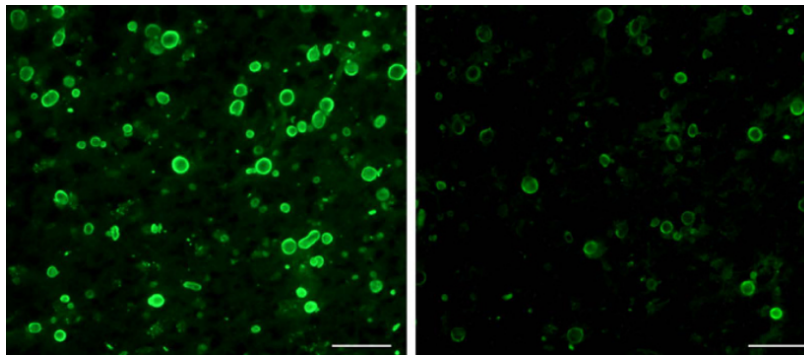


Figura 1: Seccions cerebrals d'un donant amb AD immunomarcades incubant primer les seccions amb plasma sanguini humà i posteriorment amb un anticòs anti-IgM humana conjugat amb el fluorocrom. A les dues imatges s'hi poden observar els wasteosomes marcats amb fluorescència. (20)

Estructuralment, els wasteosomes presenten una organització interna definida. En alguns casos tenen un nucli central compacte caracteritzat per una elevada concentració d'Ubi, que podria correspondre a la regió d'acumulació de substàncies de rebuig ubiquitinades. Al voltant d'aquest nucli, s'observa una àrea perifèrica rica en glucogen sintasa, p62 i Ubi (Figura 2). Aquesta zona podria actuar com una regió funcional activa on la p62 facilita la recollida de residus ubiquitinats, mentre que la glucogen sintasa s'encarrega de la seva encapsulació mitjançant la formació del component de poliglucosà (14,20,23).

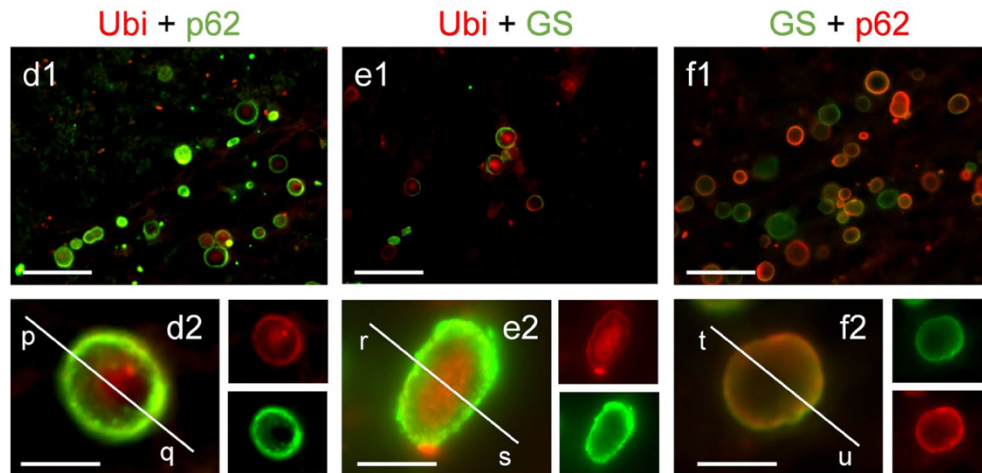


Figura 2: Doble immunotinció dels wasteosomes. Doble immunotinció amb anti-Ubi (vermell) i p62 (verd) (d1-d2). Doble immunotinció amb Ubi (vermell) i GS (verd) (e1-e2). Doble immunotinció amb GS (verd) i p62 (vermell) (f1-f2). En alguns CA, p62 i GS són clarament visibles a la regió perifèrica (d2, e2 i f2), mentre que l'Ubi es concentra a la zona central (d2 i e2), tot i que també és present a la perifèria. Les imatges reduïdes que acompanyen d2, e2 i f2 desglossen els canals de color per separat. Barra d'escala d1, e1, f1: 50µm. Barra d'escala d2, e2, f2: 10µm. (18)

Aquests cossos es formen als astròcits, cèl·lules de suport del cervell amb un paper essencial en l'homeòstasi del sistema nerviós central (SNC). La formació d'aquestes estructures és especialment freqüent en astròcits situats a les regions perivasculars, periventriculars i subpials, localitzades en proximitat a les cavitats que contenen o que estan connectades amb el líquid cefaloraquidi (LCR) (19). Des d'aquestes localitzacions, els astròcits poden alliberar els wasteosomes cap al LCR (24) i els wasteosomes podrien entrar posteriorment al sistema limfàtic meníngi (25). Aquest flux limfàtic segueix el trajecte cap als ganglis limfàtics cervicals (26,27) i finalitza als conductes limfàtic i toràcic dret, on el líquid és finalment drenat cap a les venes braquiocefàliques. Així doncs, els vasos limfàtics meníngis actuen com una via d'eliminació de macromolècules i dels wasteosomes del cervell mitjançant la recollida d'aquestes substàncies del LCR (Figura 3) (28).

Tal com s'ha comentat anteriorment, els wasteosomes contenen NEs que són reconeguts per IgM (22). No obstant això, aquesta interacció no pot produir-se dins del cervell, ja que els wasteosomes són estructures intra-astrocítiques i, per tant, es troben envoltades per la membrana dels astròcits (21,29). A més a més, les IgMs no poden travessar la barrera hematoencefàlica (BHE) (22). Tanmateix, quan els wasteosomes són transportats fins als

ganglis limfàtics cervicals, la interacció esdevé possible, fet que desencadena una resposta immunitària, incloent-hi la fagocitosi d'aquestes estructures per part de macròfags (12,30).



Figura 3: Possible ruta d'eliminació de residus cerebrals a través dels wasteosomes. El procés s'inicia als astròcits, que són els productors dels wasteosomes (1). Els wasteosomes s'alliberen al LCR, ja sigui a l'espai ventricular, a l'espai subaracnoïdal o mitjançant el sistema glimfàtic (2a, 2b, 2c). Des del LCR (3), els cossos accedeixen als vasos limfàtics de les meninges (4) i continuen el seu recorregut (5) fins arribar als ganglis limfàtics cervicals (6). En aquest punt, els macròfags poden fagocitar els CA mitjançant diversos mecanismes (7). (10)

La integració d'aquests coneixements – incloent-hi la presència d'Ubi i p62 en els wasteosomes, l'augment de la seva formació en situacions d'acumulació de productes de rebuig i la seva via d'eliminació – dona suport a la hipòtesi que els wasteosomes podrien actuar com una estratègia complexa per a l'eliminació de productes de rebuig al cervell.

A més, estudis recents han revelat que els wasteosomes de pacients amb AD presenten proteïna tau a la perifèria dels cossos, habitualment localitzada al mateix lloc que la p62, però no β -amiloide (31). De manera similar, en la degeneració lobar frontotemporal (FTLD), els wasteosomes poden contenir tau, TDP-43 o FUS, depenent la proteïnopatia del pacient (Figura 4) (32). Coincidentment, la proteïna β -amiloide no s'ubiquïtinitza, però les altres sí. Això suggereix que els wasteosomes podrien tenir una major capacitat per incorporar proteïnes ubiquïtinitzades, possiblement gràcies a la presència de dominis actius o no saturats de p62 en aquests cossos.

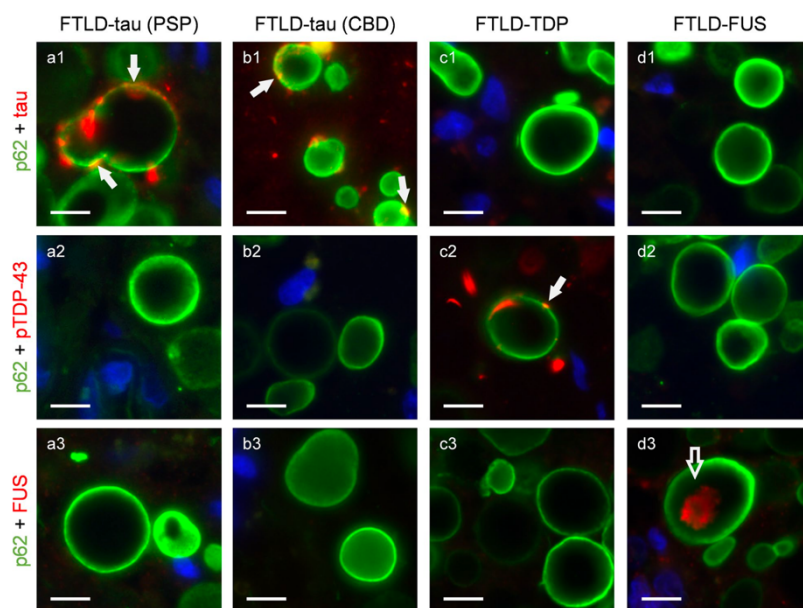


Figura 4: Presència de proteïnes associades a malalties neurodegeneratives en els wasteosomes. A1-a3 (PSP): Es detecta p62 (verd) i tau a la perifèria (vermell, a1), però no pTDP-43 (a2) ni FUS (a3). B1-b3 (CBD): Es detecta p62 (verd) i tau a la perifèria (vermell, b1), però no pTDP-42 (b2) ni FUS (b3). C1-c3 (FTLD-TDP): Es detecta p62 (verd) i pTDP-43 a la perifèria (vermell, c2), però no tau (c1) ni FUS (c3). D1-d3 (FTLD-FUS): Es detecta p62 (verd) i FUS al centre d'un wasteosome (vermell, d3), però no tau (d1) ni pTDP-43 (d2). Barra d'escala: 10 μ m. Abreviatures: CBD – degeneració corticobasal; FTLD – degeneració lobar frontotemporal; PSP – paràlisi supranuclear progressiva. (31)

OBJECTIUS/HIPÒTESI

La hipòtesi de partida del present treball és que els wasteosomes contenen p62 activa que pot atrapar substàncies ubiquitinades.

L'objectiu d'aquest treball és demostrar que els wasteosomes poden capturar substàncies ubiquitinades.

Per tal d'assolir aquest objectiu, es realitzaran estudis d'unió per avaluar la capacitat de l'Ubi d'interaccionar específicament amb els wasteosomes.

MATERIAL I MÈTODES

1. Disseny experimental

Els diferents experiments es van realitzar en mostres d'hipocamp humà, una regió amb una alta concentració de wasteosomes, i es van basar en tècniques de fluorescència i d'immunofluorescència (IF). Es va combinar l'ús d'Ubi marcada fluorescentment, per permetre'n el seguiment, amb el marcatge de la p62 utilitzant anticossos específics, per a la seva detecció. L'estudi es va dividir en tres fases principals.

En primer lloc, es va fer una incubació durant tota la nit (*overnight*, ON) a 4°C amb un anticòs primari monoclonal contra la p62 en les mostres d'hipocamp humà. L'endemà, les mostres es van incubar amb un anticòs secundari conjugat amb Alexa Fluor 555 (AF555 α -mo-IgG2a) durant 50 minuts a temperatura ambient. Finalment, es va preparar una solució d'Ubi marcada amb fluoresceïna (FLR-Ubi) i es va incorporar a la mostra. Després de la incubació, i sense fer cap rentat per a mantenir la possible interacció no covalent entre la p62 i l'Ubi, es van analitzar els resultats mitjançant microscòpia de fluorescència.

Amb l'objectiu d'identificar la metodologia més adequada per estudiar la interacció de l'Ubi amb els wasteosomes dels talls d'hipocamp, es van dur a terme diverses aproximacions experimentals. Es van dissenyar de manera iterativa i progressiva per ajustar paràmetres clau i optimitzar la detecció del senyal específic d'unió entre l'Ubi i els cossos. Per això, es van posar a prova diferents concentracions d'Ubi, es van comparar diferents molècules d'Ubi, es van assajar diversos temps d'incubació i es van provar diverses estratègies d'aplicació i retirada de compost fluorescent.

2. Mostres d'hipocamp humà

El Banc de Teixits Neurològics del Biobanc - Hospital Clínic - IDIBAPS (Barcelona, Espanya) va proporcionar seccions d'hipocamp criopreservades *post mortem* de 6 μ m de gruix procedents de pacients amb malalties neurològiques. Les mostres es van emmagatzemar a -80 °C fins al moment del seu ús.

La informació mèdica dels donants es recull a la [Taula 1](#). El primer cas correspon a un home de 94 anys classificat com a control, és a dir, sense diagnòstic clínic de malaltia neurodegenerativa. No obstant això, la caracterització neuropatològica post mortem revela alteracions cerebrals com la presència d'AD en un estadi moderat. El segon cas correspon a una dona de 92 anys amb diagnòstic clínic d'AD. L'examen neuropatològic post mortem confirma la presència d'aquesta malaltia.

Cas	Caracterització neuropatològica	Diagnòstic clínic	Sexe	Edat	Temps <i>post mortem</i>
1	AD	Control	Home	94	5:30
2	AD	AD	Dona	92	7:45

Taula 1: Dades mèdiques dels donants de les mostres d'hipocamp: número del cas, caracterització neuropatològica (*post mortem*), diagnòstic clínic, sexe, edat i temps *post mortem* (hores:minuts).

En les proves 1, 2 i 4, que s'expliquen més endavant, es va utilitzar el cas 1, i es va analitzar principalment la regió del solc hipocampal. En canvi, als experiments 3 i 5 es va fer servir el cas 2, del que es va estudiar el solc fimbriodontat.

La recerca ha estat aprovada pel Comitè de Bioètica de la Universitat de Barcelona, i tots els experiments amb mostres humanes s'han dut a terme seguint les normatives i directrius establertes.

3. Metodologia

3.1.IF – Anticossos primaris

Per a la detecció de la proteïna p62 en les mostres, es va emprar la tècnica d'immunofluorescència utilitzant un anticòs primari monoclonal de ratolí contra la p62 (IgG2a anti-p62).

En primer lloc, es va delimitar cada pou amb un retolador hidròfob per evitar la dispersió de reactius fora de la zona d'anàlisi. Posteriorment, les mostres criopreservades es van rehidratar en tampó de fosfat salí (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) durant 5 minuts, assegurant la recuperació de l'estat d'hidratació després del procés de fixació. Per verificar la morfologia

i condicions inicials de la mostra, es va observar al microscopi utilitzant els canals de fluorescència TRITC i FITC, així com el de camp clar, amb augments de 10x i 20x.

Seguidament, es va preparar una solució de tampó de bloqueig (*Blocking Buffer*, BB) amb un 1% d'albumina sèrum bovina (*Bovine Serum Albumin*, BSA) en PBS amb l'objectiu de reduir la unió inespecífica dels anticossos a la mostra. Mitjançant l'addició de Tritó X-100 al BB es va preparar una solució de BB-Tritó X-100 al 0,1%. El Tritó X-100 és un detergent no iònic que permeabilitza les membranes cel·lulars, facilitant l'accés dels anticossos a proteïnes intracel·lulars com la p62. Així, aquest pas optimitza la detecció específica de la proteïna d'interès. Cada pou es va tractar amb 120 µL de BB-Tritó al 0,1% durant 20 minuts a temperatura ambient. Durant aquest període d'incubació, es va preparar la solució de l'anticòs primari anti-p62 en BB, a una dilució final d'1:250.

Un cop finalitzada la incubació amb BB-Tritó X-100, es van realitzar dues rentades consecutives amb PBS durant 5 minuts cadascuna per eliminar qualsevol resta de reactius i reduir possibles unions inespecífiques. Finalment, cada pou es va incubar amb 120 µL de solució d'anticòs primari anti-p62 a 4°C ON.

3.2. IF – Anticossos secundaris

En aquest pas de la metodologia, es va aplicar un anticòs secundari específic per tal de detectar l'anticòs primari lligat a les mostres. El primer pas va consistir a preparar la dilució de l'anticòs secundari (AF555 α -mo-IgG2a) en BB (BB; PBS-BSA 1%) a una proporció d'1:250. És important treballar amb concentracions adequades per assegurar una cobertura suficient sense provocar una saturació de la mostra, la qual cosa podria generar soroll de fons i dificultar la interpretació dels resultats.

A continuació, les mostres es van rentar amb PBS i es van incubar amb 120 µL/pou de la solució diluïda d'anticòs secundari durant 50 minuts a temperatura ambient. Durant aquest temps, l'anticòs secundari marcat amb el fluorocrom AF555 s'uneix específicament a l'anticòs primari present a la mostra, cosa que permet la seva detecció i visualització amb microscòpia de fluorescència. Passat el temps d'incubació, les mostres es van rentar novament amb PBS.

Finalment, es van capturar imatges utilitzant un microscopi de fluorescència. Es van fer servir els canals TRITC i FITC, que permeten detectar l'emissió de llum en diferents longituds d'ona per identificar la fluorescència corresponent al fluorocrom AF555 i a la fluoresceïna. Per evitar la deshidratació de les mostres, es va fer l'observació amb una gota de PBS sobre els pous.

3.3. Incorporació de l'Ubi

El procediment general d'aquesta etapa va consistir en la preparació d'una dissolució d'Ubi en PBS a la concentració corresponent. Cal destacar que, en cap cas, l'Ubi es va sotmetre a agitació amb vòrtex per preservar la integritat estructural de la proteïna. A continuació, es va retirar la gota de PBS prèviament dipositada sobre la mostra, i es van aplicar 120 µL de la dissolució d'Ubi preparada sobre el tall d'hipocamp. Es va deixar incubar durant un període de temps determinat per afavorir la interacció amb els wasteosomes. Un cop finalitzat el temps d'incubació, la dissolució es va retirar per capil·laritat. Finalment, la mostra es va examinar mitjançant microscòpia de fluorescència, prenent imatges en diferents punts temporals per analitzar l'evolució de la senyal fluorescent.

Es van realitzar cinc assajos independents però complementaris que van permetre caracteritzar de manera progressiva el comportament d'unió tant de la mono com de la tetra-Ubi als wasteosomes. Els assajos van incloure tant estudis de col·localització com anàlisis de la dinàmica temporal de la interacció, oferint una visió més completa de la capacitat de reconeixement d'aquestes formes d'Ubi.

3.4. Observació i anàlisi de mostres

Per a l'estudi de les mostres, es va utilitzar un microscopi òptic i de fluorescència BX41 (Olympus, Alemanya). Les imatges es van obtenir amb el programa CellB (Olympus) i es van emmagatzemar en format TIFF per garantir-ne la qualitat i la compatibilitat amb el processament posterior.

Totes les imatges es van obtenir amb el mateix microscopi i amb ajustaments constants de llum o làser, així com configuracions idèntiques del programari CellB, assegurant la comparabilitat de les mostres.

Un cop adquirides les imatges, es van processar amb l'aplicació ImageJ (National Insitute of Health, USA). Es van realitzar ajustos en l'equilibri de colors per millorar-ne la visualització, aplicant el mateix tractament sempre a totes les fotografies. Finalment, es van fusionar les imatges corresponents per observar si hi havia col·locació entre la fluorescència de la p62 i de l'Ubi.

RESULTATS

1. Prova 1: Estudi preliminar de la unió de mono-Ubi als wasteosomes

L'objectiu inicial d'aquest experiment va ser avaluar la capacitat de la mono-Ubi per unir-se als wasteosomes, considerant que aquests contenen la p62.

Per comprovar-ho, es va incubar un tall d'hipocamp amb una dissolució de mono-Ubi marcada amb fluoresceïna (FLR-mono-Ubi) en PBS a una concentració de $6,34 \cdot 10^{-6}$ M (corresponent a $8,88 \cdot 10^{-10}$ mols en 140 μ L). Aquesta concentració es va determinar a partir de la revisió d'articles prèviament publicats que feien ús del mateix reactiu (33), així com d'assajos preliminars realitzats pel grup de recerca on s'ha desenvolupat aquest treball.

Es va capturar una imatge abans de la incubació amb Ubi (0 min), i després, el tall es va incubar durant 5 minuts a temperatura ambient. Un cop finalitzat el període, la dissolució de FLR-mono-Ubi es va retirar per capil·laritat. A continuació, es va procedir a l'observació mitjançant microscòpia de fluorescència, capturant imatges al minut 15.

Les imatges obtingudes (Figura 5) mostren absència de fluorescència en el temps 0, mentre que al cap de 15 minuts es detecta clarament marcatge fluorescent, suggerint que la FLR-mono-Ubi (verd) s'uneix de manera específica als wasteosomes.

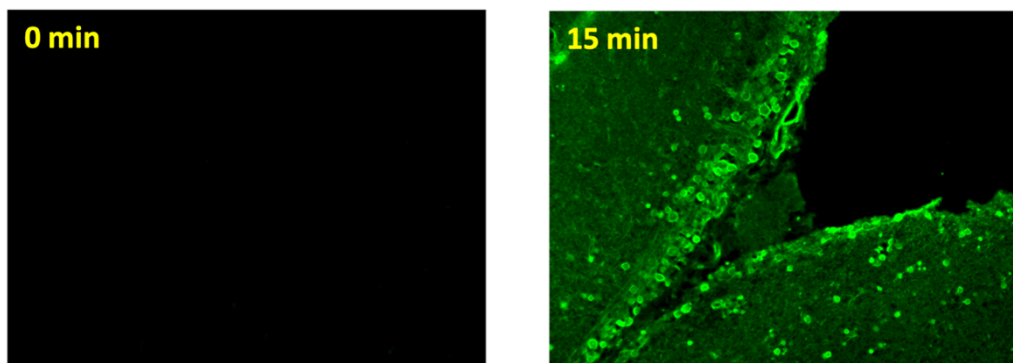


Figura 5: Imatges representatives del solc hipocampal que mostren la unió de la mono-Ubi als wasteosomes. La imatge “0 min” correspon al moment previ a l'aplicació de la solució d'Ubi, i mostra absència de senyal fluorescent. La imatge “15 min” ha estat capturada 15 minuts després de la retirada de la solució d'Ubi (després d'una incubació de 5 minuts) i mostra senyal de fluorescència verda, indicativa de la unió de l'Ubi als wasteosomes.

2. Prova 2: Estudi de la col·localització entre mono-Ubi i p62

La segona prova tenia com a finalitat determinar si la mono-Ubi mostrava una distribució similar a la p62 en els wasteosomes.

Amb aquest objectiu, es va marcar un tall d'hipocamp amb un anticòs primari específic contra p62. Posteriorment, i després d'una incubació ON, es va aplicar un anticòs secundari fluorescent dirigit contra l'anticòs primari. En acabar el període d'incubació de 50 minuts, es va prendre una imatge (temps 0) i es va afegir a la mostra una dissolució al $7,62 \cdot 10^{-6}$ M ($9,22 \cdot 10^{-10}$ mols en 140 μ L) de FLR-mono-Ubi en PBS. Es va deixar actuar durant 5 minuts i, un cop transcorregut aquest temps, la dissolució es va retirar per capil·laritat. Es va capturar una nova imatge al microscopi de fluorescència als 15 minuts.

La imatge feta al temps 0 de la [Figura 6](#) mostra el moment inicial, abans de l'addició de l'Ubi, per la qual cosa només s'hi observa la fluorescència associada a la p62 (vermella). Ara bé, en la imatge corresponent als 15 minuts s'hi observa superposició entre el senyal de p62 (vermell) i FLR-mono-Ubi (verd), evidenciant la col·localització entre les dues proteïnes. A més, es pot afirmar que l'anticòs anti-p62 no interfereix en aquesta unió, sinó que probablement reconeix un epítip diferent del lloc de fixació de la mono-Ubi, en el cas que aquesta s'uneixi a la p62.

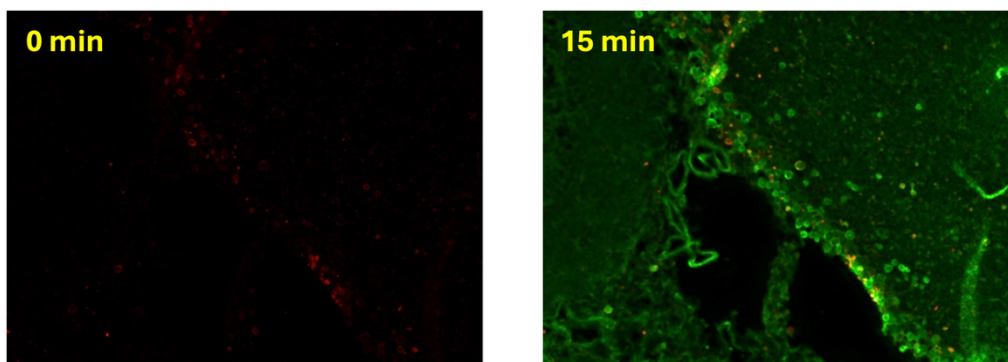


Figura 6: Imatges representatives del solc hipocampal que il·lustren la interacció entre la mono-Ubi i els wasteosomes marcats amb p62. La imatge corresponent a "0 min" reflecteix el moment inicial, abans de l'aplicació de la solució d'Ubi, on s'observa només fluorescència vermella associada a la p62, sense presència de senyal verda. En canvi, la imatge de "15 min", capturada quinze minuts després de retirar la solució d'Ubi (després d'una incubació prèvia de 5 minuts), mostra la superposició de les fluorescències verda (Ubi) i vermella (p62), evidenciant la col·localització entre ambdues proteïnes.

3. Prova 3: Determinació temporal de la unió entre mono-Ubi i els wasteosomes

A partir dels resultats obtinguts, es va dissenyar un tercer experiment amb l'objectiu d'estudiar l'evolució temporal de la unió entre mono-Ubi i els wasteosomes. Per tal d'aconseguir-ho, es va seguir el mateix protocol que a la prova 2, però amb la particularitat que, un cop retirada la dissolució de FLR-mono-Ubi i PBS, es van capturar imatges al microscopi cada minut per monitorar l'aparició de la fluorescència.

En aquest cas, es va utilitzar un nou lot de FLR-mono-Ubi, fet que va requerir un ajust de concentració. Després de diverses proves, es va determinar que calia duplicar la concentració emprada anteriorment. Així doncs, es va preparar una dissolució d' $1,64 \cdot 10^{-5}$ mols de FLR-mono-Ubi per cada litre de PBS ($18,4 \cdot 10^{-10}$ mols en 112 μ L).

La [Figura 7](#) mostra la seqüència d'imatges obtingudes. La primera imatge, indicada com a "Previ", es va capturar abans d'afegir l'Ubi per confirmar que el marcatge amb p62 s'havia fet correctament. La imatge corresponent al "0 min" es va obtenir al moment immediat posterior a l'addició i retirada d'excés de la dissolució d'Ubi fluorescent. A partir d'aquest moment, es van capturar imatges cada minut per seguir l'evolució de la fluorescència. S'observa una disminució ràpida de fluorescència inespecífica i una intensificació del senyal fluorescent verd en llocs específics a partir del minut 4, fet que indica l'inici de la unió entre la mono-Ubi marcada amb verd i els wasteosomes marcats amb p62 de color vermell.

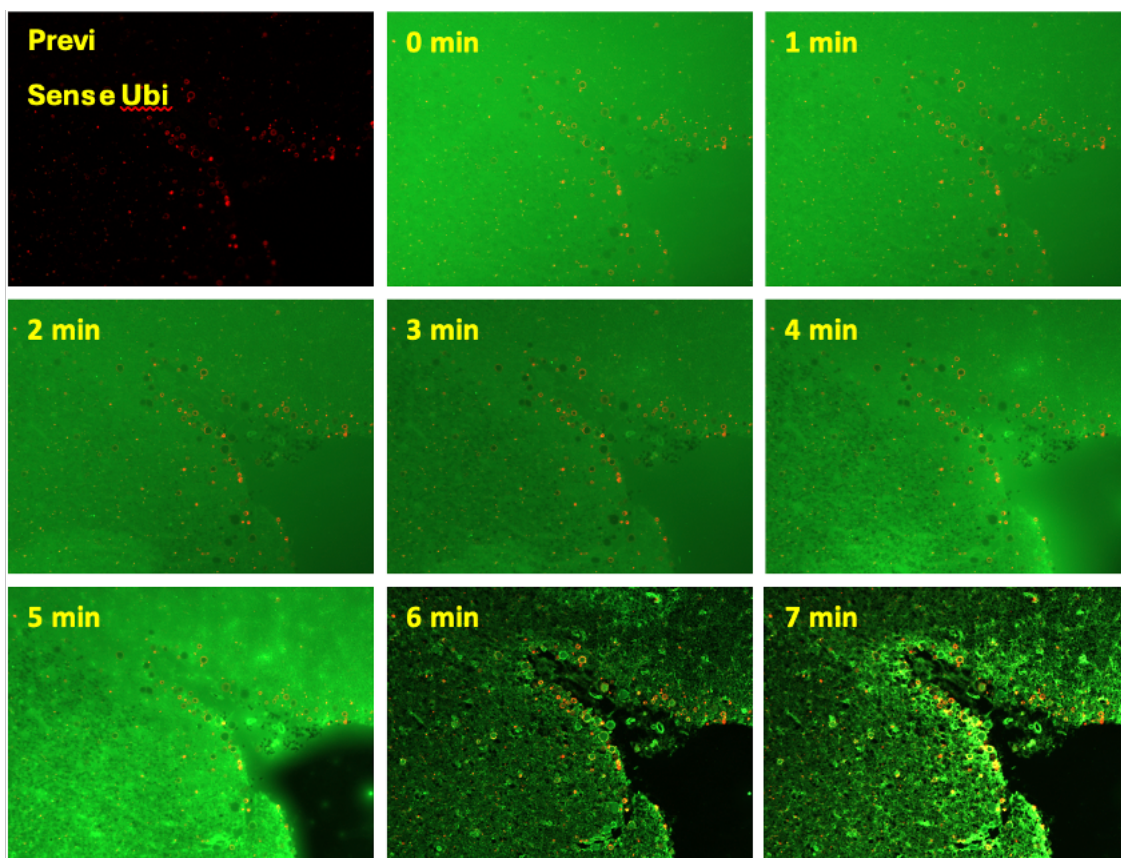


Figura 7: Seguiment temporal de la interacció entre mono-Ubi (verd) i els wasteosomes marcats amb p62 (vermell) al solc fimbriodontat. La imatge “Previ” mostra l’estat abans de l’addició de l’Ubi fluorescent, i revela el marcatge previ amb p62 en color vermell. La imatge “0 min” correspon al moment immediat posterior a l’addició i retirada d’excés de la dissolució d’Ubi fluorescent sobre el tall. A partir d’aquest moment, es van capturar imatges cada minut per monitorar l’evolució de la fluorescència verda associada a la mono-Ubi, representades a l’esquema amb la seva respectiva marca temporal. A partir del minut 4, s’observa una disminució ràpida de fluorescència inespecífica i una intensificació del senyal fluorescent verd en llocs específics, observant-se especialment la unió entre la mono-Ubi (verd) i els wasteosomes marcats amb p62 (vermell).

Tot i que la [Figura 7](#) mostra la progressió del senyal fluorescent verd de l’Ubi en una mateixa regió de l’hipocamp fins al minut 7, les observacions es van prolongar més enllà d’aquest temps. No obstant això, no es va detectar cap augment rellevant en la intensitat del senyal, fet que va motivar l’exploració d’altres àrees del tall d’hipocamp. Es van obtenir noves imatges a diferents augments (10x, 20x i 40x), que es presenten a la [Figura 8](#).

Aquestes imatges evidencien la col·localització entre la p62 i l’Ubi en les estructures destacades amb fletxes, que corresponen als wasteosomes. La col·localització és visualment detectable pel senyal de color groguenc, resultat de la superposició de la fluorescència

vermella (p62) i la verda (Ubi). Aquest patró de solapament reforça la hipòtesi d'una interacció entre ambdues proteïnes dins els wasteosomes.

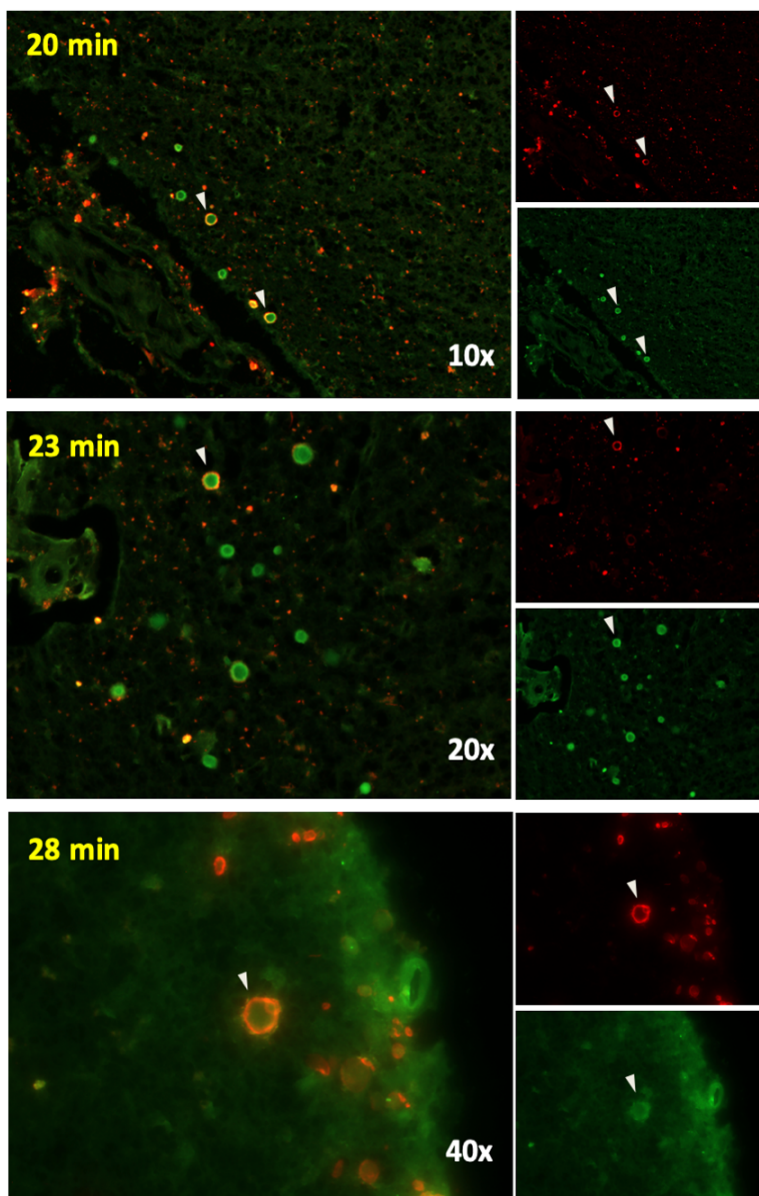


Figura 8: Imatges capturades als 20 minuts (10x), 23 minuts (20x) i 28 minuts (40x) després de retirar la dissolució de mono-Ubi. Mostren la col·localització perifèrica entre la p62 (fluorescència vermella) i la mono-Ubi (fluorescència verda), evidenciada per la presència d'un senyal groc degut a la superposició de les dues fluorescències. Les fletxes indiquen els wasteosomes que mostren de manera més clara aquesta col·localització. A la part lateral es mostren les imatges dels canals de fluorescència per separat, amb la p62 en vermell i l'Ubi en verd.

4. Prova 4: Estudi de la col·localització entre tetra-Ubi i p62

Per tal de determinar si els wasteosomes són capaços de capturar estructures més complexes, es va plantejar una quarta prova utilitzant tetra-Ubi. Aquesta molècula pot considerar-se una forma ubiquitinada d'Ubi i, per tant, representa un model més realista per a estudiar substrats ubiquitinats reals.

Atès que en les proves anteriors l'anticòs anti-p62 no havia interferit en la unió entre la mono-Ubi i la p62, es va assumir que tampoc ho faria amb la tetra-Ubi. Així doncs, es va seguir un protocol similar al de la prova 2: marcatge amb anticòs primari anti-p62, incubació ON i aplicació posterior d'un anticòs secundari fluorescent. Seguidament, la mostra es va incubar amb una dissolució de FLR-tetra-Ubi en PBS a una concentració d' $1,98 \cdot 10^{-6}$ M ($2,4 \cdot 10^{-10}$ mols en 121 μ L). Aquesta concentració es va escollir com equivalent funcional a la usada en els primers experiments amb mono-Ubi, amb ajustos per facilitar la preparació de la dissolució. Igual que a la prova 2, es va capturar una imatge en el temps 0 abans d'afegir l'Ubi. A continuació, es va incubar la dissolució d'Ubi durant 5 minuts, es va retirar la gota per capil·laritat i, passats 15 minuts més, es va capturar una nova imatge.

La imatge “0 min” de la [Figura 9](#) mostra els wasteosomes de color vermell pel seu marcatge amb p62, però no hi ha fluorescència verda perquè correspon al moment abans de l'aplicació de la solució d'Ubi. En canvi, la imatge presa als 15 minuts, és a dir, just després de retirar la solució d'Ubi passat el període d'incubació, evidencia la col·localització entre la tetra-Ubi (verd) i la p62 (vermell), ja que s'hi pot observar la superposició de les dues fluorescències. Això confirma que els wasteosomes tenen la capacitat de captar proteïnes ubiquïtinades i corrobora que l'anticòs anti-p62 tampoc interfereix en aquesta interacció.

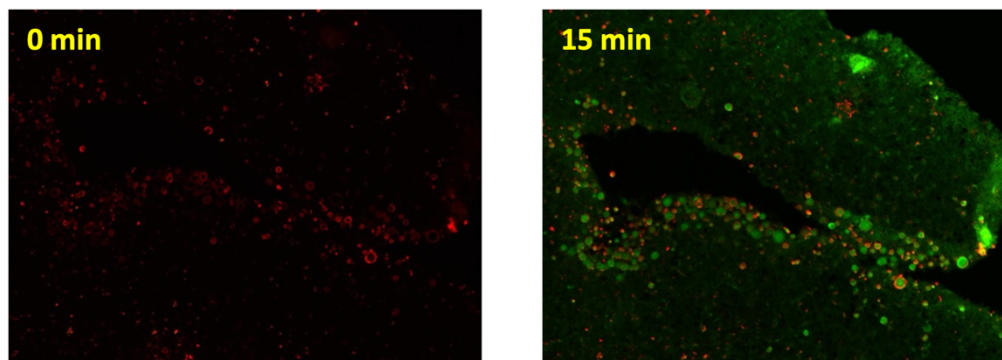


Figura 9: Imatges representatives del solc hipocampal que mostren la interacció entre la tetra-Ubi i els wasteosomes marcats amb p62. La imatge “0 min” es correspon amb el temps inicial, abans de l'aplicació de la solució d'Ubi de manera que no es veu fluorescència verda, però sí fluorescència vermella associada a la p62. La imatge “15 min” va ser obtinguda 15 minuts després de retirar la solució d'Ubi (després d'una incubació de 5 minuts) i revela la superposició entre la fluorescència vermella de la p62 i la verda de l'Ubi, indicant la col·localització i d'aquestes dues proteïnes.

5. Prova 5: Determinació temporal de la unió entre tetra-Ubi i els wasteosomes

Per completar l'estudi, es va dur a terme un darrer experiment amb l'objectiu d'estudiar la cinètica d'unió entre la tetra-Ubi i els wasteosomes. El disseny experimental es va basar en el de la prova 3 de mono-Ubi: marcatge amb anticossos primari i secundari, aplicació d'una dissolució de FLR-tetra-Ubi en PBS a l' $1,98 \cdot 10^{-6}$ M (corresponent a $2,4 \cdot 10^{-10}$ mols en 121 μ L), incubació durant 5 minuts i retirada de la dissolució per capil·laritat. Posteriorment, es van capturar imatges consecutives cada minut per observar l'evolució del marcatge.

Els resultats obtinguts es mostren a la [Figura 10](#). La imatge “Previ” correspon a l'estat anterior al tractament amb tetra-Ubi i, per aquest motiu, només s'hi observa el senyal fluorescent de la p62, de color vermell. La imatge “0 min” es va capturar immediatament després de retirar l'excés de solució de tetra-Ubi fluorescent. Gràcies al seguiment temporal realitzat a partir d'aquest moment, s'observa que, a partir del minut 4, el marcatge fluorescent comença a mostrar més especificitat. Aquest comportament indica que la cinètica d'unió entre la tetra-Ubi i els wasteosomes és similar a l'observada amb la mono-Ubi.

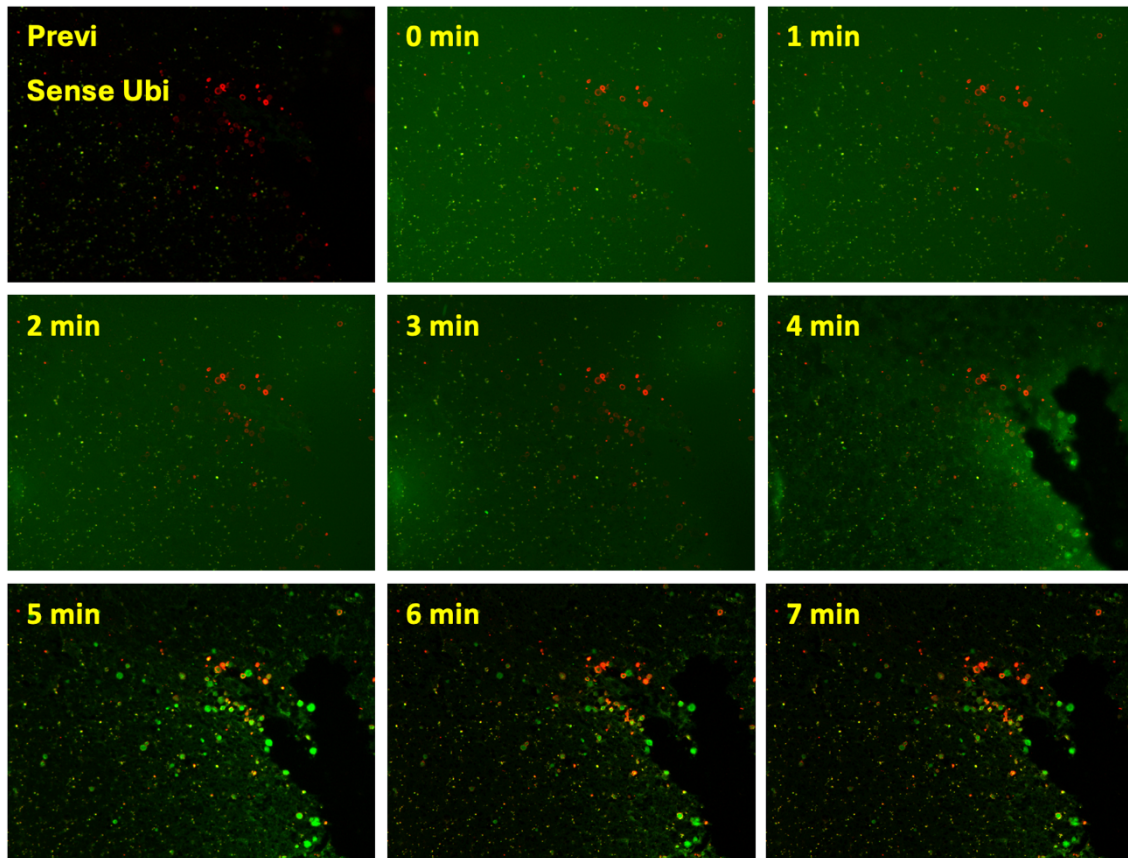


Figura 10: Seguiment temporal de la interacció entre tetra-Ubi (verd) i els wasteosomes marcats amb p62 (vermell) al solc fimbriodentat. La imatge “Previ” mostra l'estat abans del tractament amb Ubi fluorescent, amb senyal fluorescent exclusiu de p62 en vermell. La imatge “0 min” correspon al moment immediat posterior a l'addició i retirada d'excés de la dissolució d'Ubi fluorescent sobre el tall. A partir d'aquest moment, es van registrar imatges amb una freqüència d'un minut, representades en l'esquema amb la seva marca temporal corresponent. A partir del minut 4, es detecta una disminució ràpida de fluorescència inespecífica i una intensificació del senyal fluorescent verd en llocs específics, indicant l'inici de la unió entre tetra-Ubi i els wasteosomes.

Tal com passava amb la mono-Ubi, no es va percebre cap augment addicional en la intensitat de la fluorescència, tot i haver mantingut l'observació durant 30 minuts més. Per aquest motiu, es van explorar altres regions de l'hipocamp, representades a la [Figura 11](#). Aquest esquema mostra imatges preses amb objectius de 10x, 20x i 40x, i posa de manifest la col·localització entre les proteïnes, evidenciada per la superposició del senyal verd (Ubi) i vermell (p62), que dona lloc a un senyal de color groc.

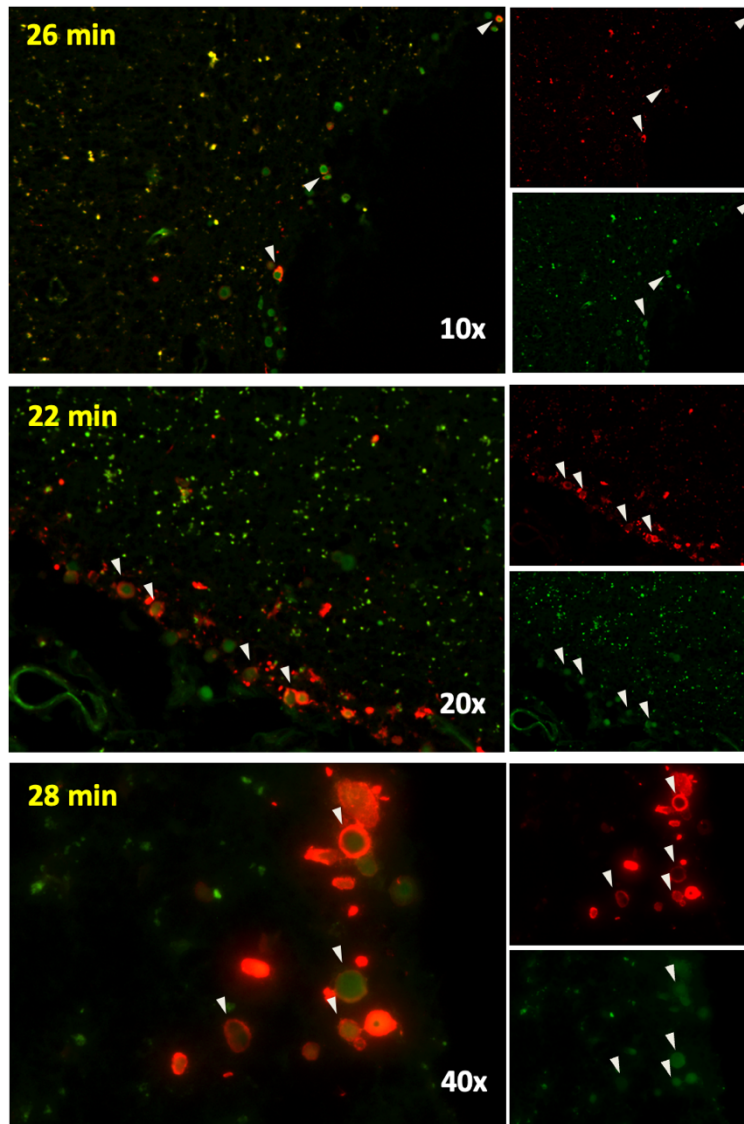


Figura 11: Imatges preses als 20, 23 i 28 minuts després de la retirada de la dissolució de tetra-Ubi, a augments 10x, 20x i 40x respectivament. S'hi observa la col·localització entre la p62 (senyal vermella) i la tetra-Ubi (senyal verda), visible com una fluorescència groguenca resultant de la superposició dels 2 canals. Les fletxes assenyalen els wasteosomes on aquesta col·localització és més evident. Al costat de cada imatge principal es presenten els canals individuals, mostrant per separat la distribució de la p62 i de la tetra-Ubi

DISCUSSIÓ

Els resultats obtinguts en el treball confirmen de manera clara que tant la mono-Ubi com la tetra-Ubi s'uneixen específicament als wasteosomes, fet que posa de manifest la seva capacitat activa de captar molècules ubiquitinades i la seva possible implicació en processos relacionats amb la degradació proteica. En particular, l'ús de tetra-Ubi reforça la hipòtesi que aquestes estructures poden reconèixer formes més complexes d'ubiquitinació. Així, els wasteosomes es podrien considerar compartiments cel·lulars amb una funció especialitzada de captació i segregació de substàncies marcades per a la degradació, probablement mitjançant mecanismes mediatitzats per la proteïna p62.

L'estructura molecular dels wasteosomes, caracteritzada per una xarxa de p62 capaç de reconèixer i unir proteïnes ubiquitinades, combinada amb la presència de glucogen sintasa que podria facilitar-ne l'encapsulació mitjançant la formació de polímers de glucosa, suggereix un mecanisme alternatiu i potencialment eficaç pel manteniment de l'homeòstasi proteica. Aquesta funció podria actuar com a via complementària als sistemes convencionals de degradació com el sistema ubiquitina-proteosoma i l'autofàgia clàssica. En situacions de disfunció d'aquests sistemes, els wasteosomes podrien representar una estratègia cel·lular alternativa per a la degradació de substàncies de rebuig.

La seva capacitat integradora es veu reforçada per estudis previs que han identificat, dins dels wasteosomes, proteïnes associades a patologies neurodegeneratives com la tau, la TDP-43 o la FUS (31,32). Totes elles són proteïnes que poden ser ubiquitinades i que estan implicades en malalties com l'Alzheimer, la degeneració lobar frontotemporal o l'esclerosi lateral amiotròfica, respectivament. En canvi, la β -amiloide, que no presenta una unió coneguda amb l'Ubi, i és degradada per mecanismes no dependents d'Ubi, probablement no pot ser reconeguda ni integrada pels wasteosomes, fet que suggereix una certa especificitat en el mecanisme de captació. En aquest context, es pot hipotetitzar que altres proteïnes com l' α -sinucleïna, implicada en malalties com el Parkinson o la demència per cossos de Lewy, també podrien ser captades pels cossos si es troben ubiquitinades. Si es confirmés que els wasteosomes poden captar i retenir aquest tipus de proteïnes patològiques, això reforçaria la

seva possible funció neuroprotectora com a sistemes alternatius de contenció i eliminació de proteïnes tòxiques.

Tot i els resultats prometedors obtinguts, l'estudi presenta algunes limitacions que cal tenir en compte: el nombre reduït de mostres, limitat a dos pacients, i l'ús exclusiu de tècniques d'immunofluorescència fan necessària la validació dels resultats mitjançant altres aproximacions experimentals. Una possible estratègia futura seria la inhibició funcional de la p62 per comprovar si aquesta proteïna és realment essencial en la captació de l'Ubi per part dels wasteosomes. Si, malgrat la inhibició, la unió es mantingués, es podria plantejar que l'Ubi interacciona directament amb el poliglucosà dels cossos a través de mecanismes alternatius, com ara el complex LUBAC (Linear Ubiquitin Chain Assembly Complex) (34), conegut per formar cadenes d'Ubi en altres contextos cel·lulars.

En relació amb això, una línia de recerca rellevant seria aclarir si la captació de proteïnes ubiquitinades dins dels wasteosomes depèn de la seva unió a la p62. Tot i que la presència de proteïnes com tau, TDP-43 i FUS dins dels wasteosomes ja ha estat descrita (31,32), encara no s'ha determinat si la captació es deu a la seva ubiquitinació i a la interacció posterior amb la p62. Per abordar aquesta qüestió, es podrien dur a terme experiments on es marquessin les proteïnes específicament amb Ubi, per després analitzar-ne la col·localització amb p62 dins dels wasteosomes mitjançant tècniques d'immunofluorescència múltiple. Això permetria confirmar si la interacció p62-Ubi és el mecanisme central d'integració d'aquestes proteïnes patològiques.

Una via experimental complementària podria consistir a analitzar l'afinitat diferencial dels wasteosomes per la mono i la tetra-Ubi. Per fer-ho, es podria aplicar un disseny experimental seqüencial utilitzant mono-Ubi marcada amb AF647 (vermell) i tetra-Ubi amb fluoresceïna (verd). L'experiment consistiria a incubar un tall d'hipocamp primer amb una de les dues formes d'Ubi i després amb l'altra, invertint l'ordre en un segon tall, per tal d'avaluar la intensitat i la superposició del senyal fluorescent. Si, per exemple, la captació de tetra-Ubi es reduís quan s'aplica després de la mono-Ubi, podria indicar una major afinitat per aquesta darrera, i viceversa. Aquest tipus d'experiments podrien aportar dades quantitatives sobre les preferències de captació dels wasteosomes.

En paral·lel, seria pertinent investigar si els wasteosomes tenen la capacitat de retenir l'Ubi un cop captada o si la unió és transitòria. En l'estudi, s'ha observat que el senyal fluorescent desapareixia al cap de 24 hores, fins i tot sota diferents condicions de fixació (PFA 4%, DMSO 5%, glutaraldehyd 2,5%) i conservació. La pèrdua de senyal podria deure's a una unió feble o reversible, o bé a un fenomen tècnic com el fotobleiximent del fluoròfor. Es planteja així una nova línia de recerca centrada en l'estabilitat de la interacció entre l'Ubi i els wasteosomes i, per tant, a la seva funcionalitat real in vivo.

Finalment, seria especialment rellevant estudiar si els wasteosomes presents en el LCR lliures del parènquima cerebral conserven la seva capacitat funcional. Aïllar-los i analitzar in vitro la seva interacció amb Ubi i molècules ubiquïtinades determinaria si la seva capacitat de captació es manté fora del cervell o si queda compromesa.

En conjunt, aquestes línies d'estudi futures podrien aportar una comprensió més profunda del comportament dels wasteosomes, del seu paper en la degradació alternativa de proteïnes ubiquïtinades i de la seva possible funció protectora en el cervell envellit o patològic.

CONCLUSIONS

A partir dels resultats del present treball, se n'extreuen les següents conclusions:

1. Els wasteosomes tenen la capacitat de captar tant mono com tetra-Ubi lliures, fet que valida la hipòtesi inicial sobre el seu paper en la captació de substàncies ubiquïtinades.
2. La interacció de les dues formes ubiquïtinades i els wasteosomes es localitza predominantment en la regió perifèrica dels wasteosomes, coincidint amb la localització de la p62. Això fa pensar que aquesta proteïna intervé en la interacció.
3. La interacció entre els wasteosomes i les formes ubiquïtinades es produeix amb una cinètica similar per la mono-Ubi i la tetra-Ubi.
4. La capacitat dels wasteosomes per captar proteïnes ubiquïtinades reforça el seu paper com a estructures actives en el sistema de neteja cerebral, suggerint una funció complementària als mecanismes clàssics de degradació cel·lular, com l'autofàgia i el proteosoma, i un possible paper neuroprotector.

D'acord amb els resultats obtinguts, es proposa que futurs estudis aprofundeixin en la capacitat dels wasteosomes per captar proteïnes ubiquïtinades implicades en patologies neurodegeneratives, com la proteïna tau en l'Alzheimer o en alguns tipus de degeneració lobar frontotemporal, i la TDP-43 en l'esclerosi lateral amiotròfica i variants de degeneració lobar frontotemporal. Així mateix, es considera rellevant estudiar si la p62 és indispensable per la captació d'Ubi, mitjançant tècniques complementàries, i es proposa explorar la funcionalitat dels wasteosomes presents al LCR.

BIBLIOGRAFIA

1. Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(3):211-6.
2. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007;9(10):1102-9.
3. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.
4. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu Rev Biochem.* 2017;86(1):193-224.
5. Kirkin V, McEwan DG, Novak I, Dikic I. A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol Cell.* 2009;34(3):259-69.
6. Long J, Gallagher TRA, Cavey JR, Sheppard PW, Ralston SH, Layfield R, et al. Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5427-40.
7. Tan JMM, Wong ESP, Kirkpatrick DS, Pletnikova O, Ko HS, Tay SP, et al. Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* 2008;17(3):431-9.
8. Wooten MW, Geetha T, Babu JR, Seibenhener ML, Peng J, Cox N, et al. Essential Role of Sequestosome 1/p62 in Regulating Accumulation of Lys63-ubiquitinated Proteins. *J Biol Chem.* 2008;283(11):6783-9.
9. Ikeda F, Dikic I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. *EMBO Rep.* 2008;9(6):536-42.
10. Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):599-609.

11. Virchow R. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. [Sobre una substància trobada en el cervell i la medul·la espinal de l'ésser humà amb la reacció química de la cel·lulosa]. Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med. 1854;6(1):135-8.
12. Riba M, Augé E, Campo-Sabariz J, Moral-Anter D, Molina-Porcel L, Ximelis T, et al. *Corpora amylacea* act as containers that remove waste products from the brain. Proc Natl Acad Sci. 2019;116(51):26038-48.
13. Rohn TT. Corpora Amylacea in Neurodegenerative Diseases: Cause or Effect? Int J Neurol Neurother. 2015;2(3):031.
14. Cissé S, Perry G, Lacoste-Royal G, Cabana T, Gauvreau D. Immunochemical identification of ubiquitin and heat-shock proteins in corpora amylacea from normal aged and Alzheimer's disease brains. Acta Neuropathol (Berl). 1993;85(3):233-40.
15. Wilhelmus MMM, Verhaar R, Bol JGJM, van Dam AM, Hoozemans JJM, Rozemuller AJM, et al. Novel role of transglutaminase 1 in corpora amylacea formation? Neurobiol Aging. 2011;32(5):845-56.
16. Selmaj K, Pawłowska Z, Walczak A, Koziółkiewicz W, Raine CS, Cierniewski CS. Corpora amylacea from multiple sclerosis brain tissue consists of aggregated neuronal cells. Acta Biochim Pol. 2008;55(1):43-9.
17. Riba M, Del Valle J, Augé E, Vilaplana J, Pelegrí C. From corpora amylacea to wasteosomes: History and perspectives. Ageing Res Rev. 2021;72:101484.
18. Cavanagh JB. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. Brain Res Rev. 1999;29(2):265-95.
19. Sakai M, Austin J, Witmer F, Trueb L. Studies of corpora amylacea. I. Isolation and preliminary characterization by chemical and histochemical techniques. Arch Neurol. 1969;21(5):526-44.

20. Augé E, Duran J, Guinovart JJ, Pelegrí C, Vilaplana J. Exploring the elusive composition of corpora amylacea of human brain. *Sci Rep*. 2018;8(1):13525.
21. Augé E, Bechmann I, Llor N, Vilaplana J, Krueger M, Pelegrí C. Corpora amylacea in human hippocampal brain tissue are intracellular bodies that exhibit a homogeneous distribution of neo-epitopes. *Sci Rep*. 2019;9(1):2063.
22. Augé E, Cabezón I, Pelegrí C, Vilaplana J. New perspectives on corpora amylacea in the human brain. *Sci Rep*. 2017;7(1):41807.
23. Cissé S, Lacoste-Royal G, Laperrière J, Cabana T, Gauvreau D. Ubiquitin is a component of polypeptides purified from corpora amylacea of aged human brain. *Neurochem Res*. 1991;16(4):429-33.
24. Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*. 2015;40(12):2583-99.
25. Bucchieri F, Farina F, Zummo G, Cappello F. Lymphatic vessels of the dura mater: a new discovery? *J Anat*. 2015;227(5):702-3.
26. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015;523(7560):337-41.
27. Weller RO, Galea I, Carare RO, Minagar A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol*. 2010;17(4):295-306.
28. Sweeney MD, Zlokovic BV. A lymphatic waste-disposal system implicated in Alzheimer's disease. *Nature*. 2018;560(7717):172-4.
29. Sbarbati A, Carner M, Colletti V, Osculati F. Extrusion of corpora amylacea from the marginal gila at the vestibular root entry zone. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55(2):196-201.

30. Riba M, Augé E, Tena I, Del Valle J, Molina-Porcel L, Ximelis T, et al. Corpora Amylacea in the Human Brain Exhibit Neopeptides of a Carbohydrate Nature. *Front Immunol.* 2021;12:618193.
31. Riba M, Del Valle J, Romera C, Alsina R, Molina-Porcel L, Pelegrí C, et al. Uncovering tau in wasteosomes (corpora amylacea) of Alzheimer's disease patients. *Front Aging Neurosci.* 2023;15:1110425.
32. Alsina R, Riba M, Pérez-Millan A, Borrego-Écija S, Aldecoa I, Romera C, et al. Increase in wasteosomes (corpora amylacea) in frontotemporal lobar degeneration with specific detection of tau, TDP-43 and FUS pathology. *Acta Neuropathol Commun.* 2024;12(1):97.
33. Ciani B, Layfield R, Cavey JR, Sheppard PW, Searle MS. Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37409-12.
34. Aboujaoude A, Minassian B, Mitra S. LUBAC: a new player in polyglucosan body disease. *Biochem Soc Trans.* 2021;49(5):2443-54.