

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**PROPIEDADES ANTIAMILOIDOGÉNICAS Y NEUROPROTECTORAS
DE MORINA E ISOQUERCITRINA EN DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTALES**

Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por

VANESA CARMONA MATA

Directoras:

Dra. Paloma Bermejo Bescós

Dra. Sagrario Martín-Aragón Álvarez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**PROPIEDADES ANTIAMILOIDOGÉNICAS Y NEUROPROTECTORAS
DE MORINA E ISOQUERCITRINA EN DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTALES**

**Memoria para optar al Grado de Doctor
presentada por**

VANESA CARMONA MATA

VºBº Directoras

Fdo.:

Fdo.:

Dra. Paloma Bermejo Bescós

Dra. Sagrario Martín-Aragón Álvarez

Madrid, 2017

Las Dras Paloma Bermejo Bescós y Sagrario Martín-Aragón Álvarez, profesoras del Departamento de Farmacología (Farmacognosia y Farmacología Experimental) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN: que el presente trabajo titulado: “Propiedades antiamiloidogénicas y neuroprotectoras de morina e isoquercitrina en diferentes modelos experimentales”, llevado a cabo por Dña. **VANESA CARMONA MATA**, ha sido realizado bajo nuestra dirección. Creemos que el mencionado trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un tribunal para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 30 de marzo de 2017.

Fdo.:

Dra. Paloma Bermejo Bescós

Fdo.:

Dra. Sagrario Martín-Aragón Álvarez

DEDICATORIA

A J.M.S, a quien la enfermedad de Alzheimer no me dejó conocer.

Y a M.P.E, te echo de menos, allá donde estés.

AGRADECIMIENTOS

“Si quieres ir rápido, ve solo. Si quieres llegar lejos, ve acompañado”
Proverbio africano

Si algo he aprendido en estos años es que una tesis doctoral es realmente un *Proyecto de vida*, excelso, ilustre y mayúsculo (especialmente si uno desea mantenerse cuerdo). Por ello, me gustaría aprovechar estas líneas para expresar mi profunda gratitud a todos aquellos que me han apoyado en esta empresa:

A las Dras. Sagrario Martín-Aragón y Paloma Bermejo, no sólo por la formación académica recibida, sino también por todo el apoyo personal que me han brindado durante estos años. Sin su admirable dedicación no hubiera podido presentar este trabajo. Al Dr. Aurelio García Csäky, por su siempre buena disposición y su practicidad.

A mis compañeras de laboratorio: A Karim L., por ser mentora y a la vez amiga, paradigma de “savoir-faire” y paciencia en la poyata; y a Silvia, viva imagen de la honestidad y el sacrificio por la ciencia. Me siento muy afortunada de haber podido contar con vuestro ejemplo entre pipetas y matraces.

A mis compañeros de departamento y facultad: Miguel, Patricia, Laura, Jorge, Ana, Elena, Manal, Sergio, Esther,... por las innumerables risas y buenos momentos compartidos, además de la compañía y solidaridad mutua cuando las cosas no salían como nosotros queríamos. Porque ya se sabe que las penas, compartidas, son menos penas.

Al equipo humano del Departamento de Farmacología y Farmacognosia por hacerlo sentir como un segundo hogar. Y al del Departamento de Inspección y Control de Medicamentos de la AEMPS, que me ha acogido con los brazos abiertos.

To Dr. Dave Schubert, for giving me the opportunity of staying in his lab and hosting me better than I could ever have hoped for. To all CNB-S team: Drs. Pamela Maher, Antonio Currais, Daniel Daugherty and Richard Dargush, for all the kindness and teaching effort you put on me. Special thanks to my day-to-day supervisor at CNB-S, Dr. Josh Goldberg, for also showing me the lights and shadows of science and the real American way of life.

To Dr. Edward H.Koo, for making my predoctoral stay at UCSD and Salk Institute possible.

A mis padres, por su comprensión y apoyo incondicional, porque aunque suene típico, son el pilar sin el que no hubiera podido llegar hasta aquí. Al resto de mi familia, por los ánimos e interés constantes.

A Laura y Berta, por todos esos planes aplazados porque las células no entienden cuándo es festivo.

Y a Roberto, víctima colateral de este proyecto, por ser mi particular muro de las lamentaciones.

¡¡Muchas gracias a todos!!



El trabajo aquí presentado ha sido realizado gracias a la financiación recibida por el Programa de becas predoctorales de la Fundación Folch (2012-2014) y el Programa UCM-Universidad de California (2014-2015). Durante este periodo se ha realizado una estancia predoctoral en el Instituto Salk for Biological Studies (La Jolla, CA, USA) en colaboración con la Universidad de California – San Diego (Septiembre 2014 - Julio 2015)



SALK INSTITUTE
FOR BIOLOGICAL STUDIES

ÍNDICE

	Página
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	13
RESUMEN.....	19
SUMMARY.....	27
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	35
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	41
1. La enfermedad de Alzheimer.....	43
1.1. La patología de la enfermedad de Alzheimer.....	43
1.2. La patogénesis de la enfermedad de Alzheimer.....	44
1.2.1. Las placas de β -amiloide.....	46
<i>La proteína precursora de β-amiloide</i>	46
<i>La enzima α-secretasa</i>	49
<i>La enzima β-secretasa</i>	50
<i>La enzima γ-secretasa</i>	51
1.2.2. Los ovillos neurofibrilares.....	52
<i>Tau y caspasas</i>	54
1.2.3. El sistema proteasomal.....	55
1.2.4. El estrés oxidativo.....	57
<i>El papel del β-amiloide en el estrés oxidativo</i>	59
<i>El papel de la mitocondria</i>	61
1.2.5. El desarrollo de inflamación.....	63
1.2.6. La enzima acetilcolinesterasa.....	64
1.2.7. Genes de riesgo.....	65
1.2.8. Los metales de transición.....	66
1.3. El tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	67
1.3.1. Tratamientos preventivos.....	68
1.3.2. Tratamientos sintomáticos.....	68

1.3.3. Tratamientos etiológicos.....	69
2. Los flavonoides.....	71
2.1. El posible mecanismo de acción de los flavonoides.....	72
2.2. Accesibilidad a la diana farmacológica.....	73
MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1. Flavonoides.....	77
2. Evaluación de la actividad antiamiloidogénica <i>in vitro</i>	77
2.1. Inhibición de la actividad β -secretasa.....	77
2.2. Inhibición de la actividad γ -secretasa.....	78
2.3. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa.....	80
2.4. Agregación y desagregación del péptido β -amiloide.....	81
3. Evaluación del efecto neuroprotector en diferentes modelos celulares.....	82
3.1. Estudio en la línea celular de neuroblastoma MC65.....	82
3.1.1. Toxicidad intracelular de β -amiloide.....	82
3.2. Estudio en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y-APPswe.....	83
3.2.1. Generación intracelular de radicales libres.....	83
3.2.2. Determinación de la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S.....	85
3.2.3. Determinación de la actividad caspasa 3, 8 y 9.....	85
3.3. Estudio en la línea celular hipocampal HT22.....	86
3.3.1. Ensayo de oxitosis.....	87
3.3.2. Ensayo de isquemia.....	88
<i>Determinación de niveles intracelulares de ATP.....</i>	<i>88</i>
<i>Determinación de niveles intracelulares de NAD⁺ y NADH.....</i>	<i>89</i>
<i>Determinación de niveles intracelulares de NADP⁺ y NADPH.....</i>	<i>89</i>
<i>Análisis de niveles de proteínas.....</i>	<i>90</i>
3.4. Mantenimiento y propagación de las líneas celulares.....	91
3.5. Determinación de la viabilidad celular.....	92
4. Análisis estadístico.....	93

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
1. Evaluación de la actividad antiamiloidogénica <i>in vitro</i>	97
1.1. Inhibición de la actividad β -secretasa.....	97
1.2. Inhibición de la actividad γ -secretasa.....	99
1.3. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa.....	101
1.4. Agregación y desagregación del péptido β -amiloide.....	102
1.4.1. Inhibición de la agregación del péptido β -amiloide (βA_{25-35}).....	102
1.4.2. Desagregación del péptido β -amiloide (βA_{25-35}).....	103
2. Efecto neuroprotector en modelos celulares de neurotoxicidad inducida por estrés oxidativo.....	106
2.1. Efecto de la concentración de flavonoide en la viabilidad celular.....	106
2.1.1. Viabilidad celular en neuroblastoma MC65.....	106
2.1.2. Viabilidad celular en neuroblastoma APPswe.....	107
2.1.3. Viabilidad celular en neuroblastoma HT22.....	108
2.2. Muerte celular inducida por oligómeros de β -amiloide.....	109
2.3. Generación intracelular de radicales libres.....	112
2.4. Determinación de la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S.....	115
2.5. Determinación de la actividad caspasa 3, 8 y 9.....	122
2.6. Oxitosis celular inducida por glutamato.....	129
2.7. Isquemia inducida por ácido yodoacético en la línea celular hipocampal HT22.....	136
2.7.1. Determinación de niveles intracelulares de ATP.....	148
2.7.2. Determinación de niveles intracelulares de NAD^+ y NADH.....	153
2.7.3. Determinación de niveles intracelulares de $NADP^+$ y NADPH.....	158
2.7.4. Implicación de las rutas de señalización celular.....	161
Vía de las quinasas MAP (MAPK).....	162
Vía de PI3K/Akt/mTOR.....	168
CONCLUSIONES.....	179
BIBLIOGRAFÍA.....	183

SIGLAS Y ABREVIATURAS

8-oxo-dG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
αAPP-CTF	Fragmento carboxi-terminal de APP liberado por la enzima α -secretasa
βAPP-CTF	Fragmento carboxi-terminal de APP liberado por la enzima β -secretasa
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
βA / Aβ	<i>β-amyloid</i> (Péptido β -amiloide)
βA40	Péptido de β -amiloide de 40 aminoácidos de longitud
βA42/Aβ_{1-42}	Péptido de β -amiloide de 42 aminoácidos de longitud
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
Aβ_{25-35}	Fragmento de péptido de β -amiloide del residuo aminoacídico 25 al 35
AA	Antimicina A
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
AD	<i>Alzheimer's disease</i> (enfermedad de Alzheimer)
ADAM	Familia enzimática de las desintegrinas y metaloproteasas
AICD	<i>APP intracellular domain</i> (Fragmento carboxi-terminal de CTF α o CTF β liberado por la enzima γ -secretasa)
AMC	7-amino-4-metilcumarina
APH-1	<i>Anterior pharynx-defective 1</i> (Componente del complejo enzimático γ -secretasa)
ApoE	Apolipoproteína E
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Proteína precursora de amiloide)
APPα	Fragmento amino-terminal de APP liberado por la enzima α -secretasa
APPβ	Fragmento amino-terminal de APP liberado por la enzima β -secretasa
APPwt	APP <i>wild-type</i> , forma silvestre de APP
APPmut	APP mutada
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
BACE / BACE1	<i>β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme</i> (Enzima β -secretasa, Asp2 o memapsina)
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Enzima catalasa
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DCFA-DA	Diacetato de diclorofluoresceína

DABCYL	Ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
DPI	Cloruro de difenilenyodonio
C31	Fragmento carboxi-terminal de APP liberado por caspasas
C99	Fragmento carboxi-terminal de APP liberado por la enzima β -secretasa
CHIP	<i>C-terminus Hsp70 interacting protein</i> (Chaperona)
CTFα	Fragmento carboxi-terminal de APP liberado por la enzima α -secretasa
CTFβ	Fragmento carboxi-terminal de APP liberado por la enzima β -secretasa
DR6	<i>Death Receptor 6</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDANS	Ácido 5-[(2-aminoetil)amino]-naftalen-1-sulfónico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EC	Extracelular
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ETC	<i>Electron transport chain</i> (cadena de transporte electrónico)
FAD⁺/FADH₂	Dinucleótido de flavina y adenina oxidado/reducido
GAPDH	Enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GGA3	<i>Golgi Associated, Gamma Adaptin Ear Containing, ARF Binding Protein 3</i> (Proteína implicada en el tráfico y reciclaje intracelular)
GPx	Enzima glutatión peroxidasa
GR	Enzima glutatión reductasa
GSH/GSSG	Glutatión reducido/ oxidado
Hesp	Hesperidina
Hsp	<i>Heat shock protein</i> (Proteína de choque térmico)
IAA	<i>Iodoacetic acid</i> (Ácido yodoacético)
IC	Intracelular
IQ	Isoquercitrina
Jcasp	Fragmento intracelular de APP liberado por caspasas

LCR	Líquido ceforraquídeo
mGLURs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex class-I</i> (Complejo de Histocompatibilidad de clase I)
MMP9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i> (Enzima metaloproteasa 9)
Mor	Morina
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> (Diana de rapamicina en células de mamífero)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio
NAD⁺/NADH/	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado/reducido
NADP⁺/NADPH/	Dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina oxidado/reducido
Na_vβ₂	Subunidad 2 del canal de sodio voltaje dependiente
NH	Neohesperidina
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i> (Enzima óxido nítrico sintasa)
NOX	Enzima NADPH oxidasa
Nrf2	Factor de transcripción <i>NF-E2 p45-related factor 2</i>
OA	Oligomicina A
ONF	Ovillos neurofibrilares
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i> (Fosforilación oxidativa)
P3	Fragmento amino-terminal de CTFα liberado por el complejo enzimático γ-secretasa
PARP	Enzima poli ADP-ribosa polimerasa
PEN-2	<i>Presenilin enhancer 2</i> (Proteína reguladora componente del complejo enzimático γ-secretasa)
PHFs	<i>Paired helical filaments</i> (filamentos pareados helicoidales)
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
PSEN1 / 2	Presenilina-1 / 2
TM	Transmembrana
TNB	5-tio-2-nitro-benzoato
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor receptor</i> (Receptor del Factor de necrosis tumoral)
TTFA	2-Tenoiltrifluoroacetona
RE	Retículo endoplásmico

ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Especies reactivas de oxígeno, ERO)
Rot	Rotenona
RyR	Receptores de rianodina
SIRT1	Enzima sirtuina-1
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Enzima superóxido dismutasa
UbQ / UbQH₂	Coenzima Q oxidada/reducida
VEGFR1	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 1</i> (Sustrato de γ -secretasa)

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla		Página
1	Anticuerpos primarios	91
2	Inhibición de la actividad β -secretasa	97
3	Inhibición de la agregación de βA_{25-35} (10 μM)	102
4	Desagregación de βA_{25-35} (10 μM)	104
5	Inhibición de la generación intracelular de radicales libres por los flavonoides en estudio	113
6	Actividad quimotripsina proteasomal 20S y 26S	118
7	Actividad de caspasa 3, 8 y 9	122

Figura		Página
1	Estructura de los flavonoides en estudio	38
2	Comparación del volumen cerebral estimado entre un individuo sano y un paciente con enfermedad de Alzheimer	45
3	Esquema de las vías de procesamiento de la proteína APP	47
4	Hipótesis de la cascada amiloidogénica	49
5	Representación de un microtúbulo en condiciones fisiológicas frente a un microtúbulo desestabilizado por hiperfosforilación de Tau	53
6	Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO)	57
7	Mecanismo de peroxidación lipídica	58
8	Ejemplos de oxidación en proteínas	58
9	Oxidación del ADN	59
10	La 8-hidroxi-2'desoxiguanosina, mutagénico formado por oxidación del ADN	59
11	Reacción de Fenton	60
12	La disfunción mitocondrial provoca un aumento en la formación de ERO que resultan lesivos para la célula	62
13	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	63
14	Estructura del sustrato fluorogénico utilizado en el ensayo de β -secretasa	78
15	Estructura del sustrato fluorogénico utilizado en el ensayo de γ -secretasa	79
16	Fundamento del ensayo de cuantificación de la actividad AChE	80
17	Fundamento del ensayo de generación intracelular de radicales libres	84
18	Interacción de morina con el centro catalítico de BACE-1	98

19	Inhibición de la actividad β -secretasa por morina e isoquercitrina	99
20	Inhibición de la actividad γ -secretasa por morina e isoquercitrina	100
21	Inhibición de la actividad AChE	101
22	Inhibición de la agregación de βA_{25-35} por morina e isoquercitrina	103
23	Desagregación de βA_{25-35} por morina e isoquercitrina	104
24	Viabilidad celular de la línea MC65 tras tratamiento de 24 horas con los flavonoides	107
25	Viabilidad celular de la línea APPswe tras tratamiento de 24 horas con los flavonoides	107
26	Viabilidad celular de la línea HT22 tras tratamiento de 24 horas con los flavonoides	108
27	Protección de los flavonoides frente a la toxicidad amiloide intracelular en células MC65	110
28	Inhibición de la generación intracelular de radicales libres inducida por H_2O_2 (50 μM)	113
29	Principal mecanismo de captación de radicales libres ($R^\bullet$) por flavonoides	115
30	Actividad quimotripsina proteasomal no dependiente de ATP (20S)	119
31	Actividad quimotripsina proteasomal dependiente de ATP (26S)	119
32	Actividad caspasa 3 en células APPswe	123
33	Actividad caspasa 9 en células APPswe	124
34	Actividad caspasa 8 en células APPswe	124
35	Diferentes acciones de oligómeros y de agregados fibrilares en la activación de la apoptosis de células de neuroblastoma	126
36	Protección de los flavonoides frente a la toxicidad por glutamato	130
37	Protección de los flavonoides morina e isoquercitrina frente a la toxicidad por glutamato	131
38	Protección de los flavonoides frente a la isquemia inducida con IAA (2 horas) en células HT22	137
39	Protección de morina e isoquercitrina frente a la isquemia inducida por IAA (2 horas) en células HT22	138
40	Esquema de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Interacción de los inhibidores OXPHOS empleados	142
41	Efecto de morina e isoquercitrina en la viabilidad de células HT22 expuestas a IAA y/o inhibidor OXPHOS	143
42	Niveles intracelulares de ATP en los distintos tratamientos	149
43	Niveles intracelulares de ATP en los distintos tratamientos con inhibidores OXPHOS	151
44	Modificación del cociente $NADH/NAD^+$ en el modelo de isquemia química por IAA	154
45	Modificación del cociente $NADPH/NADP^+$ en el modelo de isquemia química por IAA	159

46	(A) Imagen representativa de western-blot de p-ERK, ERK total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-ERK	163
47	(A) Imagen representativa de western-blot de p-p38, p38 total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-p38	165
48	(A) Imagen representativa de western-blot de p-JNK, JNK total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-JNK	166
49	(A) Imagen representativa de western-blot de p-Akt, Akt total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-Akt	169
50	(A) Imagen representativa de western-blot de p-mTOR, mTOR total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-mTOR	170
51	(A) Imagen representativa de western-blot de p-p70S4K, p70S4K total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-p70S4K	171
52	(A) Imagen representativa de western-blot de p-GSK3 β , GSK3 β total y β -actina (B) Análisis densitométrico de p-GSK3 β	173

RESUMEN

PROPIEDADES ANTIAMILOIDOGÉNICAS Y NEUROPROTECTORAS DE MORINA E ISOQUERCITRINA EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES

Introducción

La demencia es un síndrome neurodegenerativo caracterizado por una pérdida de memoria y otras habilidades cognitivas. Existen numerosas enfermedades que cursan con demencia, y entre ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común. En este contexto, la isquemia cerebral se considera actualmente como un proceso neuropatológico capaz de desencadenar el desarrollo de EA y, por tanto, limitar el daño cerebral tras un episodio de isquemia constituye una estrategia en la prevención del desarrollo de EA y otros procesos neurodegenerativos.

Los estudios epidemiológicos y la búsqueda de biomarcadores de EA muestran una clara relación entre EA e isquemia. Además de la propia muerte celular que desencadena la isquemia *per se*, se ha descrito que en los procesos isquémicos se produce un incremento de la actividad tanto de β -secretasa como de γ -secretasa, principalmente a través de la generación de estrés oxidativo y de la activación de quinasas reguladas por estrés, así como de un descenso en la actividad α -secretasa y de proteasas capaces de degradar el péptido β -amiloide. Incluso se ha observado que en los procesos de isquemia cerebral se acumulan formas hiperfosforiladas de Tau, frecuentemente detectadas en pacientes con EA.

Se ha postulado que la dieta podría ejercer una gran influencia en la incidencia y desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Y particularmente, el consumo de alimentos ricos en flavonoides se ha asociado con una mejora en el riego sanguíneo periférico y cortical que favorece la función cerebrovascular y la neurogénesis, por lo que podrían ser eficaces en la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

Los flavonoides son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y constituyen el grupo más común de los compuestos polifenólicos en la dieta humana. Se ha demostrado que su acción en el sistema nervioso no se explica exclusivamente por sus efectos antioxidantes, sino por su capacidad para proteger a las neuronas, mejorar la función neuronal existente, estimular la regeneración neuronal e inducir neurogénesis. Por ello, los flavonoides constituyen un grupo de compuestos que suscitan un enorme interés farmacológico por su potencial actividad neuroprotectora.

Objetivo

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de las propiedades neuroprotectoras de dos flavanonas (hesperidina y neohesperidina) y dos flavonoles (morina e isoquercitrina), en cuanto a su efecto en la cascada amiloidogénica neuronal, y en cuanto a su efecto en diferentes modelos celulares de estrés oxidativo.

Modelos experimentales

En este trabajo, inicialmente se evaluó la actividad antiamiloidogénica de los flavonoides en estudio, para lo que se determinó su efecto *in vitro* en la actividad de las enzimas β - y γ -secretasa, en la actividad acetilcolinesterasa y en el proceso de fibrillogénesis del péptido β -amiloide (25-35).

Posteriormente, se evaluó el potencial efecto neuroprotector de los flavonoides en dos modelos celulares. En primer lugar, en la línea celular de neuroblastoma MC65, en la que se indujo citotoxicidad por incremento intracelular de oligómeros de β -amiloide. Y en segundo lugar, en la línea celular de neuroblastoma APPswe, en la que se indujo estrés oxidativo mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno. La actividad neuroprotectora se evaluó mediante la cuantificación de la generación de radicales libres, la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S y la actividad de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9.

Finalmente, se evaluó el potencial efecto neuroprotector de los flavonoides frente a la oxitosis inducida por glutamato, así como frente al daño isquémico inducido por ácido yodoacético, en la línea celular hipocampal HT22, mediante las siguientes determinaciones: a) supervivencia celular asociada a la funcionalidad de la cadena mitocondrial; b) niveles intracelulares de ATP; c) poder reductor intracelular (NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+); y d) niveles de proteínas de rutas de supervivencia celular (ERK, Akt, mTOR, p70, GSK-3 β) y de procesos de estrés celular (p38, JNK).

Resultados y discusión

De los cuatro compuestos estudiados, los flavonoles morina e isoquercitrina fueron los que mostraron una actividad concentración dependiente frente a la mayoría de las dianas estudiadas, y por tanto un perfil neuroprotector más amplio.

Sólo morina e isoquercitrina fueron capaces de inhibir de manera concentración dependiente las actividades enzimáticas de β -secretasa y γ -secretasa, enzimas clave en la generación del péptido β -amiloide a partir de la proteína precursora de β -amiloide (APP, *β -amiloide precursor protein*), si bien los cuatro flavonoides presentaron una actividad inhibitoria limitada de la actividad acetilcolinesterasa, aunque estadísticamente significativa. Tanto morina como isoquercitrina mostraron una inhibición de la agregación del péptido βA_{25-35} superior al compuesto de referencia, y una significativa capacidad desagregante de las fibrillas de βA_{25-35} preformadas, mientras que hesperidina y neohesperidina no mostraron ninguna de estas actividades. Estas diferencias pueden deberse a que estos últimos presentan un mayor tamaño y menor hidrofobicidad, características que dificultan la interacción con el péptido β -amiloide y sus agregados.

Por otro lado, los cuatro flavonoides presentaron actividad protectora frente a la citotoxicidad inducida por la acumulación intracelular de oligómeros de β -amiloide en la línea de neuroblastoma MC65, así como frente a la citotoxicidad inducida por estrés oxidativo en la línea de neuroblastoma APPswe. En ambos casos, la actividad mostrada por los flavonoles fue superior a la de las flavonas. En el modelo de oxitosis en células hipocámpales HT22, sólo morina e isoquercitrina mostraron una actividad protectora significativa.

Con el fin de analizar el mecanismo antioxidante de los flavonoides, y dado que el sistema ubiquitina-proteasomal es inhibido por estrés oxidativo, se estudió la influencia de los compuestos en la actividad proteasomal 20S y 26S en la línea de neuroblastoma APPswe. Los cuatro compuestos mostraron capacidad moduladora de la actividad quimotripsina frente a un tratamiento con H_2O_2 . Igualmente sucedió en el estudio de la activación de caspasas; los cuatro flavonoides atenuaron la apoptosis de células APPswe mediante la reducción de la actividad de caspasa 3 y caspasa 9.

Por último, en el modelo de isquemia inducida por ácido yodoacético, sólo morina e isoquercitrina mostraron actividad protectora, manteniendo los niveles de ATP intracelulares, así como el poder reductor. En definitiva, en este modelo de isquemia química, se propone que morina e isoquercitrina pueden modular vías de señalización que estimulan la

biogénesis mitocondrial y promueven la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico, de forma que:

- La inhibición de la vía de señalización de p38 MAP por morina e isoquercitrina atenúa la autofagia mitocondrial en la lesión isquémica neuronal por IAA para mantener la integridad mitocondrial.
- La inhibición de la vía de señalización de JNK por morina e isoquercitrina evita la muerte neuronal tanto por inhibición de la inducción transcripcional de genes promotores de muerte como por modulación de las vías de la apoptosis mitocondrial.
- La vía mTOR, significativamente abolida por la isquemia inducida con IAA, es recuperada por morina e isoquercitrina, modulando así la función de autofagia de las células HT22 isquémicas.
- La inactivación de GSK-3 β por morina e isoquercitrina evita la regulación a la baja del factor de transcripción Nrf2, favoreciendo así el proceso de fosforilación oxidativa en la lesión isquémica neuronal por IAA.

Conclusiones

1. A partir de la evaluación de la actividad antiamiloidogénica *in vitro* de los cuatro flavonoides en estudio podemos concluir que, especialmente, los flavonoles morina e isoquercitrina mostraron:
 - 1.1. Actividad inhibitoria de β -secretasa concentración-dependiente.
 - 1.2. Actividad inhibitoria de γ -secretasa concentración-dependiente.
 - 1.3. Un reseñable efecto inhibitorio de la agregación del péptido β -amiloide, así como un marcado efecto desagregante de las fibrillas preformadas de dicho péptido.
2. A partir del análisis del efecto neuroprotector de los flavonoides en diferentes modelos celulares de neurotoxicidad podemos concluir que:
 - 2.1. Los cuatro flavonoides en estudio protegen frente a la muerte celular inducida por incremento intracelular de oligómeros de β -amiloide en la línea de neuroblastoma MC65, aunque la magnitud de la protección es mayor con morina e isoquercitrina.
 - 2.2. Los cuatro flavonoides en estudio protegen frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y que sobreexpresa la

APPswe humana, aunque en mayor grado en el caso de morina e isoquercitrina. La magnitud de la protección neuronal se hizo evidente por la disminución de la generación intracelular de radicales libres, la modulación de la actividad proteasomal y la atenuación de la activación de caspasa 3 y caspasa 9.

2.3. Los flavonoles morina e isoquercitrina poseen capacidad de protección frente a la oxitosis celular inducida por glutamato.

2.4. Morina e isoquercitrina poseen capacidad de protección frente a la isquemia neuronal inducida por ácido yodoacético, probablemente dependiente de la modulación de vías de señalización que estimulan la biogénesis mitocondrial y promueven la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico. Esta actividad parece depender de: a) la capacidad de activación del factor de transcripción Nrf2; b) la capacidad de ejercer un desacoplamiento mitocondrial moderado; c) la inhibición de la vía de señalización de p38 MAP; d) la inhibición de la vía de señalización de JNK; e) la activación de la vía mTOR; y f) la inactivación de GSK-3 β .

Como conclusión final, se puede señalar que los flavonoles morina e isoquercitrina han demostrado propiedades antiamiloidogénicas, antioxidantes, antiapoptóticas y reguladoras de la función mitocondrial, en diferentes paradigmas experimentales que reproducen algún rasgo fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer.

SUMMARY

ANTIAMYLOIDOGENIC AND NEUROPROTECTIVE PROPERTIES OF MORIN AND ISOQUERCITRIN IN DIFFERENT EXPERIMENTAL MODELS

Introduction

Dementia is a neurodegenerative syndrome characterized by a loss of memory and other cognitive abilities. There are numerous diseases that evolve with dementia and, among them, Alzheimer's disease (AD) is the most common cause. In this context, cerebral ischemia is currently considered as a neuropathological process capable of triggering the development of AD and, therefore, reducing brain damage following an episode of ischemia constitutes a strategy in the prevention of AD development and other neurodegenerative processes.

Epidemiological studies and the search for biomarkers of AD show a clear relationship between AD and ischemia. In addition to the cell death that triggers ischemia itself, it has been reported that in the ischemic processes there is an increase in the activity of both β -secretase and γ -secretase, mainly through the generation of oxidative stress and the activation of stress-regulated kinases, as well as through a decrease in α -secretase activity and proteases capable of degrading the β -amyloid peptide. Also, it has even been observed that hyperphosphorylated forms of Tau, frequently detected in AD patients, accumulate in cerebral ischemia processes.

It has been postulated that diet might exert a great influence on the incidence and development of neurodegenerative diseases. In particular, consumption of flavonoid-rich foods has been associated with an improvement in peripheral and cortical blood supply that favors cerebrovascular function and neurogenesis, and may be effective in preventing neurodegenerative diseases.

Flavonoids are compounds widely distributed in plants and constitute the most common group of polyphenolic compounds in the human diet. It has been shown that its action on the nervous system is not explained exclusively by its antioxidant effects, but by its ability to protect neurons, improve existing neuronal function, stimulate neuronal regeneration and induce neurogenesis. Therefore, flavonoids constitute a group of compounds that raise a great pharmacological interest because of its potential neuroprotective activity.

Study aim

The main purpose of this Doctoral Thesis is to study the neuroprotective properties of two flavanones (hesperidin and neohesperidin) and two flavonols (morin and isoquercitrin), in terms of its effect in the neuronal amyloidogenic cascade, and its effect in different cellular models of oxidative stress.

Experimental models

This work was initiated with the evaluation of the antiamyloidogenic activity of the flavonoids by testing its *in vitro* effect on the β - and γ -secretase enzyme activities, acetylcholinesterase activity and the fibrillogenesis process of the peptide β -amyloid (25-35).

Subsequently, the potential neuroprotective effect of flavonoids in two cell models was evaluated. Firstly, in the MC65 neuroblastoma cell line, in which cytotoxicity was induced by intracellular increase of β -amyloid oligomers; and secondly, in the neuroblastoma cell line APPswe, in which oxidative stress was induced by treatment with hydrogen peroxide. Neuroprotective activity was assessed by quantifying the generation of free radicals, the chymotrypsin activity of 20S and 26S proteasome and the activity of caspase 3, caspase 8 and caspase 9.

Finally, the potential neuroprotective effect of flavonoids against glutamate-induced oxytosis as well as against ischemic damage induced by iodoacetic acid in the hippocampal HT22 cell line was evaluated by the following determinations: a) cell survival associated with the functionality of the mitochondrial chain; b) intracellular levels of ATP; c) intracellular reducing power (NADH/NAD^+ and NADPH/NADP^+); and d) protein levels of cell survival pathways (ERK, Akt, mTOR, p70, GSK-3 β) and of stress processes (p38, JNK).

Results and Discussion

Of the four compounds studied, the flavonols morin and isoquercitrin were those that showed a concentration-dependent activity against most of the targets analyzed and, therefore, a wider neuroprotective profile.

Only morin and isoquercitrin were able to inhibit the enzymatic activities of β -secretase and γ -secretase, key enzymes in the generation of the β -amyloid peptide from the β -amyloid precursor protein (APP), and although all four flavonoids displayed a slight inhibitory effect on acetylcholinesterase activity, it was statistically significant. Both morin and isoquercitrin showed an inhibition of the βA_{25-35} peptide aggregation higher than the reference compound, and a significant disaggregating ability of preformed βA_{25-35} fibrils, whereas hesperidin and neohesperidin did not exhibit any of these activities. These differences may be due to the fact that the latter have a larger size and lower hydrophobicity, characteristics that make it difficult its interaction with the β -amyloid peptide and its aggregates.

On the other hand, the four flavonoids displayed protective activity against the cytotoxicity induced by intracellular accumulation of β -amyloid oligomers in the MC65 neuroblastoma line, as well as against the cytotoxicity induced by oxidative stress in the neuroblastoma line APPswe. In both cases, the activity shown by flavonols was higher than that of flavanones. In the hippocampal HT22 model of oxytosis, only morin and isoquercitrin showed a significant protective activity.

In order to analyze the antioxidant mechanism of flavonoids, and since the ubiquitin-proteasomal system is inhibited by oxidative stress, we studied the influence of the flavonoids on 20S and 26S proteasomal activity in the line of neuroblastoma APPswe. The four compounds showed a modulating capacity of the chymotrypsin activity against hydrogen peroxide exposure. A similar pattern was shown in the study of caspase activation; the four flavonoids attenuated the apoptosis of APPswe cells by reducing the activity of caspase-3 and caspase-9.

Finally, in the iodoacetic acid-induced ischemia model, only morin and isoquercitrin exhibited protective activity, maintaining intracellular ATP levels, as well as the reducing power. In this model of chemical ischemia, it is proposed that morin and isoquercitrin can modulate signaling pathways that stimulate mitochondrial biogenesis and promote the activity of the electronic transport chain complexes, so that:

- Inhibition of the p38 MAP signaling pathway by morin and isoquercitrin attenuates mitochondrial autophagy in IAA neuronal ischemic injury in order to maintain mitochondrial integrity.
- Inhibition of the JNK signaling pathway by morin and isoquercitrin prevents neuronal death by inhibition of transcriptional induction of death-promoting genes and by modulation of mitochondrial apoptosis pathways.

- The mTOR pathway, significantly abolished by IAA-induced ischemia, is recovered by morin and isoquercitrin, thus modulating the autophagy function of ischemic HT22 cells.
- Inactivation of GSK-3 β by morin and isoquercitrin avoids down-regulation of the transcription factor Nrf2, thus favoring the process of oxidative phosphorylation in neuronal ischemic injury by IAA.

Conclusions

1. From the evaluation of the *in vitro* antiamyloidogenic activity of the four flavonoids under study we might conclude that, especially, the flavonols morin and isoquercitrin showed:
 - 1.1. Concentration-dependent inhibitory activity of β -secretase.
 - 1.2. Concentration-dependent inhibitory activity of γ -secretase.
 - 1.3. A notable inhibitory effect of β -amyloid peptide aggregation, as well as a marked disaggregating effect of the preformed fibrils of the peptide.
2. From the analysis of the neuroprotective effect of flavonoids in different cellular models of neurotoxicity, we might conclude that:
 - 2.1. The four flavonoids under study protect against cell death induced by intracellular increase of β -amyloid oligomers in the MC65 neuroblastoma line, although the extent of protection is greater with morin and isoquercitrin.
 - 2.2. The four flavonoids under study protect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in the SH-SY5Y neuroblastoma line that overexpresses the human APP^{swe}, although to a greater extent in the case of morin and isoquercitrin. The magnitude of neural protection was evidenced by the decrease in intracellular free radical generation, modulation of proteasomal activity and attenuation of caspase-3 and caspase-9 activation.
 - 2.3. The flavonols morin and isoquercitrin possess capacity of protection against the cellular oxytosis induced by glutamate.
 - 2.4. Morin and isoquercitrin have the ability to protect against iodoacetic acid-induced neuronal ischemia, probably depending on the modulation of signaling pathways that stimulate mitochondrial biogenesis and promote the activity of the complexes from the

electronic transport chain. This activity seems to depend on: a) the ability to activate the transcription factor Nrf2; b) the ability to exert moderate mitochondrial decoupling; c) inhibition of the p38 MAP signaling pathway; d) inhibition of the JNK signaling pathway; e) activation of the mTOR pathway; and f) the inactivation of GSK-3 β .

As a final conclusion, the flavonols morin and isoquercitrin have demonstrated antiamyloidogenic, antioxidant, antiapoptotic and regulatory properties of mitochondrial function in different experimental paradigms that reproduce some pathophysiological features of Alzheimer's disease.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La demencia es un síndrome neurodegenerativo caracterizado por una pérdida de memoria y otras habilidades cognitivas, lo que conlleva a un detrimento de la capacidad intelectual del individuo. Existen numerosas enfermedades que cursan con demencia o contribuyen a ella, como pueden ser los accidentes cerebrovasculares (*ictus* o *stroke*), la enfermedad de los cuerpos de Lewy o la demencia frontotemporal. Sin embargo, la causa más común es la enfermedad de Alzheimer, puesto que se estima que contribuye en el 60%-80% de los casos totales de demencia (Holtzman, Morris *et al.*, 2011, Alzheimer's-Association, 2016). Esto supone alrededor de 40 millones de personas afectadas por esta enfermedad a nivel mundial, dato que probablemente sea subestimado por la imposibilidad de detectar aquellos individuos en las primeras etapas de la enfermedad. Si a esto le sumamos que el riesgo de sufrir enfermedad de Alzheimer crece exponencialmente a partir de los 70 años, y considerando que la esperanza de vida media de la población está aumentando progresivamente, es fácil entender que la incidencia de esta enfermedad se duplique en los próximos 20 años (Scheltens, Blennow *et al.*, 2016). Teniendo todo esto en cuenta, y sabiendo que los pacientes requieren numerosos cuidados durante largos periodos de tiempo, la enfermedad de Alzheimer constituye, hoy en día, uno de los problemas sociosanitarios más importantes a nivel mundial.

Algunos autores postulan que la dieta puede ejercer una gran influencia en la incidencia y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Barberger-Gateau, Raffaitin *et al.*, 2007, Gu, Nieves *et al.*, 2010, Vassallo y Scerri, 2013). El consumo de alimentos ricos en flavonoides, en particular aquellos que contienen flavonoles, se ha asociado con una mejora en el riego sanguíneo periférico y cortical, mejorando la función cerebrovascular, especialmente en el hipocampo, y facilitando la neurogénesis (Spencer, 2008, Williams y Spencer, 2012). Asimismo, estudios epidemiológicos y preclínicos sugieren que los flavonoides podrían ser eficaces en la contención o incluso reversión de las enfermedades neurodegenerativas. El potencial de los flavonoides en este contexto parece estar relacionado con su poder antioxidante (Rice-Evans, 2001, Tripoli, Guardia *et al.*, 2007), su capacidad de interactuar con las vías de señalización neuronales y gliales intracelulares (Spencer, 2008), su influencia en el sistema vascular cerebral y periférico (Dajas, Rivera-Megret *et al.*, 2003, Kay, Hooper *et al.*, 2012) y con su capacidad de reducir el daño neuronal y la neuroinflamación (Havsteen, 2002, Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011, Hwang, Shih *et al.*, 2012).

Los flavonoides constituyen el grupo más común de los compuestos polifenólicos en la dieta humana y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Las fuentes dietéticas principales de estos compuestos son, entre otros, frutas, verduras, cereales, el té o el vino (Manach, Scalbert *et al.*, 2004). Una vez ingeridos, los flavonoides se metabolizan dando lugar a formas en el organismo diferentes de las que se encuentran en los alimentos (Manach, Williamson *et al.*, 2005, Williamson y Manach, 2005).

En la actualidad se ha demostrado que la acción de los flavonoides en el sistema nervioso no es debida únicamente a sus efectos antioxidantes, sino a su capacidad para proteger a las neuronas, mejorar la función neuronal existente, estimular la regeneración neuronal, e inducir la neurogénesis (Spencer, 2007, Spencer, 2010 (a), Spencer, 2010 (b), Fraga y Oteiza, 2011). Es evidente que los flavonoides son capaces de ejercer acciones neuroprotectoras a concentraciones bajas a través de su interacción con vías de señalización neuronales/gliales intracelulares críticas y claves en el control de la resistencia neuronal a neurotoxinas, la diferenciación neuronal, la potenciación a largo plazo, y la memoria (Williams, Spencer *et al.*, 2004, Spencer, 2007). Por todo ello, los flavonoides constituyen una familia de compuestos con un amplio perfil farmacológico y potencial utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, el objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de las propiedades neuroprotectoras de dos flavanonas (hesperidina y neohesperidina) y dos flavonoles (morina e isoquercitrina), por un lado estudiando su efecto en la cascada patogénica amiloidea, y por otro evaluando el efecto neuroprotector en diferentes modelos celulares de estrés oxidativo.

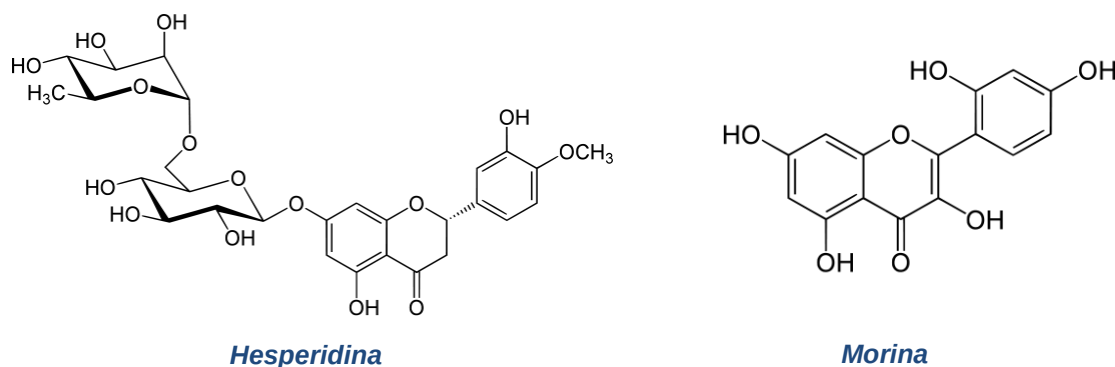


Figura 1(A). Estructura de los flavonoides en estudio.

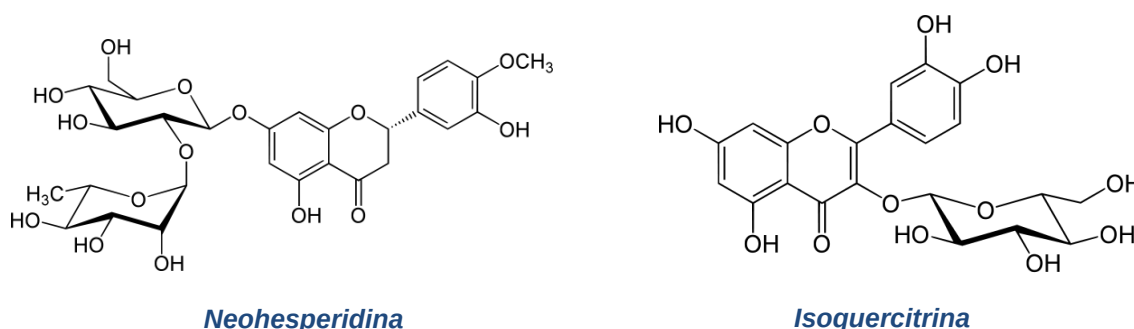


Figura 1(B). Estructura de los flavonoides en estudio.

Los objetivos planteados son los siguientes:

1. Evaluar la **actividad antiamiloidogénica in vitro** de los flavonoides en estudio. Para ello se determina el efecto de los mismos en la actividad de las enzimas involucradas en el procesamiento de APP; en la actividad acetilcolinesterasa y en el proceso de fibrillogénesis del péptido β -amiloide (25-35).
2. Evaluar el **efecto neuroprotector** de los flavonoides en diferentes modelos celulares de neurotoxicidad inducida por estrés oxidativo:
 - 2.1. **Muerte celular inducida por el incremento intracelular de oligómeros de β -amiloide**, en la línea celular de neuroblastoma MC65, con la retirada de la tetraciclina del medio de cultivo. El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides se evalúa mediante la determinación de la viabilidad celular.
 - 2.2. **Estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno**, en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y que sobreexpresa la APP humana portadora de la mutación sueca (APP^{swe}, KM670/671NL). El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides se evalúa mediante la cuantificación de la generación de radicales libres, la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S y la actividad de caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9.
 - 2.3. **Oxitosis celular inducida por elevadas concentraciones de glutamato**, en la línea celular hipocampal murina HT22, carente de receptores funcionales de glutamato y, por tanto, carente de susceptibilidad a la excitotoxicidad

glutamatérgica. El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides frente a la oxitosis se evalúa mediante la determinación de la viabilidad celular.

2.4. Isquemia inducida por ácido yodoacético en la línea celular hipocampal

HT22. El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides se cuantifica mediante la determinación de los niveles intracelulares de ATP; la supervivencia celular asociada a la funcionalidad de la cadena mitocondrial; el poder reductor intracelular (NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+); los niveles de proteínas de rutas de supervivencia celular (ERK, AKT, GSK-3 β , mTOR, p70); y los niveles de proteínas de procesos de estrés celular (JNK, p38).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. La enfermedad de Alzheimer

Alois Alzheimer, psiquiatra y neurólogo alemán, expuso en 1906 el caso de una “rara demencia temprana” en una paciente de 51 años. Esta patología, que desde entonces lleva su nombre, es hoy en día la causa del 60-80% de los casos de demencia (Alzheimer’s-Association, 2016), la cual presenta una prevalencia mundial que se estima en 47 millones de personas (Martin, Wimo *et al.*, 2015, Scheltens, Blennow *et al.*, 2016). La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los objetivos principales en materia terapéutica, tanto del sector investigador público como del privado, ya que constituye un grave problema sociosanitario.

Tras algo más de un siglo, si bien se ha avanzado mucho en el conocimiento básico de esta enfermedad, no se ha esclarecido aún cuál es su origen primigenio. Esto supone una enorme dificultad a la hora de definir una estrategia apropiada para el desarrollo de fármacos, capaz de albergar conjuntamente la inmensa complejidad de la enfermedad en sí. No obstante, las numerosas evidencias fisiopatológicas han permitido el desarrollo de distintas teorías patogénicas, en las cuales se basa la búsqueda de potenciales compuestos que puedan tener utilidad en el tratamiento o en la prevención de la enfermedad.

1.1. La patología de la enfermedad de Alzheimer

La EA se caracteriza por ser un síndrome neurodegenerativo de lenta evolución. Se inicia con una pérdida o disminución de la memoria reciente y otras habilidades cognitivas (desorientación del individuo, alteración de la personalidad y el juicio crítico, anormalidades en el habla o la vista y otros signos según el área cerebral afectada), que se acentúan progresivamente hasta el punto de interferir en la vida diaria del individuo, momento en el que se suele diagnosticar. Desde sus estadios más tempranos se suele acompañar de alteraciones del comportamiento, depresión, insomnio y psicosis. Conforme esta enfermedad avanza, los pacientes requieren mayor asistencia doméstica, hasta ser totalmente dependientes de sus cuidadores en estados de total afasia, apraxia e incapacidad para controlar sus funciones fisiológicas más elementales. Finalmente, tras un periodo variable de 7 a 12 años, la enfermedad conduce al fallecimiento del paciente (Holtzman, Morris *et al.*, 2011).

Es importante señalar que el diagnóstico definitivo de esta enfermedad es *post mortem*. Hasta la fecha, es la única manera de distinguir con claridad la EA de otras causas de pérdida de memoria y demencia, como la demencia senil, la demencia de los cuerpos de Lewy o la vasculitis (Ballard, Gauthier *et al.*, 2011).

Aunque más de un 90% de los casos de EA son esporádicos y su sintomatología aparece a partir de los 65 años de edad, existe un porcentaje minoritario de casos de enfermedad familiar (hereditarios con carácter autosómico dominante), cuya manifestación clínica tiene lugar entre los 30 y 65 años. La EA de aparición temprana está principalmente ligada a mutaciones en genes localizados en los cromosomas 1, 14 y 21, que codifican para las presenilinas 1 y 2, así como para la proteína APP. Esto se pone especialmente de manifiesto en los pacientes con trisomía 21 o Síndrome de Down, que suelen desarrollar la EA alrededor de la cuarta década de la vida (Prvulovic y Hampel, 2011, Alonso Vilatela, Lopez-Lopez *et al.*, 2012, Galimberti y Scarpini, 2012).

Actualmente se considera que la EA es una patología de base multifactorial con cierta predisposición genética, y, entre los factores de riesgo que se han descrito, destacan las enfermedades cerebrovasculares, la diabetes, la hipercolesterolemia, los traumatismos craneoencefálicos y las intoxicaciones ambientales (Reitz y Mayeux, 2014). Por otro lado, el desarrollo y entrenamiento cerebral podría proteger frente a la enfermedad, ya que conduce a un mayor número de conexiones neuronales que actuarían como una “reserva” que permitiría a los individuos “sobrellevar” la EA con menor sintomatología. De forma similar actuaría el ejercicio físico regular, el cual parece favorecer la neurogénesis y la plasticidad sináptica del hipocampo (Castellani, Rolston *et al.*, 2010, Ballard, Gauthier *et al.*, 2011).

1.2. La patogénesis de la enfermedad de Alzheimer

A nivel macroscópico, los pacientes con EA muestran una importante atrofia cerebral (figura 2), especialmente cortical, con adelgazamiento de las circunvoluciones y del espesor cortical, aumento del tamaño de los surcos, pérdida de sustancia en las estructuras grises profundas, especialmente en la corteza entorrinal, encéfalo basal, amígdala e hipocampo, así como pérdida de sustancia blanca y mielina.

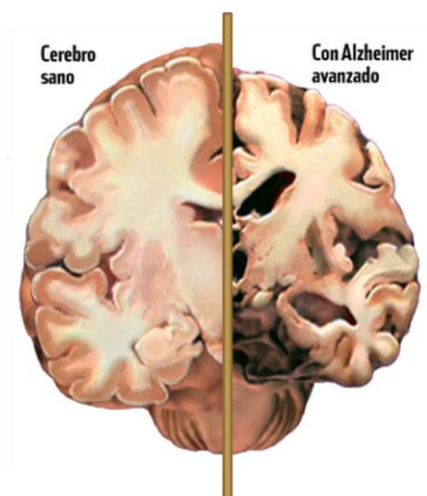


Figura 2. Comparación del volumen cerebral estimado entre un individuo sano y un paciente con enfermedad de Alzheimer.

A nivel microscópico, en dichos pacientes se observa una significativa pérdida de sinapsis neuronales acompañada por la presencia de neuritas distróficas, colapsadas y morfológicamente alteradas. El hecho de que esta pérdida sináptica sea el rasgo de la EA que mejor se correlaciona con el declive cognitivo indica que es clave en la patogénesis de la enfermedad (Palop y Mucke, 2010).

En este proceso, las neuronas principalmente afectadas son las colinérgicas y las glutamatérgicas, lo cual ha sentado las bases para el desarrollo de terapias con inhibidores de la actividad colinesterasa. No obstante, también se han encontrado daños importantes en las neuritas de neuronas serotoninérgicas y adrenérgicas. Así pues, se puede considerar que la disfunción cognitiva de esta patología se debe principalmente a la interrupción de la red de conexiones entre algunas áreas clave del cerebro, como el sistema límbico y zonas específicas de la neocorteza, más que al daño de un tipo neuronal concreto (Holtzman, Morris *et al.*, 2011).

Por otro lado, los rasgos más característicos de esta enfermedad son, junto a la pérdida sináptica, la presencia de placas de β -amiloide y de ovillos neurofibrilares (ONF), los cuales comienzan a acumularse mucho antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos y presentan una clara relación causal (Prvulovic y Hampel, 2011, Scheltens, Blennow *et al.*, 2016). No obstante, son muchos los factores que parecen estar también directamente relacionados como marcadores de neurodegeneración, como pueden ser un estrés oxidativo cerebral generalizado, el desequilibrio de la homeostasis del calcio o una desmesurada gliosis.

1.2.1. Las placas de β -amiloide

Las placas características presentes en la EA son depósitos extracelulares de fibrillas y agregados amorfos constituidos por el péptido β -amiloide (β A, *β -amyloid*) que comienzan a acumularse durante un periodo de hasta diez años antes de la aparición de la sintomatología de la enfermedad. El β -amiloide es un péptido de una longitud que oscila entre 38 y 43 aminoácidos, derivado del procesamiento de la proteína precursora de amiloide (APP, *Amyloid Precursor Protein*).

La proteína precursora de β -amiloide

La APP es una proteína integral transmembrana que, aun siendo ubicua, presenta una elevada expresión a nivel neuronal. Codificada en el cromosoma 21, su secuencia posee numerosos exones, por lo que su traducción y posterior maduración da lugar a isoformas de entre 365 y 770 aminoácidos. La isoforma más frecuente y casi exclusiva a nivel cerebral es la APP695, aunque tras un episodio de daño cerebral parecen aumentar las isoformas APP751 y 770 en astrocitos y células microgliales, relacionadas con mecanismos de coagulación (Mattson, 2004, Holtzman, Morris *et al.*, 2011).

Una vez que la APP es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y glicosilada en el aparato de Golgi, la proteína es almacenada en vesículas que la transportan a lo largo del axón hasta la terminal presináptica, donde se acumula y finalmente se inserta en la membrana celular. En la membrana parece funcionar como un receptor similar a Notch, uniéndose a moléculas como la glicoproteína f-spondin, netrin1 o la heparina, y dimerizándose (Zheng y Koo, 2011). Si bien sus funciones fisiológicas aún no están claramente definidas, podría desempeñar un importante papel sinaptotrópico y neuroprotector, clave en la extensión de neuritas y la adhesión celular (Deyts, Thinakaran *et al.*, 2016, Plummer, Van den Heuvel *et al.*, 2016).

En la membrana, APP puede ser procesada por dos rutas proteolíticas alternativas (figura 3). En la ruta denominada “no amiloidogénica”, la primera enzima en anclarse en la cara extracelular de la membrana es la α -secretasa, proteasa que fracciona APP para dar lugar al péptido APP α . El fragmento CTF α o α APP-CTF que queda anclado en la membrana es procesado posteriormente por la γ -secretasa, dando lugar a los péptidos p3 y AICD (*APP intracellular domain*) (Zheng y Koo, 2011). Por el contrario, en la ruta “amiloidogénica”, la primera enzima en fraccionar APP es la β -secretasa (BACE, *β -site amyloid precursor protein*

cleaving enzyme), que libera APP β antes de que γ -secretasa divida el péptido restante, denominado CTF β , β APP-CTF o C99, en AICD y β -amiloide. Esta ruta es la predominante en pacientes con EA, y, en los casos de EA de origen familiar, la presencia de mutaciones en APP favorece su procesamiento por BACE e incluso una mayor actividad γ -secretasa (Castellani, Rolston *et al.*, 2010).

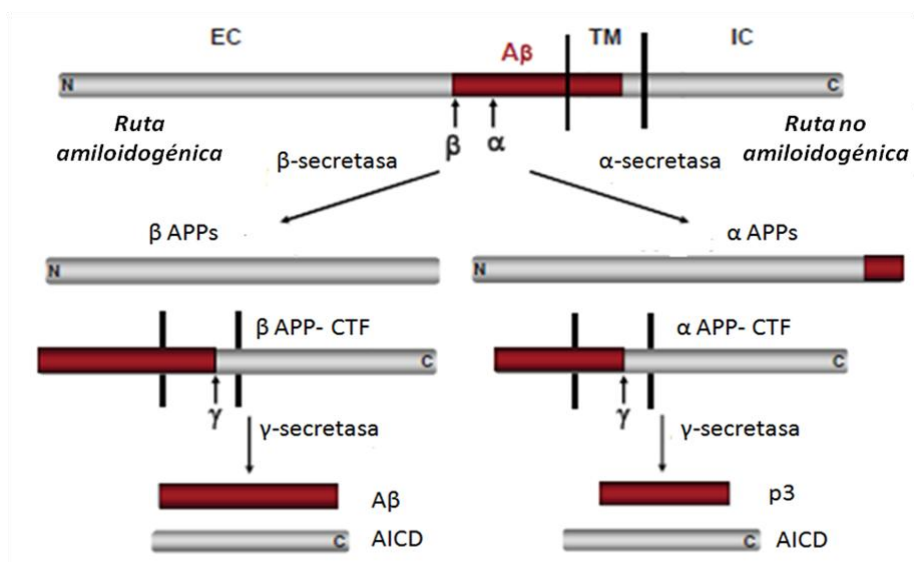


Figura 3. Esquema de las vías de procesamiento de la proteína APP. EC: extracelular; TM: transmembrana; IC: intracelular (Zheng y Koo, 2011)

Con respecto a la diversidad de fragmentos generados, se ha observado que APP α tiene una función neuroprotectora frente a la excitotoxicidad y un importante papel en la supervivencia y plasticidad neuronal en el desarrollo temprano del sistema nervioso central (SNC) y en la regulación de la proliferación neuronal (Vingtdeux y Marambaud, 2012). Además, la expresión de APP α revierte las alteraciones derivadas de la ausencia del gen APP en los ratones knock-out en APP, sugiriendo que la mayor parte de las funciones fisiológicas de APP están mediadas por este fragmento soluble. No obstante, se podría atribuir cierta patogenicidad a la ruta de procesamiento “no amiloidogénica”, ya que se han observado numerosos depósitos del fragmento p3 en pacientes con EA y Síndrome de Down (Zheng y Koo, 2011).

En la ruta “amiloidogénica”, el fragmento APP β , liberado tras la acción de la enzima β -secretasa, podría funcionar como ligando del DR6 (*Death Receptor 6*), receptor de la familia del TNFR (Nikolaev, McLaughlin *et al.*, 2009, Vingtdeux y Marambaud, 2012). Estos receptores de superficie celular transmiten señales de apoptosis al unirse a ligandos

específicos, mediando la destrucción axonal y la muerte de las neuronas, principalmente a través de caspasas.

El fragmento AICD obtenido tras el procesamiento de APP, tanto por la ruta “amiloidogénica” como por la “no amiloidogénica”, facilita la interacción con distintos factores citosólicos que regulan el tráfico intracelular de la APP y la transducción de señales. Este fragmento es capaz de translocarse al núcleo e inducir la expresión de genes pro-apoptóticos, lo cual juega un significativo papel en la sensibilización de neuronas a estímulos tóxicos.

Por otro lado, aunque no se conoce con exactitud la función biológica del péptido β -amiloide, se le asigna un papel en la remodelación axonal y la migración neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso. Igualmente se le considera un inductor de estrés oxidativo con capacidad de alterar distintos transportadores como, por ejemplo, aquellos destinados a mantener la homeostasis del calcio (Mattson, 2004, Gotz, Eckert *et al.*, 2011). Además, numerosos estudios señalan que las placas de β A son capaces de activar caspasas e inhibir el sistema proteasomal (Butterfield, Drake *et al.*, 2001, Ballard, Gauthier *et al.*, 2011, Dennissen, Kholod *et al.*, 2012, McIlwain, Berger *et al.*, 2013).

El péptido β A suele tener una longitud entre 39 y 43 aminoácidos, y si bien el β A de 40 aminoácidos (β A40) es más frecuente, el que presenta una longitud de 42 aminoácidos (β A42) parece ser más amiloidogénico, ya que es más hidrófobo y, por tanto, con mayor tendencia a la agregación. No obstante, tanto β A40 como β A42 parecen ser buenos biomarcadores predictores de la presencia de placas y del estadio de la enfermedad (Holtzman, Morris *et al.*, 2011, Prvulovic y Hampel, 2011).

La toxicidad del péptido β -amiloide no radica exclusivamente en la formación de placas. El péptido es capaz de polimerizarse formando las llamadas “formas solubles de β A”, es decir, oligómeros intermedios capaces de producir un efecto tóxico rápido y masivo, que favorecen el procesamiento de la porción intracelular de APP por caspasas (cisteín-proteasas que se anclan por residuos de aspartato) a nivel del residuo Asp664, liberando un fragmento neurotóxico de 31 aminoácidos conocido como C31. Si a continuación se ancla la enzima γ -secretasa, se genera otro fragmento denominado Jcasp, que interfiere con la interacción proteica presináptica y la señal glutamatérgica (Park, Shaked *et al.*, 2009, Fanutza, Del Prete *et al.*, 2015). Así, el conjunto de fragmentos solubles generados son más tóxicos que las propias placas, e inician de esta forma una cascada de degradación que

podría favorecer la pérdida neuronal y el deterioro del aprendizaje (Fuentealba, Farias *et al.*, 2004, Talaga, 2004)(figura 4).

El conjunto de actividades neurotóxicas que ejercen las distintas formas del péptido β -amiloide constituye la base de la hipótesis de la cascada amiloidogénica como origen de la EA; de ahí la importancia del estudio de las distintas enzimas y mecanismos celulares implicados en su generación.

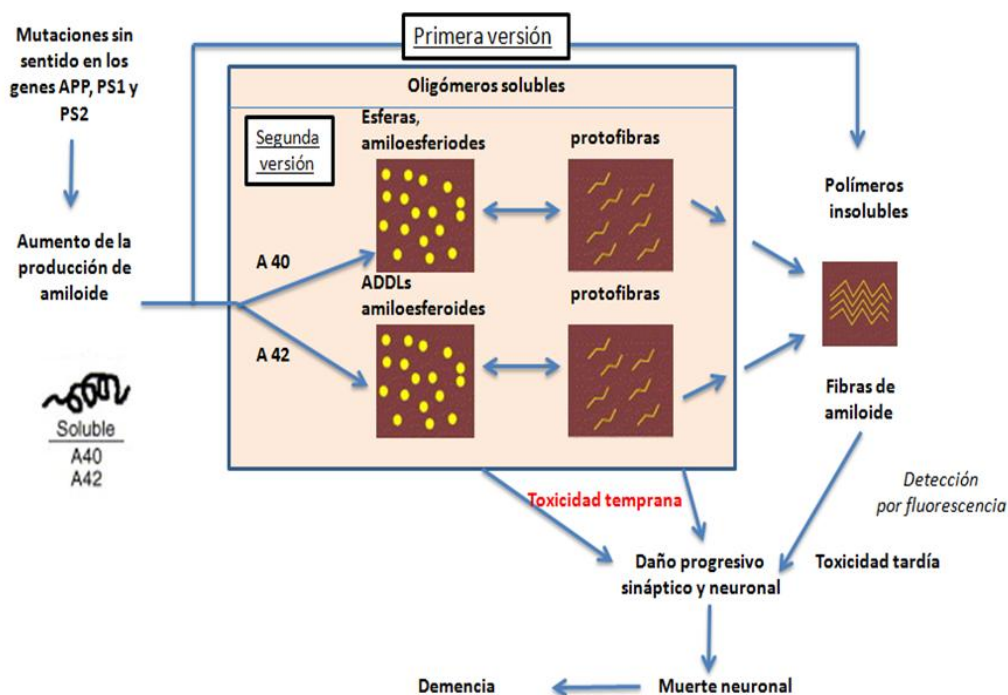


Figura 4. Hipótesis de la cascada amiloidogénica. Los oligómeros solubles de β A, más que las fibras insolubles, son actualmente considerados como los elementos más patogénicos en la enfermedad de Alzheimer (Talaga, 2004).

La enzima α -secretasa

La actividad enzimática α -secretasa parece estar ejercida mayoritariamente por proteínas transmembrana de la familia ADAM, entre las que ADAM10 podría ser la responsable principal de la actividad α -secretasa constitutiva. ADAM9 y ADAM17 han sido relacionadas con la actividad α -secretasa inducida, junto a otras metaloproteasas como MMP9 (Vingtdeux y Marambaud, 2012).

ADAM10 es una proteasa de membrana de unos 750 aminoácidos con distintos dominios funcionales en su región extracelular, entre los que se incluye un sitio catalítico con zinc que podría estar implicado en la actividad α -secretasa. ADAM10 puede funcionar como una proteína señalizadora, y además de APP posee otros sustratos como Notch y N-cadherina (Lichtenthaler, 2011, Saftig y Lichtenthaler, 2015).

El principal interés de esta actividad enzimática en la EA consiste en su papel en el procesamiento “no amiloidogénico” de la proteína APP ya que, al competir con la enzima β -secretasa por el sustrato, disminuiría la síntesis y acumulación de β -amiloide. Esto, unido a los efectos neuroprotectores observados en su producto APP α , ha llevado a considerar la sobreexpresión de ADAM10 como una posible vía terapéutica para la EA. Si bien se han desarrollado activadores de α -secretasa, como pudiera ser el compuesto etazolate (modulador del receptor GABA $_A$ que parece conseguir un aumento de APP α), está aún pendiente evaluar las consecuencias de una sobreactivación o activación crónica de estas enzimas, ya que han sido relacionadas con más de 30 sustratos distintos (Siopi, Llufríu-Daben *et al.*, 2013).

La enzima β -secretasa

La enzima β -secretasa (BACE1) constituye una de las principales dianas terapéuticas dado su papel fundamental en la síntesis del péptido β -amiloide. Se cataloga como una enzima aspártico-proteasa transmembrana de tipo I y con una longitud de unos 500 residuos aminoacídicos, presenta dos residuos de aspártico catalíticos, así como los tres puentes disulfuro característicos de las enzimas de origen mamífero. La cristalografía de su estructura revela que la proteína tiene un lugar de acción similar al de otros miembros de su familia, si bien tiene un patrón inusual de puentes disulfuro, lo que llevó a la sospecha de que sus sustratos podrían cumplir otras especificidades (Dingwall, 2001). En esta línea, se ha relacionado la enzima con sustratos heterogéneos, desde la subunidad 2 del canal de sodio voltaje dependiente (Na $_v\beta_2$) hasta las neuregulinas 1 y 3 (Wang, Li *et al.*, 2013).

La actividad óptima de esta enzima se ejerce a un pH bajo, y se piensa que está predominantemente localizada en compartimentos ácidos intracelulares, como los endosomas (Kandalepas y Vassar, 2012). Al igual que otras aspartilproteasas, la proteína es inicialmente sintetizada como zimógeno en el retículo endoplásmico, en el que experimenta parte de su modificaciones post-transduccionales, además de las que tienen lugar en el aparato de Golgi (Vassar, Kovacs *et al.*, 2009). Sus mayores niveles de expresión se

encuentran en las neuronas cerebrales, a diferencia de su homóloga BACE2, enzima descubierta con posterioridad con la que comparte un 64% de similitud en la secuencia aminoacídica. Sin embargo, BACE2 no parece ejercer actividad proteolítica alguna sobre APP, a diferencia de BACE1.

Es interesante el hecho de que, no habiéndose observado ninguna mutación específica en el gen codificante para esta enzima en los pacientes con EA (Wang, Li *et al.*, 2013), tanto los niveles de proteína BACE1 como su actividad están aproximadamente duplicados (Yang, Lindholm *et al.*, 2003). Esto podría deberse a que, en la EA, se han observado menores niveles de GGA3, proteína estrechamente relacionada con el mecanismo regulador del reciclaje de BACE1. Esta disminución podría dar lugar a un deterioro en la señalización destinada a la destrucción de BACE1 en los lisosomas, incrementando sus niveles en los endosomas tempranos (Kandalepas y Vassar, 2012). Además, hay estudios que sugieren que esta proteína podría ser activada por estrés oxidativo, hipoxia, isquemia, apoptosis o daño traumático cerebral (Vassar, Kovacs *et al.*, 2009); eventos ampliamente relacionados con procesos neurodegenerativos y, por tanto, con la EA. Todo ello remarca la posibilidad de que un aumento de actividad BACE1 podría iniciar o acelerar la patogénesis de la EA.

La enzima γ -secretasa

La actividad γ -secretasa es ejercida por un complejo proteico transmembrana de alto peso molecular. Está formado por cinco proteínas: presenilina-1 (PSEN1), presenilina-2 (PSEN2), nicastrina, APH-1 y PEN-2. Las presenilinas PSEN1 y PSEN2 constituyen el centro catalítico del complejo, nicastrina interviene en el reclutamiento de los sustratos y APH-1 y PEN-2 contribuyen a la estabilidad de todo el complejo (Gotz, Eckert *et al.*, 2011, Galimberti y Scarpini, 2012).

Las presenilinas PSEN1 y PSEN2 forman parte de una gran familia de aspartilproteasas integrales de membrana con una gran homología y, si bien han sido localizadas principalmente en el retículo endoplasmático, también se han observado en la membrana plasmática, vesículas de transporte y compartimentos endocíticos. Asimismo, son numerosos los sustratos con los que se las relaciona (Notch y análogos, tirosinasa, VEGFR1), y se ha demostrado que, por un lado, intervienen en distintas rutas de señalización intercelular y antiapoptóticas y que, por otro lado, son indispensables en la proliferación celular a nivel inmunológico, intestinal y dérmico (Fan y Chiu, 2010, Karran, Mercken *et al.*, 2011).

En algunos de los pacientes con EA, principalmente en aquellos con un desarrollo temprano de la enfermedad, se han observado mutaciones en los genes codificantes para PSEN1 y PSEN2. Los estudios hasta el momento indican que las mutaciones observadas en estos genes, especialmente en PSEN2, conllevan pérdida de eficacia y cambio en su lugar de anclaje sobre β APP-CTF produciendo un desplazamiento en la producción de β -amiloide a favor de β A42 frente a β A40 (Holtzman, Morris *et al.*, 2011, Delabio, Rasmussen *et al.*, 2014, Cacace, Sleegers *et al.*, 2016).

Estas proteínas suponen un importante reto en la búsqueda de un tratamiento en la EA. Si bien constituyen un elemento fundamental en la síntesis de β -amiloide, su complejo rango de actividades implica que su total inhibición daría lugar a numerosos efectos adversos, siendo necesaria la búsqueda de compuestos meramente moduladores (Panza, Frisardi *et al.*, 2011, Sambamurti, Greig *et al.*, 2011, Golde, Koo *et al.*, 2013).

1.2.2. Los ovillos neurofibrilares

Los “ovillos neurofibrilares” (ONF) son unos agregados fibrilares helicoidales que pueden observarse en el interior de los cuerpos nucleares, específicamente en el citoplasma y las dendritas proximales, de pacientes con EA. Constituidos por filamentos pareados helicoidales (*paired helical filaments*, PHFs), son resistentes a la digestión proteica, siendo la proteína Tau el componente mayoritario en sus distintas formas hiperfosforiladas, que además puede presentar diversas modificaciones oxidativas (Citron, 2010, Prvulovic y Hampel, 2011).

La proteína Tau es sintetizada tanto por las células neuronales como por la glía, y su función fisiológica más conocida es la estabilización de los microtúbulos que conforman el citoesqueleto neuronal, contribuyendo al transporte axoplásmico de proteínas y orgánulos. Además, algunas formas específicas de Tau se asocian con DNA nuclear de doble cadena y podrían tener un papel en la regulación genómica (Yen, 2011).

La regulación de la actividad de Tau se realiza a través de su fosforilación o defosforilación. Entre las quinasas encargadas de su fosforilación destacan GSK-3 β , Cdk5, PKA y Akt, mientras que la principal fosfatasa que interviene en su defosforilación es PP2A (Obulesu, Venu *et al.*, 2011, L'Episcopo, Drouin-Ouellet *et al.*, 2016). Cuando Tau es anormalmente fosforilada, principalmente en residuos de serina o treonina, sufre cambios conformacionales que le impiden su interacción con los microtúbulos, polimerizándose y

formando agregados insolubles resistentes a la degradación celular. Aunque puede ser hiperfosforilada en múltiples residuos, las isoformas fosforiladas p-tau181 y p-tau231 son las más utilizadas como biomarcadores de la enfermedad (Cotman, Poon *et al.*, 2005, Prvulovic y Hampel, 2011).

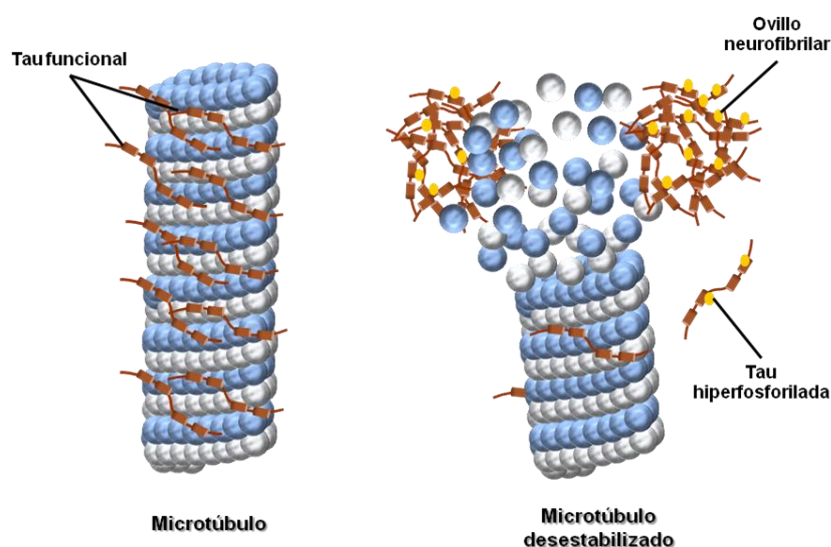


Figura 5. Representación de un microtúbulo en condiciones fisiológicas frente a un microtúbulo desestabilizado por hiperfosforilación de Tau.

La alteración de Tau y la presencia de ovillos neurofibrilares no son sólo características de la EA, ya que se han observado en distintas patologías de origen neuronal y en ausencia de acumulación amiloide, como pueden ser la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear, la degeneración corticobasal o la demencia frontotemporal (Hardy, Pittman *et al.*, 2006, Citron, 2010). No obstante, la presencia de ovillos neurofibrilares empeora el pronóstico de la enfermedad, puesto que se relaciona directamente con procesos de neurodegeneración y desórdenes cognitivos. La evidencia científica señala una clara correlación entre el número y localización de estos agregados con el grado de severidad de la EA. Los estudios clínicos determinan que la agregación de las moléculas de Tau hiperfosforiladas comienza unos 3 ó 4 años antes de la expresión evidente de la sintomatología de la EA, y tras la aparición de ésta, es el proceso mayoritariamente descrito, si bien la agregación amiloide, la gliosis y la inflamación ya son importantes en este estadio. Por tanto, además de la creciente evidencia de que las formas hiperfosforiladas de Tau hacen más sensibles a las neuronas colindantes a la toxicidad por β A, los ovillos neurofibrilares se consideran importantes contribuyentes de la muerte neuronal (Gotz, Eckert *et al.*, 2011, Galimberti y Scarpini, 2012).

Tau y caspasas

En la EA, es frecuente observar que parte de la Tau presente en los ONF se encuentra no sólo hiperfosforilada, sino anormalmente truncada en su extremo C- terminal. Este extremo parece ser el principal impedimento para la agregación de distintos filamentos de Tau entre sí, y su hidrólisis favorece que la proteína adopte la conformación MC1 (Abraha, Ghoshal *et al.*, 2000, Cotman, Poon *et al.*, 2005). La conformación MC1 ha sido descrita con anterioridad en otras patologías y se caracteriza por su capacidad para agregarse más rápidamente y ser proapoptótica (Gamblin, Chen *et al.*, 2003, Newman, Rissman *et al.*, 2005, Shahani, Subramaniam *et al.*, 2006).

Dado que con anterioridad a la formación de los ONF se puede observar una clara inducción de la activación caspasa, en la actualidad se considera a las caspasas como principales responsables de la proteólisis de Tau en su extremo C-terminal. En concreto, se relaciona a las caspasas 3, 7 y 8 con su hidrólisis, preferentemente en los residuos Asp421 o Asp402 (Cotman, Poon *et al.*, 2005, McIlwain, Berger *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta los estudios que señalan que los péptidos amiloidogénicos son capaces de provocar la apoptosis celular por medio de la activación de caspasas (Velez-Pardo, Ospina *et al.*, 2002, Nikolaev, McLaughlin *et al.*, 2009, Ballard, Gauthier *et al.*, 2011, Gotz, Eckert *et al.*, 2011), esta segunda conexión entre las caspasas y Tau supone una pieza fundamental que relaciona los dos signos característicos de la EA, las placas de β -amiloide y los ONF. De esta manera, el β A liberado activaría la cascada de las caspasas, las cuales a su vez hidrolizarían formas de Tau hiperfosforiladas favoreciendo su agregación y así, conjuntamente, aumentarían exponencialmente todo el proceso patológico subyacente que conduce a la pérdida sináptica y neuronal (Chung, Song *et al.*, 2001, Gamblin, Chen *et al.*, 2003, Cotman, Poon *et al.*, 2005).

Esta hipótesis, clave para entender el desarrollo de la EA, se ve reforzada por los estudios que señalan que la formación de ONF se incrementa por la presencia de β -amiloide (Wang, Ren *et al.*, 2016), así como el hecho de que las neuronas deficientes en Tau son más resistentes a la toxicidad inducida por β A, lo que sugiere que Tau es una diana crítica en el proceso iniciado por el β -amiloide (Rapoport, Dawson *et al.*, 2002). Igualmente, si bien las mutaciones de Tau y los ONF se asocian con muerte neuronal y con enfermedades neurodegenerativas, hasta el momento no han sido relacionados ni con el origen de la acumulación de β -amiloide ni con las formas familiares de EA. Por el contrario, mutaciones en la ruta de APP que se asocian con la aparición temprana de la EA conducen a la

formación de placas de β -amiloide y además de ONF. Así pues, mientras que Tau es necesaria para la formación de ONF en la EA, no lo es para la formación de placas, lo cual indica que su papel en la patología parece estar supeditado al del β -amiloide (Cotman, Poon *et al.*, 2005).

1.2.3. El sistema proteasomal

El sistema proteasomal o proteasoma es un complejo enzimático multicatalítico responsable de la degradación fisiológica del 80-90% de las proteínas celulares. Mayoritariamente se localiza próximo a la superficie citoplasmática del retículo endoplasmático y sus sustratos son principalmente proteínas anormalmente sintetizadas o dañadas, pero entre ellos también se incluyen reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, oncogenes y genes supresores de tumores. Además, el proteasoma participa de forma muy significativa en la proteólisis selectiva de antígenos para su presentación por las moléculas del Complejo de Histocompatibilidad de clase I (MHC-I), clave para el funcionamiento del sistema inmune (Eleftheriadis, 2012).

Este gran complejo enzimático está constituido por una partícula central que constituye el núcleo catalítico (proteasoma 20S), y varios tipos de fragmentos activadores del proteasoma (*proteasome activators*) que interaccionan con él a modo de subunidades reguladoras dando lugar a diferentes subclases de proteasomas. Entre los fragmentos activadores del proteasoma destacan el 11S y el 19S, y las formas finales del sistema proteasomal más relevantes son los denominados proteasomas 20S y 26S.

El núcleo 20S (proteasoma 20S) es un complejo proteico en forma de barril formado por cuatro anillos de 7 subunidades. Los anillos externos, constituidos por subunidades α , permiten la entrada y salida de sustratos proteicos desplegados así como la interacción con las partículas reguladoras. Los anillos internos, formados por subunidades β , constituyen una cámara donde se ejerce la actividad proteolítica de caspasa o peptidil-glutamil-hidrolasa (β 1), tripsina (β 2) y quimotripsina (β 5). En condiciones de estrés oxidativo, este núcleo es activado por poli-ADP-ribosilación y sirve como ruta mayoritaria para la degradación de proteínas oxidadas, proceso para el que no requiere ATP (Dennissen, Kholod *et al.*, 2012).

La partícula reguladora 11S (también conocida como PA28) puede ser un heteroheptámero de proteínas PSME1 y PSME2 o un homoheptámero de PSME3. Esta partícula reguladora carece de actividad ATPasa y está involucrada en la generación de

inmunoproteasomas inducida por interferón γ para facilitar la presentación de antígenos por las moléculas MHC de clase I (Sugiyama, Sahashi *et al.*, 2013). Por otro lado, la partícula reguladora 19S (o PA700) se puede subdividir en una base y una tapa con diferentes funciones: la base, con actividad ATPasa, facilita la apertura del núcleo 20S, interviene en el desplegamiento y la transición de estructuras globulares, contribuye al ligado de sustratos y a su translocación; la tapa, con una función menos definida hasta la fecha, parece estar implicada en la regulación transcripcional y la desubiquitinación específica de los sustratos proteasomales. Cuando una partícula 11S y otra 19S interaccionan con el proteasoma 20S constituyen el proteasoma 26S, forma proteasomal híbrida cuya principal función es la degradación de proteínas que han sido previamente marcadas con ubiquitina, aunque también puede degradar otras proteínas no ubiquitinadas, requiriendo ATP para ejercer su actividad (DeMartino, 2005, Shang y Taylor, 2011).

El proteasoma es un orgánulo que se expresa de forma constitutiva en todos los tejidos celulares, siendo su papel especialmente importante en las neuronas por ser células más sensibles al estrés oxidativo. En cerebros normales, el proteasoma garantiza la adecuada eliminación de todas aquellas proteínas defectuosas o innecesarias; sin embargo, el envejecimiento fisiológico conlleva una progresiva disminución de su actividad que da lugar a un almacenamiento progresivo en el citosol de las proteínas que no han podido ser degradadas (Jung, Catalgol *et al.*, 2009, Yen, 2011). Además, en la EA se ha descrito un mayor deterioro en la funcionalidad del proteasoma, especialmente en el hipocampo y la corteza cerebral, lo cual podría ser el origen del acúmulo observado de proteínas anormalmente oxidadas y la presencia de agregados proteicos (Keller, Hanni *et al.*, 2000, Tai, Serrano-Pozo *et al.*, 2012); dado que, si bien el péptido β A es degradado principalmente por metaloproteasas, plasmina y catepsina B, se ha demostrado que tanto BACE1 como Tau son sustratos proteasomales (proteasomas 26S y 20S, respectivamente). Esta hipótesis se ve respaldada por la presencia de diversas mutaciones de ubiquitina entre las proteínas que constituyen las placas de β -amiloide y los ONF, lo que sugiere que la pérdida de actividad del sistema de señalización proteasomal podría ser la que originase el deterioro observado en la enfermedad (Yen, 2011, Ihara, Morishima-Kawashima *et al.*, 2012).

No obstante, el daño en el sistema proteasomal se encuentra presente en muchos procesos neurodegenerativos y podría no ser la causa primaria de las mismas, sino su consecuencia. Numerosos estudios señalan que tanto el estrés oxidativo, el acúmulo de agregados proteicos y proteínas oxidadas, como incluso la sola presencia de β A, son capaces de inhibir la actividad proteasomal, exacerbando exponencialmente la posible

disfunción presente y contribuyendo de manera significativa en la progresión de la EA (Dennissen, Kholod *et al.*, 2012). De cualquier forma, el sistema proteasomal está claramente involucrado en el desarrollo de esta patología.

1.2.4. El estrés oxidativo

El sistema nervioso, debido al alto contenido en sustancias oxidables -como ácidos grasos poliinsaturados-, la baja actividad catalasa y la limitada capacidad quelante de metales, es particularmente sensible al daño oxidativo (Ansari, Abdul *et al.*, 2009). En la EA se ha demostrado un aumento de los procesos oxidativos de lípidos, proteínas y ADN, alteraciones en las concentraciones de algunos factores pro-oxidantes y antioxidantes en el cerebro y en otros tejidos como el glutatión reducido, así como perturbaciones de la función mitocondrial. Tanto las neuronas, a nivel individual, como las distintas áreas corticales, de forma global, se caracterizan por la alta tasa de modificaciones oxidativas. Consecuentemente, el desequilibrio oxidativo se considera una de las causas más tempranas, no sólo de la EA, sino también de otras enfermedades neurodegenerativas (Butterfield, Perluigi *et al.*, 2006, Ono, Hamaguchi *et al.*, 2006, Clark, Lee *et al.*, 2010).

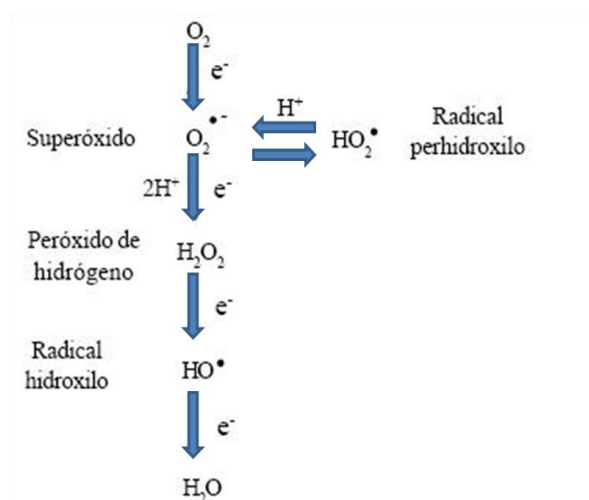


Figura 6. Química de las especies reactivas de oxígeno (ERO).

Los seres vivos generan especies reactivas de oxígeno (ERO) (figura 6) como resultado del metabolismo aerobio fisiológico y su producción aumenta ante cualquier lesión tisular. De igual modo, los organismos vivos poseen diversos mecanismos de defensa frente a las reacciones oxidativas, destinados a la eliminación de ERO y a la reparación del daño producido por estas moléculas. Así pues, el término “estrés oxidativo” hace referencia a los

estados patológicos como la EA en los que la producción de ERO podría ser tan abundante como para sobresaturar los sistemas neutralizadores; bien debida a un exceso de producción de sustancias prooxidantes, al déficit de mecanismos de defensa frente a la oxidación, o a ambos factores (Reiter, 1995). Sería en esos estados cuando las especies oxidantes producirían la oxidación de lípidos, proteínas, hidratos de carbono y material genético (figuras 7-10) alterando de manera irreparable las funciones de enzimas, ATPasas y otros transportadores, la homeostasis electrolítica y el metabolismo energético. En definitiva, el estrés oxidativo contribuiría a hacer a las células más vulnerables a la apoptosis, a la excitotoxicidad y a la hipoxia (Halliwell y Gutteridge, 1984).

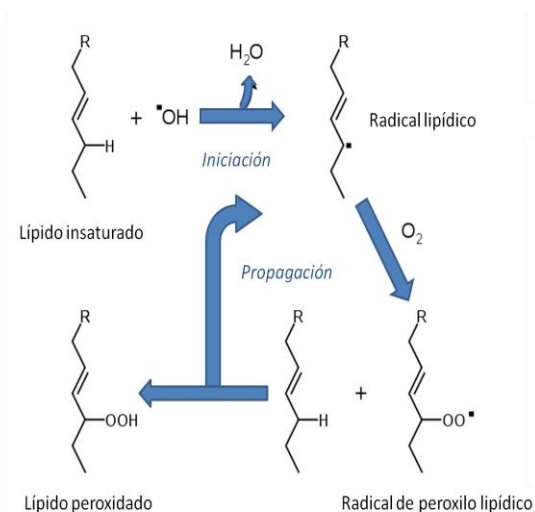


Figura 7. Mecanismo de peroxidación lipídica (Clark, 2008).

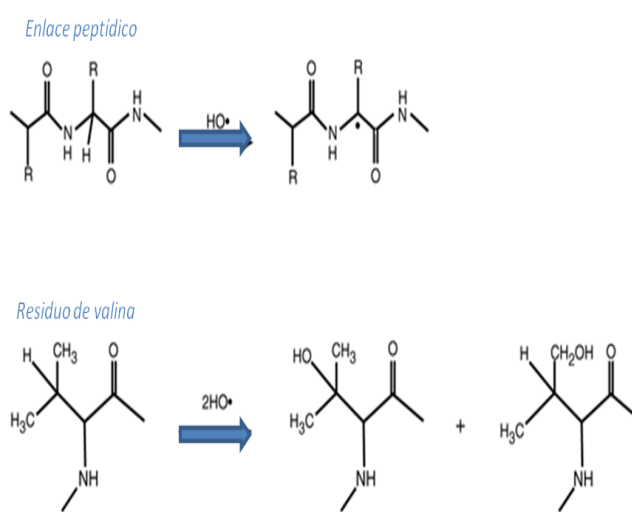


Figura 8. Ejemplos de oxidación en proteínas (Clark, 2008).

En el tejido neuronal de los pacientes con EA, la mayoría de los estudios ha demostrado un aumento de los marcadores de peroxidación lipídica, especialmente en la corteza temporal y el hipocampo, en los que además se ha descrito un importante descenso en la fluidez de las membranas mitocondriales (Mecocci, Cherubini *et al.*, 1996, Mecocci, Beal *et al.*, 1997, Dei, Takeda *et al.*, 2002, Pratico, Clark *et al.*, 2002). Además, es bien conocido que en los pacientes con EA hay una gran acumulación de proteínas oxidadas en todas las áreas cerebrales, pero especialmente en la corteza frontal y en el lóbulo parietal (Carney, Smith *et al.*, 1994, Aksenov, Aksenova *et al.*, 2001, Korolainen, Goldsteins *et al.*, 2002). Y, de igual manera, en pacientes con EA se ha descrito un aumento en el lóbulo parietal de la

concentración de 8-hidroxi-2'desoxiguanosina (8-oxo-dG), parámetro que se utiliza como índice del daño oxidativo al ADN, al igual que otras bases nitrogenadas en la corteza temporal, occipital y frontal y en el hipocampo (Lyras, Cairns *et al.*, 1997, Nunomura, Perry *et al.*, 2001, Butterfield, Perluigi *et al.*, 2006, Galasko y Montine, 2010). Todas estas evidencias de oxidación están presentes desde los estadios iniciales de la EA, antes del comienzo sintomático de la demencia, y son más acusadas en los ovillos neurofibrilares, las neuritas distróficas y los astrocitos reactivos (Iida, Furuta *et al.*, 2002, Galasko y Montine, 2010, Ballard, Gauthier *et al.*, 2011). Por ello, los procesos de oxidación se consideran una pieza clave en la etiología de la enfermedad ya que pueden incluso favorecer la amiloidogénesis (Matsuoka, Picciano *et al.*, 2001, Castellani, Rolston *et al.*, 2010, Clark, Lee *et al.*, 2010, Butterfield, Swomley *et al.*, 2013).

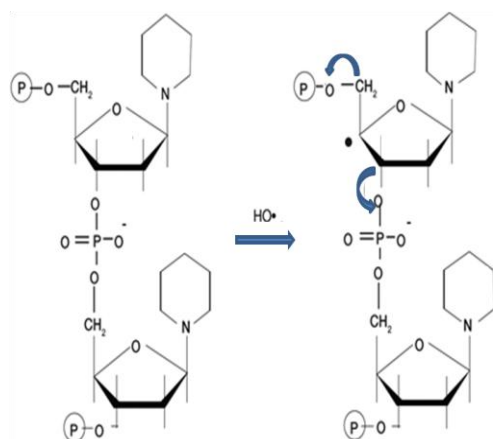


Figura 9. Oxidación del ADN (Clark, 2008).

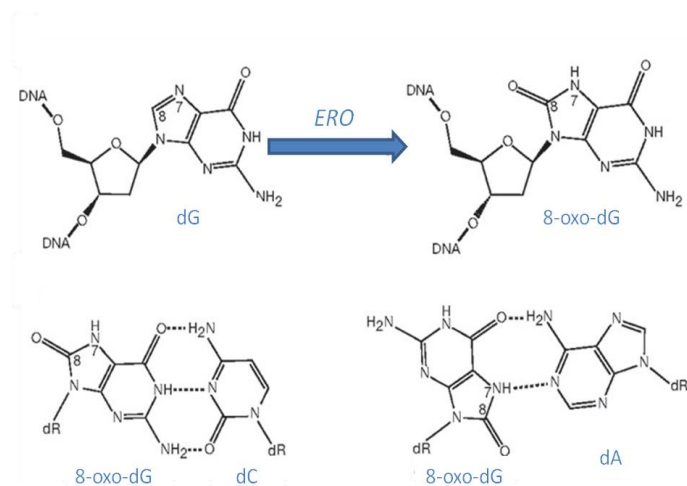


Figura 10. La 8-hidroxi-2'desoxiguanosina, mutagénico formado por oxidación del ADN (Hsu, Ober *et al.*, 2004).

El papel del β -amiloide en el estrés oxidativo

Son muchos los estudios que indican que la producción y agregación del β -amiloide conduce a la generación de peróxido de hidrógeno y a la reducción de los sistemas antioxidantes, proceso que podría ser potenciado en presencia de cationes metálicos como hierro y cobre (Butterfield, Drake *et al.*, 2001, Butterfield, Perluigi *et al.*, 2006, Clark, Lee *et al.*, 2010, Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011, Butterfield, Swomley *et al.*, 2013, Fonseca, Ferreira *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que el tratamiento agudo y crónico de cultivos de células de corteza cerebral con los fragmentos 25-35 y 1-42 del péptido β -amiloide induce estrés oxidativo (Cafe, Torri *et al.*, 1996, Butterfield, Castegna *et al.*, 2002). Esto puede deberse a que los fragmentos 1-42 y 1-40 del β -amiloide humano son capaces de generar por sí mismos peróxido de hidrógeno por un mecanismo que involucra la reducción de Fe^{3+} o Cu^{2+} mediante la reacción de Fenton, actuando a modo de una metaloenzima (Huang, Cuajungco *et al.*, 1999)(figura 11). Además, tanto las formas oligoméricas solubles como el fragmento 25-35 del β -amiloide son capaces de inducir daño oxidativo en el ADN mitocondrial (Bozner, Grishko *et al.*, 1997, Devi y Ohno, 2012), así como muerte neuronal por apoptosis, que es mediada por el peróxido de hidrógeno, 4-hidroxinonenal y caspasa 3, y puede ser prevenida por antioxidantes como vitamina E y N-acetilcisteína (Velez-Pardo, Ospina *et al.*, 2002, Tamagno, Parola *et al.*, 2003, Tamagno, Robino *et al.*, 2003).

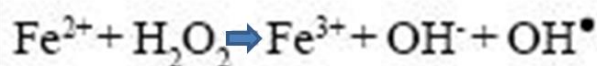


Figura 11. Reacción de Fenton

Esta vinculación entre el β -amiloide y el estrés oxidativo también ha sido observada en modelos *in vivo*: En modelos de ratones transgénicos de EA con aumento de la expresión de la APP humana se ha observado un aumento del daño oxidativo, de la peroxidación lipídica, de la producción de nitrotirosina y de la expresión de Cu/Zn-Superóxido dismutasa y hemoxigenasa-1 en los alrededores de los depósitos de β -amiloide (Matsuoka, Picciano *et al.*, 2001, Drake, Link *et al.*, 2003). También se ha descrito un aumento del estrés oxidativo en ratones transgénicos con mutaciones de presenilina-1 (LaFontaine, Mattson *et al.*, 2002). Y lo que es más, el pretratamiento con algunos antioxidantes como idebenona y α -tocoferol previene la aparición de trastornos de aprendizaje y memoria causados por el β -amiloide (1-42) en ratas. La vitamina E también parece prevenir el daño oxidativo a las proteínas inducido por el β -amiloide (25-35) (Yamada, Tanaka *et al.*, 1999).

El papel de la mitocondria

La mitocondria es un orgánulo crucial en el metabolismo celular, encargado del suministro celular de energía, de la homeostasis de calcio e incluso de la regulación de la apoptosis. Este orgánulo contiene su propio material genético, sin embargo, el ADN mitocondrial carece de la protección estructural de las histonas y de mecanismos de reparación, por lo que es muy susceptible a ser dañado por ERO (Croteau y Bohr, 1997).

El grado de neurodegeneración en la EA, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o la Enfermedad de Huntington, se correlaciona con el grado de disfunción mitocondrial (Maruszak y Zekanowski, 2011). En los pacientes que desarrollan EA, previamente a la aparición de la sintomatología clínica, se ha descrito un descenso del número de mitocondrias y de la actividad mitocondrial, lo que conduce a una disminución del consumo de glucosa en regiones específicas cerebrales, así como a la depleción de ATP y a la inducción de una isquemia química en dicho orgánulo (Devi y Ohno, 2012, Zhao y Zhao, 2013). Además de desestabilizar el metabolismo energético, la disfunción mitocondrial conlleva una alteración del equilibrio iónico y la fuga de electrones de la cadena de transporte electrónico, lo que supone una importante fuente de radicales libres. En los casos de alteración mitocondrial más acusada puede llegar a producirse la liberación de citocromo c, lo cual desencadenaría la activación de rutas celulares proapoptóticas.

Se han postulado diversas teorías acerca del origen de la disfunción mitocondrial en la EA, como pudiera ser la hiperfosforilación de Tau (Pritchard, Dolan *et al.*, 2011) o la inhibición del sistema ubiquitina-proteasomal, que conduce a la reducción del potencial de membrana mitocondrial (Maharjan, Oku *et al.*, 2014). Igualmente, numerosos estudios inciden en que el origen de la alteración mitocondrial podría estar en un daño oxidativo externo, que daría lugar a un círculo vicioso por el cual el deterioro mitocondrial generaría exponencialmente más especies reactivas (Bonda, Wang *et al.*, 2010, Arun, Liu *et al.*, 2016). Asimismo, buena parte de la evidencia científica señala que el acúmulo de β -amiloide u otros péptidos resultantes del procesamiento de APP podría estar relacionado con esta disfunción, ya que se ha observado que monómeros y oligómeros de β A, así como el péptido C99, se acumulan tanto en el mitoplasma como en la membrana mitocondrial (Manczak, Anekonda *et al.*, 2006, Manczak, Mao *et al.*, 2010), donde parecen actuar como inhibidores en la actividad respiratoria mitocondrial, interfiriendo en la actividad de los complejos II y IV y alterando el propio citocromo c. Incluso se ha observado que dichos

péptidos pueden alterar las proteínas relacionadas con la fusión y fisión mitocondrial (Readnower, Sauerbeck *et al.*, 2011, Devi y Ohno, 2012, Arun, Liu *et al.*, 2016).

Por otro lado, cabe hacer alusión también al significativo número de mutaciones en el ADN mitocondrial de pacientes con EA. El genoma mitocondrial presenta ciertos rasgos que le hacen más vulnerable que el nuclear, y especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes. El ADN mitocondrial carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del ADN; su sistema de reparación es poco efectivo y, además, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial. Otro factor distintivo del ADN mitocondrial es la carencia de intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta a una zona de ADN codificante y su repercusión suele ser, por tanto, más decisiva. Por todo ello, el material génico mitocondrial sufre múltiples mutaciones con consecuencias morfológicas y funcionales severas tanto a nivel mitocondrial como celular (Mecocci, Beal *et al.*, 1997). Algunas de estas mutaciones, como las que afectan al complejo IV de la cadena de electrones, se han observado principalmente en pacientes con EA, y podrían explicar la base hereditaria de la enfermedad (Coskun, Beal *et al.*, 2004, Wang y Youle, 2009, Yao y Brinton, 2011).

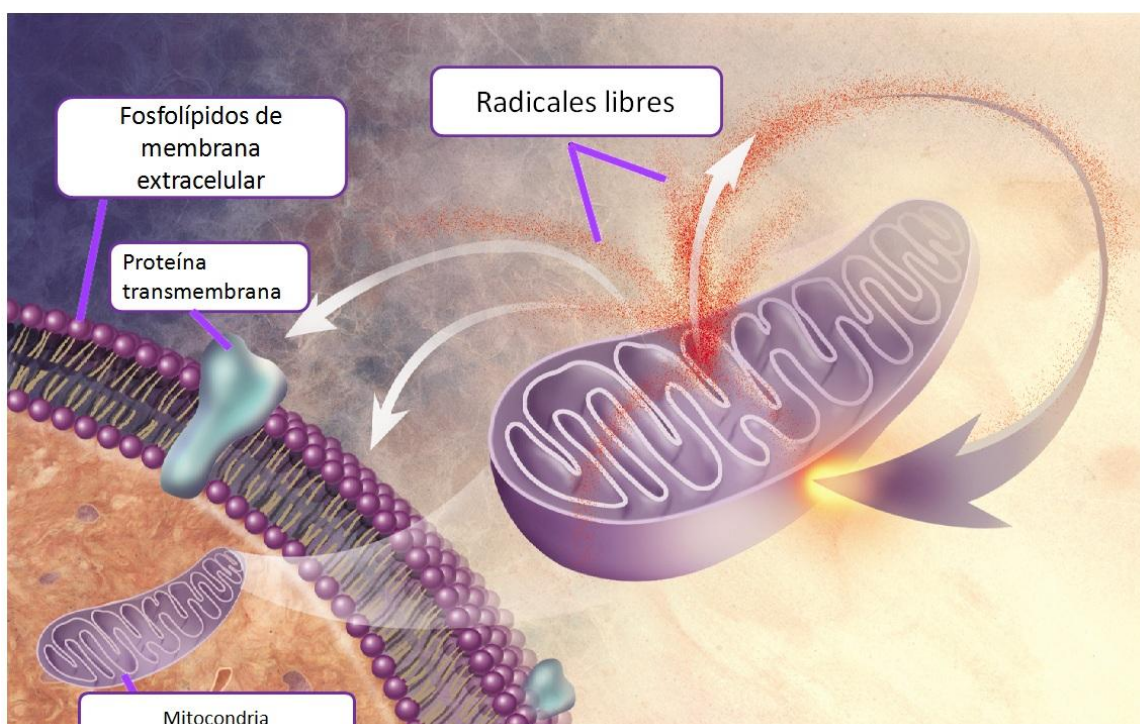


Figura 12. La disfunción mitocondrial provoca un aumento en la formación de ERO que resultan lesivos para la célula. Adaptación de imagen procedente del National Institute on Aging (NIH) (<http://nacanet.nia.hin.gov/Alzheimers/Resources/HighRes.htm>).

1.2.5. El desarrollo de inflamación

Las células de la glía constituyen la mayor parte del volumen cerebral y juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del SNC. Con una estimulación apropiada, responden ante patógenos, eliminan los desechos celulares y promueven la reparación celular. Sin embargo, la activación excesiva y crónica de la glía puede causar daños irreparables y contribuir al proceso degenerativo al agregarse alrededor de las placas y neuronas degeneradas, activando la cascada del complemento, quimiocinas y pentraxinas como la proteína C reactiva, así como secretando citoquinas inflamatorias y toxinas (Mattson, 2004, Citron, 2010). Este daño neuronal progresivo involucra ambos sistemas inmunológicos, innato y adaptativo, y se produce especialmente a través del óxido nítrico (*Nitric oxide*, NO), estrechamente relacionado con las ERO, que contribuyen al desequilibrio oxidativo presente en la EA (Gahtan y Overmier, 1999) (figura 13).

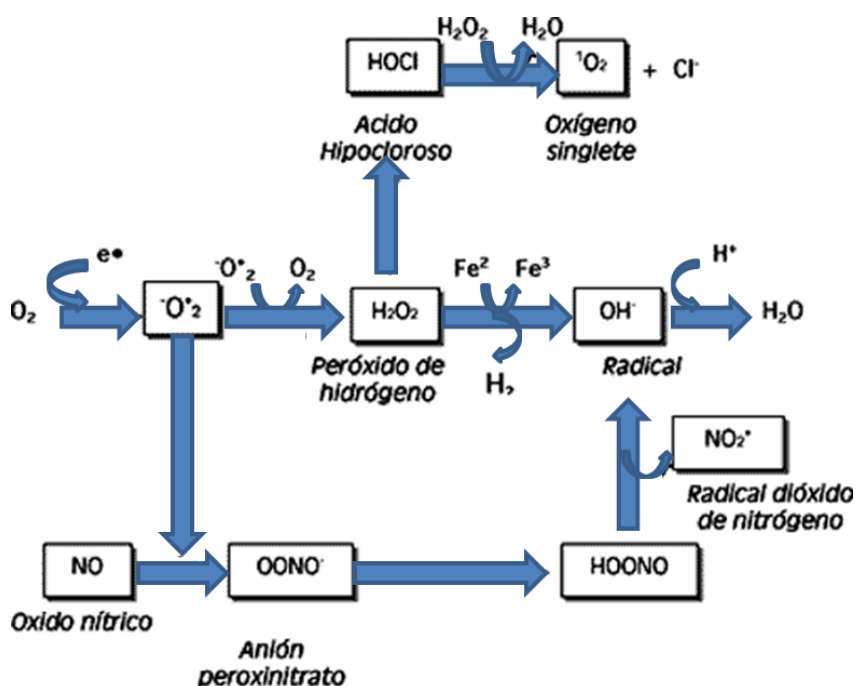


Figura 13. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Son numerosas las evidencias que asocian a los radicales nitrogenados con la EA:

- Los niveles de nitratos y nitritos se han encontrado disminuidos en la corteza frontal de pacientes con EA, en comparación con controles jóvenes (DiCiero Miranda, de Bruin *et al.*, 2000).
- En los ONF de pacientes con EA se ha detectado nitrotirosina, que no está presente en los pacientes control, y se ha observado que ésta se localiza junto con la óxido nítrico sintasa (*nitric oxide synthase*, NOS) neuronal en las células corticales piramidales (Good, Werner *et al.*, 1996, Smith, Vasak *et al.*, 1998, Luth, Munch *et al.*, 2002). También se ha descrito la presencia de nitrotirosina en el epitelio olfatorio de pacientes con EA, que no se observa en los controles no dementes (Getchell, Shah *et al.*, 2003).
- Los productos finales de glicación avanzada se colocalizan con la NOS inducible en los pacientes con EA, en los cuales se ha descrito un aumento de los niveles cerebrales del producto de nitración 5-nitro- γ -tocoferol (Wong, Luth *et al.*, 2001, Williamson, Gabbita *et al.*, 2002)
- Los niveles de dimetilargininasa, que intervienen en la regulación de la actividad de la NOS, aumentan en las neuronas de pacientes con EA sometidas a estrés oxidativo (Smith, Vasak *et al.*, 1998).
- La producción de NO por macrófagos humanos se estimula tanto por la apolipoproteína E (ApoE) como por el péptido β -amiloide (Vitek, Snell *et al.*, 1997), el cual también provoca un aumento de la producción de NO por parte de los astrocitos (Akama, Albanese *et al.*, 1998).

1.2.6. La enzima acetilcolinesterasa

La hipótesis colinérgica de la EA hace alusión a un déficit en la función colinérgica cerebral como origen de la enfermedad, puesto que la acetilcolina tiene una papel crítico en la función cognitiva (Fan y Chiu, 2010, Martorana, Esposito *et al.*, 2010, Mendiola-Precoma, Berumen *et al.*, 2016). Por ello, los fármacos desarrollados según esta hipótesis tienen como objeto el aumento del nivel de este neurotransmisor cerebral gracias a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE). No obstante, el cociente beneficio/riesgo de los inhibidores de acetilcolinesterasa es limitado, principalmente debido a las reacciones

adversas que desencadenan y a que ejercen beneficios modestos en los pacientes sometidos a tratamiento (Martorana, Esposito *et al.*, 2010).

Por otro lado, el descubrimiento de que la acetilcolinesterasa podría interactuar con el β -amiloide, favoreciendo su agregación y participando en su toxicidad, ha renovado el interés en la investigación de nuevos inhibidores de esta enzima (Singh, Kaur *et al.*, 2013). Se postula que la acetilcolinesterasa se une a través de un sitio periférico a la forma no amiloidogénica del péptido β -amiloide y actúa como una proteína chaperona, induciendo un cambio en la conformación del péptido a una forma más amiloidogénica, con la formación posterior de fibrillas o protofibras (Fuentealba, Farias *et al.*, 2004). De igual manera, hay estudios que señalan que los complejos β A-AChE provocan un aumento del calcio intracelular que puede dar lugar a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Dinamarca, Sagal *et al.*, 2010). Además de la interacción de esta enzima con el péptido β A y su colocación con las placas, se ha demostrado que la AChE interacciona con la presenilina-1 (PSEN1), por lo que podría influir en el procesamiento de APP (Garcia-Ayllon, Silveyra *et al.*, 2008, Silveyra, Evin *et al.*, 2008).

Esto ha conducido a reconsiderar esta enzima como una diana farmacológica ya que interviene, por un lado, en la hidrólisis de la acetilcolina, y por otro, en la fibrillogénesis del péptido β -amiloide (Dinamarca, Sagal *et al.*, 2010). Así pues, la nueva generación de inhibidores de la actividad de acetilcolinesterasa no sólo se centraría en la actividad catalítica de la proteína, sino también en su capacidad para actuar como una chaperona por medio de un sitio de unión periférico (Bolognesi, Bartolini *et al.*, 2011).

1.2.7. Genes de riesgo

Aunque la mayoría de los estudios genómicos sobre la EA se centran en las mutaciones del gen de APP (algunas de las cuales parecen favorecer el procesamiento de APP mediante la ruta amiloidogénica), situado en el cromosoma 21, muchos otros señalan que las mutaciones en las presenilinas 1 y 2 (PSEN1 y PSEN2), de los cromosomas 14 y 1, respectivamente, constituyen el origen de la EA familiar (hereditaria). Estos genes se relacionan con la actividad de la γ -secretasa, y su mutación parece dar lugar a una mayor acumulación de β A42 y placas amiloides (Cacace, Sleegers *et al.*, 2016).

Por otro lado, los casos de EA esporádica se han relacionado mayoritariamente con mutaciones en el cromosoma 19, en concreto en el gen de la ApoE (Alonso Vilatela, Lopez-

Lopez *et al.*, 2012, Chouraki y Seshadri, 2014). La enzima ApoE es un importante regulador de los niveles de lipoproteínas del plasma, y es producida tanto a nivel hepático como cerebral, donde los niveles de HDL son elevados gracias a los astrocitos. Si bien esta enzima participa en muchos procesos, como el transporte del colesterol, la regulación de la plasticidad neuronal y la inflamación, parece además relacionarse con el metabolismo del péptido β -amiloide, favoreciendo la formación de agregados y reduciendo su aclaramiento. Entre los alelos que se han descrito, el ApoE4 es el de mayor riesgo por asociarse con mayores niveles de deposición amiloidea y mayor incidencia de hemorragia; y el alelo ApoE2, por el contrario, es comúnmente definido como protector (Montine, Huang *et al.*, 1996, Butterfield, Castegna *et al.*, 2002, Barberger-Gateau, Raffaitin *et al.*, 2007, Ballard, Gauthier *et al.*, 2011).

1.2.8. Los metales de transición

Es bien conocida la estrecha relación entre algunos cationes metálicos de transición (aluminio, cobre y hierro) con el desarrollo de la EA, ya que pueden funcionar como catalizadores tanto en la formación de radicales libres como en la agregación amiloidea. Entre los datos más relevantes al respecto, podemos mencionar:

- Una acumulación de hierro y de aluminio en las placas seniles y ovillos neurofibrilares podría contribuir al estrés oxidativo (Youdim, 1988, Jellinger, Paulus *et al.*, 1990, Good, Perl *et al.*, 1992).
- La emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) ha mostrado un aumento de las concentraciones de hierro, calcio, fósforo y sulfuro en las placas seniles y en el tejido circundante de los pacientes con EA (Watt, 1996).
- Mediante resonancia magnética se ha encontrado un incremento de la concentración de hierro ligado a la ferritina en el caudado y el putamen, siendo normal en la corteza frontal (Bartzokis y Tishler, 2000).
- Una de las proteínas reguladoras del hierro, IRP-2, está aumentada en las lesiones intraneuronales, incluso en los ovillos neurofibrilares, las placas seniles y las fibrillas del neuropilo, mientras que la IRP-1 presenta niveles similares en el cerebro de los pacientes con EA y en los controles (Smith, Vasak *et al.*, 1998).

- La concentración de ceruloplasmina (proteína transportadora de cobre) está incrementada en el LCR (Loeffler, DeMaggio *et al.*, 1994), disminuida en la sustancia gris y en la sustancia blanca de la circunvolución temporal superior (Connor, Tucker *et al.*, 1993), y aumentada en hipocampo, corteza entorrinal y frontal y putamen de pacientes con EA (Loeffler, LeWitt *et al.*, 1996).
- La activación instrumental de neutrones ha mostrado un incremento de cobre, zinc, hierro, selenio y mercurio en algunas áreas cerebrales, particularmente en el hipocampo y la amígdala (Deibel, Ehmann *et al.*, 1996, Cornett, Markesbery *et al.*, 1998).

Además de los elementos mencionados en los apartados anteriores, existen otros factores que se están estudiando para determinar la importancia de su implicación en el proceso. Así pues, todos estos elementos caracterizan a la EA como un trastorno complejo, con numerosos factores a tener en cuenta y múltiples dianas susceptibles de intervención farmacoterapéutica. Entre las dianas más estudiadas se encuentran la enzima β -secretasa y su producto el péptido β -amiloide, además del estrés oxidativo y la participación de metales. Y así, en la actualidad, existen numerosos estudios de compuestos antioxidantes (endógenos, de origen natural o de síntesis), quelantes, inhibidores de la agregación amiloidea o desagregantes, moduladores o inhibidores enzimáticos de secretasas, y un largo etcétera.

1.3. El tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

En la EA se pueden diferenciar básicamente dos tipos de tratamiento: aquellos enfocados a prevenir o retrasar su aparición, es decir, los orientados a aminorar la sintomatología de la enfermedad, y los basados en la etiología de la enfermedad que buscan reducir su progresión. Todos ellos, hasta el momento, han dado lugar a unos resultados de modesta eficacia, posiblemente debido al origen multifactorial de la EA, que hace complejo el hallazgo de terapias eficaces que abarquen suficientemente la complejidad de la enfermedad.

1.3.1. Tratamientos preventivos

A pesar de que no existe un consenso sobre la eficacia a largo plazo de los tratamientos preventivos, la comunidad científica señala mayoritariamente un conjunto de medidas no farmacológicas que resultan adecuadas para la prevención, o al menos para el retraso de la aparición, de la sintomatología de la EA. Estos tratamientos están orientados a una adecuada alimentación y nutrición y relacionados con el estilo de vida.

Entre aquellas medidas enfocadas a la dieta, se puede señalar como fundamental una buena suplementación en vitaminas del grupo B, E, C, D y folatos, así como una frecuente ingesta de antioxidantes, como el β -caroteno o el licopeno. Además, se ha señalado una menor incidencia de EA en individuos que siguen una dieta mediterránea, con una ingesta limitada de grasas saturadas a favor de las no saturadas e ingesta mayoritaria de verduras, legumbres, frutas y aceite de oliva. Por otro lado, aquellas dietas que incluyen un importante consumo de alcohol, azúcares refinados y grasas saturadas procedentes de productos animales pueden favorecer el desarrollo de la enfermedad (Dai, Borenstein *et al.*, 2006, Castellani, Rolston *et al.*, 2010).

Respecto a aquellos tratamientos relacionados con el estilo de vida, éstos incluyen actividad física frecuente, que favorece la neurogénesis hipocampal y el aprendizaje; el desarrollo de actividades cognitivas y retos mentales, que incrementan la plasticidad y densidad neuronales, y una adecuada socialización, que disminuye la incidencia de ansiedad o depresión, frecuentes en los pacientes con EA (Castellani, Rolston *et al.*, 2010, Ballard, Gauthier *et al.*, 2011).

1.3.2. Tratamientos sintomáticos

A día de hoy, los tratamientos aprobados para la EA sólo suponen un alivio sintomático, con un efecto limitado, ya que no ralentizan el progreso de la enfermedad. Estos se pueden dividir en inhibidores de acetilcolinesterasa y antagonistas de receptores NMDA.

Como consecuencia de la hipótesis colinérgica acerca de la fisiopatología de la EA, se han desarrollado y probado numerosos inhibidores de acetilcolinesterasa, que impiden la degradación de acetilcolina e intentan restaurar los niveles anormalmente disminuidos. De ellos, la tacrina fue el primer compuesto aprobado para el tratamiento de la EA, que fue más tarde retirado por la importante hepatotoxicidad observada en los pacientes (Galimberti y Scarpini, 2012). En la actualidad, rivastigmina, galantamina y donepezilo son los fármacos

más prescritos por ser bien tolerados, y aunque presentan efectos adversos, éstos se pueden controlar, ya que están relacionados directamente con la dosis administrada (Fan y Chiu, 2010). Por esto, así como por presentar un efecto beneficioso en pacientes con una patología leve o moderada, son considerados el tratamiento de primera línea actualmente disponible. No obstante, se están desarrollando otros inhibidores de acetilcolinesterasa, como el ladostigil (en preparación para estudios de fase III), que además podría mostrar efectos antidepressivos por su actividad IMAO A y B (Folch, Petrov *et al.*, 2016).

En la actualidad, el tratamiento indicado para aquellos pacientes con EA moderada o severa lo constituye la memantina. Este compuesto es un antagonista de receptores NMDA, capaz de impedir la excitotoxicidad mediada por glutamato que resulta en un desequilibrio de la homeostasis del calcio y una disfunción mitocondrial ligada a la apoptosis neuronal. Además, la evidencia científica indica que este compuesto podría disminuir la hiperfosforilación de Tau por modular la actividad GSK-3 β (Goni-Oliver, Avila *et al.*, 2009). Tanto en monoterapia como en combinación con inhibidores de acetilcolinesterasa, la memantina ha mostrado su eficacia en la mejora de las funciones cognitivas y conductuales de los pacientes (Fan y Chiu, 2010, Mendiola-Precoma, Berumen *et al.*, 2016).

Además de estos compuestos, se han valorado otros con actividad agonista muscarínica y nicotínica, sin embargo su selectividad ha planteado numerosos problemas, por lo que se han descartado en ensayos clínicos. De momento, el compuesto EVP-6124 ha pasado los ensayos de fase II de manera satisfactoria (Deardorff, Shobassy *et al.*, 2015).

1.3.3. Tratamientos etiológicos

En la actualidad, los esfuerzos se han centrado principalmente en la búsqueda de inhibidores de secretasa, antiagregantes y bloqueantes de β -amiloide, así como en fármacos anti-Tau.

Debido a que la hipótesis amiloidea de la EA parece reunir actualmente la mayor base científica, son muchos los proyectos centrados en la modulación del procesamiento de APP, bien por medio de activadores de la ruta no amiloidogénica o por inhibidores de la ruta amiloidogénica. Entre los primeros se han propuesto gemfibrozil (agonista PPAR- α) y melatonina (Corbett, Gonzalez *et al.*, 2015, Rudnitskaya, Muraleva *et al.*, 2015). Por otro lado, la búsqueda de compuestos que mejoren la enfermedad por medio de la inhibición de la ruta amiloidogénica de APP, hasta el momento ha sido infructuosa. Si bien la inhibición de

BACE1 no debería presentar demasiados efectos adversos, los inhibidores desarrollados inicialmente no mostraron un efecto clínico claro y pocos compuestos alcanzaron los ensayos clínicos. En la actualidad, los inhibidores BACE1 más prometedores son los desarrollados por Merck Sharp & Dohme (MK-8931 o Verubecestat, en ensayos de fase II) y Eli Lilly junto a Astra-Zeneca (LY3314814, en ensayos de fase III) (Arbor, LaFontaine *et al.*, 2016, Folch, Petrov *et al.*, 2016, Mendiola-Precoma, Berumen *et al.*, 2016). Respecto a los inhibidores de γ -secretasa desarrollados hasta el momento, como Semagacestat, han dado lugar a severos efectos adversos que han obligado a su retirada inmediata, previsiblemente causados por la interacción de la enzima con otros sustratos indispensables para la viabilidad celular. Aquellos inhibidores de γ -secretasa formulados para permitir un adecuado procesamiento de Notch, como Avagacestat, tampoco han presentado resultados prometedores (Nygaard, 2013, Coric, Salloway *et al.*, 2015).

Otros esfuerzos están orientados en la búsqueda de compuestos de bajo peso molecular capaces de impedir la agregación del β -amiloide, o desagregantes de las placas ya formadas. Algunos de estos compuestos, en ensayos clínicos, son tramiprosato (en fase III), scylo-inositol (en fase II), clioquinol (en fase II) y galato de epigallocatequina (en fase III), que, aunque pueden estabilizar los monómeros de β A, también dan lugar a importantes efectos adversos (Panza, Solfrizzi *et al.*, 2015, Awasthi, Singh *et al.*, 2016, Khanam, Ali *et al.*, 2016). Con un mecanismo de acción similar se han desarrollado anticuerpos capaces de secuestrar monómeros y oligómeros de β A para después favorecer su aclaramiento a través de la microglía (solanezumab, bapineuzumab, crenezumab, gantenerumab, aducanumab). Sin embargo, hasta el momento, la inmunización pasiva y activa ha dado lugar a una importante neuroinflamación, así como otros efectos adversos igualmente graves que no son compensados por la limitada efectividad mostrada (Holtzman, Morris *et al.*, 2011, Arbor, LaFontaine *et al.*, 2016).

Respecto a la terapia anti-Tau, se han desarrollado inhibidores de GSK-3 β para impedir la hiperfosforilación de Tau, como tideglusib, el cual no ha mostrado un efecto beneficioso. En inmunoterapia destacan AADvacl y ACI-35, aunque de momento los compuestos más prometedores en relación con la inhibición de la hiperfosforilación y agregación de Tau son distintos preparados con litio, cloruro de metiltionilo y davenutida (Magen, Ostritsky *et al.*, 2014, Liu, Ruthirakuhan *et al.*, 2016).

Junto a estos tratamientos, se han propuesto otros tantos coadyuvantes: insulinas intranasales por la asociación de la EA con la diabetes; estatinas por los altos niveles de LDL y colesterol que se registran en los pacientes; antiinflamatorios no esteroídicos por la evidencia de los altos niveles inflamatorios a nivel central, etc. De cualquier manera, en la actualidad no se ha encontrado un fármaco multidiaria capaz de hacer frente a toda la complejidad de esta enfermedad, y los estudios clínicos ya parecen indicar que todos los tratamientos desarrollados hasta el momento presentan alguna actividad sólo hasta ciertos estadios iniciales de la enfermedad (Arbor, LaFontaine *et al.*, 2016, Khanam, Ali *et al.*, 2016).

2. Los flavonoides

Los flavonoides son compuestos naturales polifenólicos que despiertan un gran interés en terapéutica. Quizá por su carácter ubicuo, históricamente se les ha atribuido numerosas propiedades beneficiosas, como actividad antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, vasodilatadora o antitumoral, que han ido siendo confirmadas en mayor o menor medida por la evidencia científica (Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011). Así pues, se trata de una familia de compuestos con un posible amplio perfil farmacoterapéutico.

Existen numerosas evidencias que ponen de manifiesto que el consumo de alimentos o suplementos ricos en flavonoides se asocia con un retraso en el inicio y/o la progresión de la EA y de otras enfermedades neurodegenerativas. Con respecto a la EA, el consumo de verduras y frutas, ricas en polifenoles, ha demostrado retrasar la aparición de la enfermedad (Dai, Borenstein *et al.*, 2006, Barberger-Gateau, Raffaitin *et al.*, 2007). Esto está de acuerdo con estudios previos que vinculan el consumo elevado de flavonoides con la mejora de la demencia (Commenges, Scotet *et al.*, 2000, Letenneur, Proust-Lima *et al.*, 2007) y, en conjunto, estos informes prestan algún apoyo a la hipótesis de que la intervención dietética mediante alimentos o suplementos ricos en flavonoides ejerce un impacto en el desarrollo de la EA. Son muchos los estudios en los que se utilizan modelos animales de la patología de la EA (ratón transgénico) para investigar los posibles mecanismos implicados en los efectos neuroprotectores de dietas ricas en polifenoles. Por ejemplo, se ha observado que la administración oral de flavonoides del té verde durante 6 meses a ratones que sobreexpresan la mutación sueca de APP (Tg2576) reduce la patología del β -amiloide y mejora la función cognitiva (Rezai-Zadeh, Arendash *et al.*, 2008), y, de manera similar, a largo plazo la administración de la catequina del té verde mejora el aprendizaje espacial y la

memoria en ratones propensos a la senescencia (Li, Zhao *et al.*, 2009). Además, la alimentación del ratón doblemente transgénico (APP + PS1) con arándanos desde los 4 meses de edad previene el déficit en el rendimiento en el test de comportamiento del laberinto en forma de Y (*Y maze*) a los 12 meses (Joseph, Denisova *et al.*, 2003).

2.1. El posible mecanismo de acción de los flavonoides

En la búsqueda de compuestos neuroprotectores, es muy significativa la reconocida capacidad antioxidante de los flavonoides, que los dota de un perfil muy beneficioso a nivel central. La potencial acción neuroprotectora de estos compuestos podría atribuirse a los diversos mecanismos que se enumeran a continuación (Ishige, Schubert *et al.*, 2001, Rice-Evans, 2001, Amit, Avramovich-Tirosh *et al.*, 2008, Mandel, Amit *et al.*, 2008, Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011):

- Captura directa de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
- Activación de enzimas antioxidantes
- Quelación de metales, especialmente de hierro y cobre
- Reducción de radicales de α -tocoferol
- Inhibición de oxidasas
- Aumento del ácido úrico
- Aumento de las propiedades antioxidantes de otros compuestos de bajo peso molecular
- Modificación del metabolismo del glutathione
- Inhibición de la entrada de calcio intracelular

La actividad antioxidante se puede explicar tanto por la estructura de estos compuestos – esqueleto catecol y conjugación de los anillos fenólicos (Heim, Tagliaferro *et al.*, 2002) – como por una potencial inhibición de MEK1 en la cascada ERK y una disminución de la expresión del gen que codifica para la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y, con ello, de la producción de NO. De esta manera, los flavonoides actuarían como mensajeros celulares, de la misma forma que interactúan con distintas cascadas, quinasas y factores endógenos (BDNF, CREB, PI3 quinasa, tirosina quinasa, JNK, PQC y MAP quinasa), interviniendo en la

plasticidad neuronal y la formación de la memoria, así como en la supervivencia neuronal (Spencer, 2008). Respecto a estos mecanismos, los flavonoides más estudiados son quercetina, miricetina, luteolina y kaempferol.

Por otro lado, algunos flavonoides ya han mostrado una interesante actividad como inhibidores de la agregación del β -amiloide (Ehrnhoefer, Bieschke *et al.*, 2008), inhibidores de la β -secretasa o incluso activadores de la α -secretasa (Obregon, Rezai-Zadeh *et al.*, 2006, Williams y Spencer, 2012). Como ejemplo, se puede hacer alusión a la miricetina, que parece ser protectora frente al daño celular por β -amiloide, y junto con la rutina y la quercetina, son inhibidores de β -secretasa y de la agregación del β -amiloide (Shimmyo, Kihara *et al.*, 2008, Ansari, Abdul *et al.*, 2009, Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011).

2.2. Accesibilidad a la diana farmacológica

Es importante señalar que la capacidad de los flavonoides de influir en el SNC dependerá en buena medida de su accesibilidad a través de la barrera hematoencefálica. Aunque la evidencia en cuanto a si los flavonoides y/o sus metabolitos acceden al SNC no es concluyente, existen numerosos estudios en animales que demuestran que ciertos flavonoides son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, la (-)-epicatequina y algunos de sus principales metabolitos se han detectado en el cerebro de roedores tras la administración oral (Abd El Mohsen, Kuhnle *et al.*, 2002, van Praag, Lucero *et al.*, 2007).

Parece ser que la capacidad de los flavonoides o sus metabolitos de atravesar la barrera hematoencefálica depende del grado de lipofilia del compuesto (Youdim, Dobbie *et al.*, 2003); y así flavonoides o metabolitos con menor polaridad (por ejemplo, derivados O-metilados) poseen mayor capacidad de absorción que los flavonoides o metabolitos más polares (es decir, los derivados sulfatados y glucurónidos). El paso a través de la barrera hematoencefálica también depende de su interacción con los transportadores de salida específicos, como la glicoproteína-P, que parece ser responsable de las diferencias de flujo en el cerebro *in situ* entre naringenina y quercetina (Youdim, Qaiser *et al.*, 2004). Sin embargo, el transporte dependiente del tiempo de algunos compuestos como la catequina, quercetina y cianidina-3-glucósido a través de las células endoteliales de los capilares cerebrales sugiere la posibilidad de que ciertos flavonoides y sus metabolitos sean capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Youdim, Shukitt-Hale *et al.*, 2004, Faria, Pestana *et al.*, 2010, Faria, Meireles *et al.*, 2014).

Estos estudios demuestran que los flavonoides parecen ser capaces de llegar a zonas del cerebro de los mamíferos que son importantes para la formación de la memoria, así como a regiones que se vean alteradas por la enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, la precisa distribución cerebral de los flavonoides tras la administración oral está menos estudiada, aunque se ha descrito que las antocianinas se detectan en cerebelo, corteza, hipocampo y estriado de ratas suplementadas con arándanos (Andres-Lacueva, Shukitt-Hale *et al.*, 2005). Del mismo modo, tras la administración crónica de la flavanona O-metilada tangeretina es posible detectar niveles de la misma en hipotálamo, estriado e hipocampo (Datla, Christidou *et al.*, 2001).

Aunque estos estudios son claramente importantes y mediante ellos se demuestra, en principio, que la exposición crónica a los polifenoles pueden influir en la patología de la EA y en el comportamiento *in vivo*, las estructuras óptimas de los flavonoides que poseen la actividad la biodisponibilidad necesarias, así como los mecanismos de acción, no se han identificado totalmente. Independientemente de los mecanismos involucrados, el reto futuro consiste en determinar si los flavonoides poseen eficacia en las personas afectadas por demencia.

Concluyendo, los flavonoides son una familia de compuestos de origen natural que poseen un importante interés como neuroprotectores con potencial terapéutico en la EA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Flavonoides

En el presente trabajo se estudiaron cuatro compuestos pertenecientes a la familia de los flavonoides, dos flavonoles (morina e isoquercitrina) y dos flavonas (hesperidina y neohesperidina). Como control positivo en diversos ensayos, se utilizaron los flavonoides rutina y fisetina.

Neohesperidina [(S)-4'-Metoxi-3',5,7-trihidroxi-flavanona-7-[2-O-(α -L-rhamnopiranosil)- β -D-glucopiranosido], hesperidina [(S)-4'-metoxi-3',5,7-trihidroxi-flavanona-7-rhamnoglucósido], morina [2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona], rutina y fisetina fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Isoquercitrina [3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona 3- β -glucósido] se obtuvo de Sarsyntex (Francia).

Se prepararon soluciones madre de todos los flavonoides a una concentración de 50 mM en DMSO que, a continuación, se filtraron ($\varnothing$ 0,2 μ m) y almacenaron protegidas de la luz a -20°C, hasta su empleo.

La metodología utilizada se describe a continuación siguiendo los objetivos planteados inicialmente.

2. Evaluación de la actividad antiamiloidogénica *in vitro*

2.1. Inhibición de la actividad β -secretasa

Para cuantificar *in vitro* la posible capacidad de inhibición de la actividad β -secretasa, se ha empleado una β -secretasa recombinante humana (S4195 Sigma-Aldrich) y un sustrato específico fluorogénico (β -Secretase Substrate IV – Calbiochem, Alemania). Este sustrato peptídico incorpora en su secuencia un emisor de fluorescencia (EDANS) y un *quencher* o aceptor (DABCYL) que se encuentran estructuralmente separados, por lo que dicho sustrato no emite una señal fluorescente medible hasta que no es hidrolizado. Cuando la enzima escinde el sustrato entre los residuos de leucina y aspártico se libera un fragmento fluorescente. La intensidad de la fluorescencia es directamente proporcional al grado de hidrólisis del sustrato fluorogénico (Ermolieff, Loy *et al.*, 2000) y, por tanto, constituye una determinación indirecta de la actividad β -secretasa, permitiéndonos cuantificar el grado de inhibición de dicha actividad por parte de los compuestos en estudio.

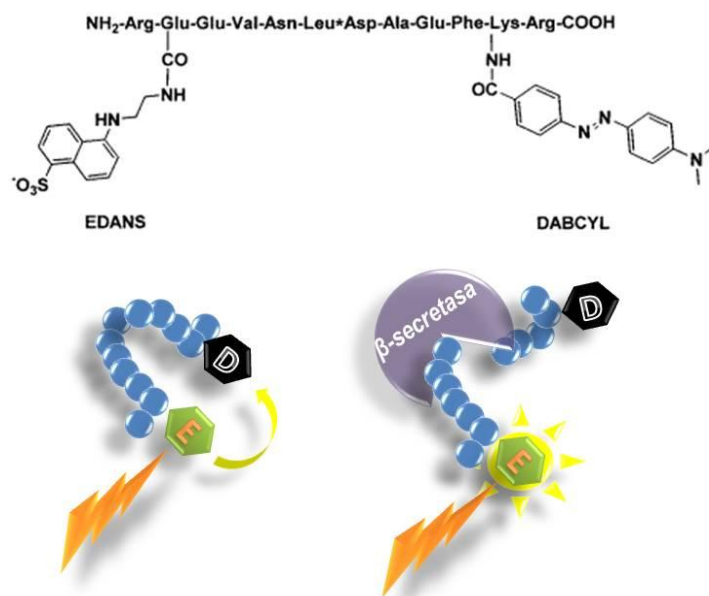


Figura 14. Estructura del sustrato fluorogénico utilizado en el ensayo de β -secretasa.

Se utilizaron 0,24 U de enzima recombinante en tampón de acetato sódico (20 mM, pH 4,5) y se preincubó con los compuestos (en un rango de concentraciones) durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionó el sustrato fluorogénico a la concentración final de 10 μ M, y la mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras ese periodo de incubación se midió la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}} = 360 \pm 40$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 528 \pm 20$ nm, en un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescent reader BIOT-TEK). Como blanco de la reacción se estableció la fluorescencia emitida por el sustrato en el tampón de reacción. Previamente al ensayo, se comprobó que ninguno de los compuestos en estudio presentara picos máximos de absorción en la longitud de onda de emisión de fluorescencia del sustrato fluorogénico.

2.2. Inhibición de la actividad γ -secretasa

Con el fin de evaluar la actividad γ -secretasa, se empleó un extracto celular rico en membranas citosólicas que fueron aisladas a partir de la línea celular de neuroblastoma APPswe. Para la obtención de dicho extracto, se sembraron células APPswe en placas Petri de 100 x 20 mm y se recogieron cuando se encontraban a un 80% de confluencia. El pellet celular obtenido mediante raspado de la placa se resuspendió en un tampón de lisis (Tris-

HCl 5 mM pH 8, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, PMSF 2 mM, leupeptina 25 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, quimostatina 10 µg/µl y aprotinina 2 µg/µl), se homogeneizó e incubó durante 15 minutos en hielo. A continuación se centrifugó a 800 g (10 minutos, 4°C) y se separó el sobrenadante, que se centrifugó a 20000 g (1 hora, 4°C). El pellet obtenido, conteniendo las membranas, se resuspendió en el tampón anterior incluyendo además CHAPS al 0,25%. En este lisado se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Para medir la actividad enzimática γ -secretasa se utilizó un volumen de lisado correspondiente a 10 µg de proteína en un tampón de reacción constituido por Tris-HCl 50 mM pH 6,8, KCl 150 mM, EDTA 2 mM y CHAPS 0,25%. Se empleó un sustrato fluorogénico específico de la actividad γ -secretasa (Calbiochem) a una concentración de 8 µM (Farmery, Tjernberg *et al.*, 2003) y tras un periodo de incubación de 2 horas a 37°C se midió la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 360 \pm 40$ nm y $\lambda_{em} = 460 \pm 40$ nm en un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescent reader BIOT-TEK). Como control positivo se utilizó el inhibidor específico de γ -secretasa L-685,458 (L1790 Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 µM (Paris y Mullan, 2004).

NMA-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-Thr-Val-Lys(DNP)-D-Arg-D-Arg-D-Arg-NH₂

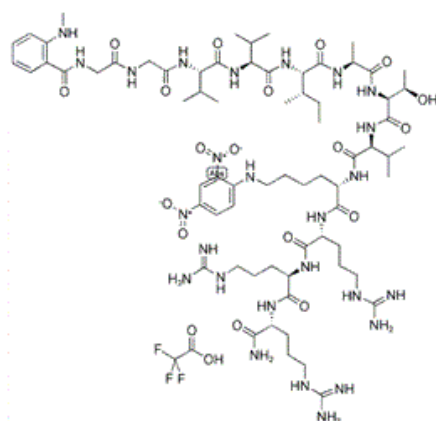


Figura 15. Estructura del sustrato fluorogénico utilizado en el ensayo de γ -secretasa.

Como blanco de la reacción se estableció la intensidad de fluorescencia emitida por el sustrato en el tampón de reacción. Previamente al ensayo, se comprobó que ninguno de los compuestos en estudio presentara máximos de absorción en la longitud de onda de emisión de fluorescencia del sustrato fluorogénico.

2.3. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa

Con el objeto de determinar el efecto de los compuestos sobre la actividad enzimática de la AChE, se realizó una adaptación del método de Ellman (Ellman, Courtney *et al.*, 1961), basado en la cuantificación de la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina por la enzima AChE. En la hidrólisis de la acetiltiocolina se libera tiocolina que reacciona con el cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para dar lugar a un compuesto amarillo al visible, 5-tio-2-nitro-benzoato (TNB), con un pico de máxima absorbancia a 412 nm.

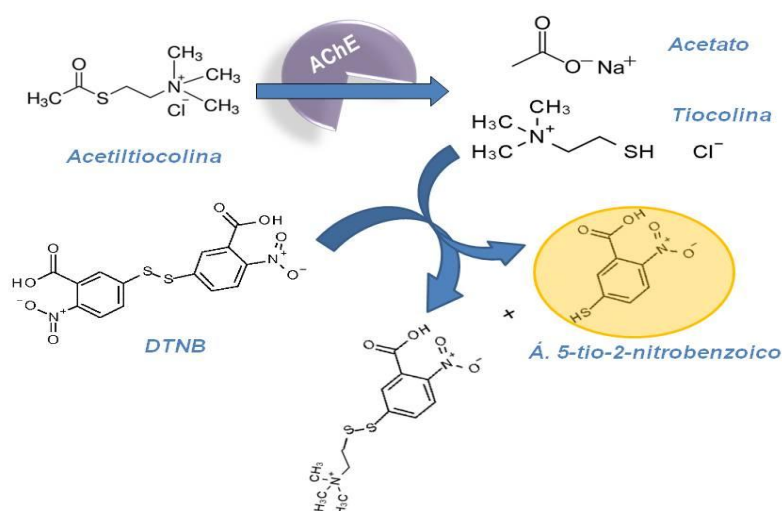


Figura 16. Fundamento del ensayo de cuantificación de la actividad AChE.

En el ensayo de determinación de la actividad inhibitoria de AChE por parte de los flavonoides en estudio se utilizó enzima AChE de *Electrophorus electricus* (C2888, Sigma-Aldrich). Este organismo posee una abundancia excepcional de AChE en sus órganos eléctricos.

En una placa de 96 pocillos se preincubaron durante 5 minutos 0,05 U/ml de enzima en un tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 conteniendo 0,1% BSA con los compuestos en estudio, y en presencia de 1,5 mM DTNB. Una vez añadido el sustrato (acetiltiocolina) a una concentración final de 1,5 mM, se monitorizó la absorbancia a 412 nm durante 2 minutos en un lector de placas DigiScan (Software DigiWin) y se determinó $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ como medida indirecta de la actividad enzimática con cada una de las concentraciones de compuesto en estudio. La inhibición de la actividad AChE se expresó como porcentaje respecto de la reacción control (100% de actividad). Como control positivo de inhibición de la reacción enzimática se empleó galantamina (Sigma-Aldrich).

2.4. Agregación y desagregación del péptido β -amiloide

La cuantificación del efecto de los flavonoides en estudio en la agregación y desagregación del péptido β -amiloide se llevó a cabo mediante una técnica fluorimétrica, utilizando la tioflavina T como fluorocromo. Este compuesto, con estructura de benzotiazol, forma micelas en solución acuosa que se unen a las fibrillas β A, provocando un cambio en el espectro de emisión y un aumento de la fluorescencia, proporcional al grado de agregación del péptido β A.

Para la realización de los estudios de inhibición de la agregación y desagregación del β -amiloide se ha utilizado el fragmento del péptido de β -amiloide $A\beta_{25-35}$ (GenScript, USA). Este fragmento corresponde a la secuencia peptídica comprendida desde el aminoácido 25 al 35, que mantiene las propiedades neurotóxicas del péptido de 42 aminoácidos ($A\beta_{1-42}$), y constituye un sustrato muy útil y ampliamente utilizado para el screening de compuestos potencialmente inhibidores de la agregación y/o desagregantes (Casley, Land *et al.*, 2002). La solución madre del péptido $A\beta_{25-35}$ se preparó a una concentración de 1 mM en DMSO mediante agitación enérgica en vórtex y posterior tratamiento en baño de ultrasonido (1 hora), para evitar la presencia de cualquier agregado. Para los ensayos de inhibición de la agregación, el péptido $A\beta_{25-35}$ a una concentración final de 10 μ M en PBS 0,1X (pH 7,4) se incubó con los respectivos compuestos en estudio durante 72 horas y a 37°C en atmósfera húmeda. Para cuantificar el grado de agregación del β A, se adicionó tioflavina T a concentración final de 25 μ M a cada una de las muestras resultantes de la incubación y se midió la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 440 \pm 30$ nm y $\lambda_{em} = 528 \pm 20$ nm en un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescent reader BIOT-TEK). Como compuesto de referencia se empleó la rutina (Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011).

Para los ensayos de desagregación, los compuestos en estudio se adicionaron al medio una vez que se habían formado los agregados (al 3^{er} día). El grado de agregación se midió 72 horas tras la incorporación de los flavonoides en estudio.

3. Evaluación del efecto neuroprotector en diferentes modelos celulares

3.1. Estudio en la línea celular de neuroblastoma MC65

Las células de esta línea de neuroblastoma expresan condicionalmente el fragmento C99 de la proteína precursora de amiloide (APP) bajo el control de un promotor de tetraciclina (Sopher, Fukuchi *et al.*, 1996). Cuando se elimina la tetraciclina del medio de cultivo, las células MC65 expresan el fragmento C99, el cual es procesado por la enzima γ -secretasa liberando el péptido β -amiloide (Sopher, Fukuchi *et al.*, 1996, Maezawa, Hong *et al.*, 2006). La acumulación intracelular de β A aumenta la sensibilidad celular al estrés oxidativo, y provoca la muerte en unos 4 días aproximadamente (Liu, Dargusch *et al.*, 2008). La adición al medio de cultivo de inhibidores de γ -secretasa previene la muerte celular por evitar la generación de β A, acumulándose el fragmento C99 que no es tóxico para esta línea celular (Hong, Maezawa *et al.*, 2007, Valera, Dargusch *et al.*, 2013). El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides se evaluó mediante la determinación de la viabilidad celular.

3.1.1. Toxicidad intracelular de β -amiloide

Para este ensayo, se sembraron 400000 células de la línea de neuroblastoma MC65 por placa Petri de 35 x 10 mm. Tras 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó por un medio de suero reducido Opti-MEM[®] (31985070 GIBCO), en ausencia o en presencia de tetraciclina (0,5 μ g/ml) con el fin de inducir o no la generación del fragmento C99 de APP, y en presencia o ausencia de los flavonoides en estudio. Al cuarto día aproximadamente, cuando sobreviene la muerte de las células que no reciben tetraciclina, se determina la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT a formazán (Liu, Dargusch *et al.*, 2008, Prior, Chiruta *et al.*, 2014). Como control positivo se empleó el compuesto CNB-001, derivado de curcumina descrito como neuroprotector (Maher, Salgado *et al.*, 2007, Valera, Dargusch *et al.*, 2013, Prior, Chiruta *et al.*, 2014).

3.2. Estudio en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y-APPswe

La línea celular SH-SY5Y-APPswe (APPswe) fue donada por el Prof. Weihong Song, de la Universidad British Columbia, Vancouver, BC, Canadá. Es una línea estable de neuroblastoma humano SH-SY5Y transfectada con el gen APPswe, que sobreexpresa la proteína precursora del β -amiloide humana portadora de la mutación sueca (APPswe, KM670/671NL). Esta doble mutación en los codones 670 y 671 origina un cambio en la secuencia de aminoácidos resultando en un incremento de la eficacia proteolítica de β -secretasa y, como consecuencia, en un incremento del rendimiento en la producción del péptido β -amiloide. Dicha mutación puede promover estrés oxidativo en las células debido a la sobreproducción del péptido β -amiloide (Haass, Lemere *et al.*, 1995), y en humanos se relaciona con un aparición precoz de la EA, transmitiéndose de manera autosómica dominante (Citron, 2010).

Tras provocar un estrés oxidativo celular por adición de peróxido de hidrógeno, el potencial efecto neuroprotector de los flavonoides se evalúa mediante la cuantificación de la generación de radicales libres, la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S y la actividad de la caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9.

3.2.1. Generación intracelular de radicales libres

Con el objeto de determinar la capacidad inhibitoria de la generación de radicales libres, se utilizó el método basado en la oxidación del diacetato de diclorofluoresceína (DCFA-DA; Sigma-Aldrich) por especies reactivas de oxígeno. Este compuesto, no fluorescente, penetra en las células atravesando la membrana celular y, una vez en el interior de la célula, el acetato es hidrolizado por las esterasas celulares liberando diclorofluoresceína en su forma reducida (DCFH), que si bien tampoco es fluorescente, es capaz de transformarse en una molécula que sí posee esta propiedad cuando es oxidada (DCF) por radicales libres presentes en el medio intracelular (LeBel, Ischiropoulos *et al.*, 1992).

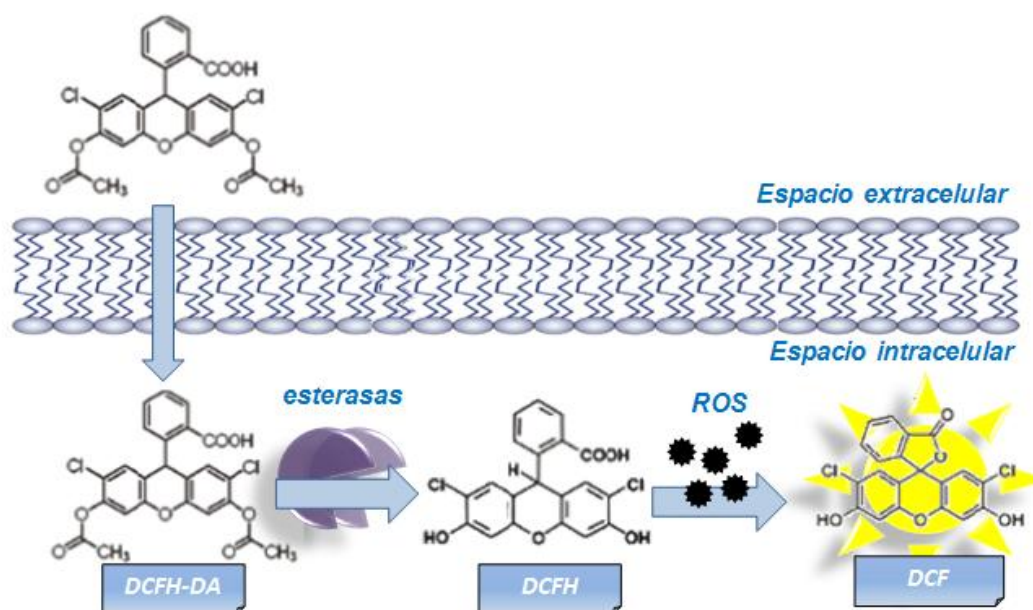


Figura 17. Fundamento del ensayo de generación intracelular de radicales libres.

Para la realización del ensayo se sembraron placas de 96 pocillos con células de neuroblastoma APPswe a una densidad de 20000 células/pocillo. Al día siguiente, las células se incubaron en presencia de diacetato de diclorofluoresceína 20 μM , en medio DMEM (sin rojo de fenol) a 37°C y 5% de CO_2 durante 30 minutos, con la finalidad de que el diacetato de diclorofluoresceína se incorporase dentro de la célula. A continuación se agregaron los compuestos en estudio a distintas concentraciones, 30 minutos antes de adicionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a concentración final de 50 μM . Se midió la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}} = 485 \pm 10 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 580 \pm 12,5 \text{ nm}$, 60 minutos después de la adición del H_2O_2 , en un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescent reader BIOT-TEK). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de la generación de radicales libres. El 100% de generación de radicales libres se corresponde con la intensidad de fluorescencia de las células tratadas con peróxido de hidrógeno menos la intensidad de fluorescencia de las células que no reciben ningún tratamiento.

3.2.2. Determinación de la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S

Con el objeto de evaluar el efecto de los flavonoides sobre la actividad quimotripsina del proteasoma, se sembraron células APPswe en placas Petri de 35 x 10 mm a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Tras 72 horas de la siembra, las células fueron tratadas con el flavonoide correspondiente (o su vehículo) durante 1 hora. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y tratadas con H_2O_2 a concentración final de 50 μ M. Al cabo de 30 minutos, se retiró el H_2O_2 , se realizó un lavado con medio DMEM y las células se mantuvieron en incubación durante 16 horas. Finalmente, las células fueron recogidas y lisadas mediante un tampón de lisis compuesto por HEPES 100 mM pH 8, sucrosa 250 mM, $MgCl_2$ 10 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM. Los lisados resultantes fueron congelados ($-80^\circ C$, 5 minutos) y descongelados 3 veces para asegurar una completa lisis celular, y posteriormente se centrifugaron a 14000 g a $4^\circ C$ durante 30 minutos. La concentración de proteína de los sobrenadantes obtenidos se cuantificó por el método de Bradford. Para cuantificar la actividad quimotripsina se utilizó un volumen de lisado equivalente a 10 μ g de proteína, así como un sustrato fluorogénico a 50 μ M (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, S6510 Sigma-Aldrich). La intensidad de la fluorescencia se cuantificó a $\lambda_{exc} = 360 \pm 40$ nm y $\lambda_{em} = 485 \pm 10$ nm, mediante un fluorímetro FLx800 (Microplate fluorescent reader BIOT-TEK) tras 1 hora de incubación a $37^\circ C$. La intensidad de fluorescencia emitida es directamente proporcional a la actividad dependiente de ATP (26S) y no dependiente de ATP (20S), en función de la presencia o ausencia de ATP (100 μ M) en el medio de reacción. Los datos se expresaron en micromoles de 7-amino-4-metilcumarina (AMC), liberados en la hidrólisis del sustrato fluorogénico (Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC) y calculados a partir de una curva patrón con AMC.

3.2.3. Determinación de la actividad caspasa 3, 8 y 9

La determinación de la actividad caspasa se realizó utilizando sustratos fluorogénicos específicos de: caspasa 3 (Ac-DEVD-AMC; A1086 Sigma-Aldrich), caspasa 8 (Ac-LETD-AFC; SCP0096 Sigma-Aldrich) y caspasa 9 (Ac-LEHD-AFC; A5845 Sigma-Aldrich).

Las células APPswe fueron sembradas en placas Petri de 35 x 10 mm con una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/placa. Al cabo de 72 horas, las células fueron tratadas con el flavonoide correspondiente (o su vehículo). Tras 1 hora de tratamiento, se realizaron dos lavados con PBS y las células se expusieron al H_2O_2 a una concentración final de 50 μ M durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un lavado con medio de cultivo y las células se

mantuvieron en incubación durante 16 horas. Finalmente, las células fueron recogidas, lavadas con PBS (4°C) y lisadas con 150 µl de tampón de lisis (HEPES 10 mM pH 8, KCl 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 5 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Na₂MoO₄ 10 mM, leupeptina 10 µg/µl, pepstatina 10 µg/µl, TLCK 4 µg/µl y PMSF 0,5 mM). Posteriormente se añadió NP-40 al 0,5% y la mezcla se agitó enérgicamente durante 15 segundos en vortex. La mezcla se centrifugó a 8000 g durante 30 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante, que correspondía al extracto citosólico. La determinación de la concentración de proteína de los extractos citosólicos se llevó a cabo por el método de Bradford. Para la determinación de la actividad caspasa se utilizó un volumen de extracto citosólico correspondiente a 20 µg de proteína, que se incubaron durante 1 hora a 37°C con el sustrato correspondiente a una concentración final de 20 µM, en un tampón constituido por HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 100 mM, CHAPS 0,1%, glicerol 10%, EDTA 0,1 mM y DTT 10 mM. La hidrólisis del sustrato se cuantificó a $\lambda_{\text{exc}} = 360 \pm 40$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 460 \pm 40$ nm para las caspasas 3 y 9, y a $\lambda_{\text{exc}} = 360 \pm 40$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 528 \pm 12,5$ nm para la caspasa 8.

Los resultados obtenidos en cada grupo de tratamiento se expresan en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF o FAU, *fluorescence arbitrary units*).

3.3. Estudio en la línea celular hipocampal HT22

La línea celular HT22 fue desarrollada originalmente por el Dr. David Schubert (Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California). Esta línea deriva de la línea HT4, originalmente immortalizada a partir de cultivos primarios de células hipocampales murinas (Davis y Maher, 1994). Una de las principales características de las células HT22 es que carecen de receptores ionotrópicos de glutamato y, por tanto, no son susceptibles a la excitotoxicidad glutamatérgica (Tan, Schubert *et al.*, 2001, Prior, Chiruta *et al.*, 2014). Sin embargo, otras actividades neuronales, como su funcionalidad colinérgica, son normales, por lo que constituyen un buen modelo celular para el estudio de compuestos con potencial terapéutico en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Liu, Li *et al.*, 2009, Currais, Chiruta *et al.*, 2014).

En esta línea celular se evaluó la potencial protección de los flavonoides frente a la oxitosis y frente a la isquemia, ambas inducidas:

- El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides frente a la **oxitosis celular inducida por elevadas concentraciones de glutamato** se evaluó mediante la determinación de la viabilidad celular.
- El potencial efecto neuroprotector de los flavonoides en la **isquemia inducida por ácido yodoacético** se cuantificó mediante la determinación de los niveles intracelulares de ATP; la supervivencia celular asociada a la funcionalidad de la cadena mitocondrial; el poder reductor intracelular (NADH/NAD^+ y NADPH/NADP^+); los niveles de proteínas de rutas de supervivencia celular (ERK, Akt, GSK-3 β , mTOR, p70); y los niveles de proteínas de procesos de estrés celular (p38, JNK).

3.3.1. Ensayo de oxitosis

Para la realización de este ensayo se ha utilizado la línea celular hipotalámica HT22 y el glutamato como estímulo de daño celular. Estas células, al no expresar receptores ionotrópicos de glutamato, sufren un proceso de muerte celular exclusivamente iniciado por un daño oxidativo. El glutamato inhibe el transportador cistina/glutamato responsable del transporte de cistina al interior celular. Dado que la cistina es necesaria para la formación de glutatión, se produce como consecuencia la depleción de este antioxidante en pocas horas, lo que conduce a la muerte celular (Tan, Schubert *et al.*, 2001).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 20000 células/pocillo y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente se realizó un pretratamiento con los flavonoides a distintas concentraciones, durante 1 hora, antes de añadir el glutamato en concentraciones crecientes (2, 5 y 10 mM), respectivamente, para provocar diferentes grados de daño oxidativo. Tras 24 horas de exposición al glutamato, se evaluó la viabilidad celular cualitativamente mediante observación al microscopio, y cuantitativamente mediante el ensayo de la reducción del MTT a formazán.

3.3.2. Ensayo de isquemia

Para la realización de este ensayo se ha empleado la línea HT22. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 20000 células/pocillo. Tras 24 horas de incubación, se realizó un tratamiento con ácido yodoacético (IAA, I4386 Sigma-Aldrich) durante 2 horas a una concentración final de 15, 20 o 30 μM , en presencia o ausencia de los flavonoides en estudio. A continuación se reemplazó el medio de cultivo por medio sin IAA y conteniendo el flavonoide. Tras 24 horas de incubación, se cuantificó la viabilidad celular mediante el ensayo de reducción de MTT.

En los siguientes ensayos se seleccionó la concentración de ácido yodoacético 30 μM por presentar unos resultados más congruentes con otros modelos de isquemia *in vitro* e *in vivo* (Maher, Salgado *et al.*, 2007). En los ensayos con inhibidores de la cadena mitocondrial de fosforilación oxidativa (OXPHOS, *oxidative phosphorylation*), éstos se añadieron al medio de cultivo en los mismos tiempos que los flavonoides en estudio. Los inhibidores mitocondriales antimicina A (AA), 2-tenoiltrifluoroacetona (TTFA), difenileneyodonio (DPI), oligomicina A (OA) y rotenona (Rot) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Para medir los niveles de proteínas, se sembraron las células HT22 en placas Petri de 35 x 10 mm a una densidad de 2×10^5 células/placa y se siguió el mismo esquema de tratamiento descrito anteriormente, si bien los pellets fueron recogidos a las 2 horas tras el tratamiento con IAA.

Determinación de niveles intracelulares de ATP

La medida de los niveles intracelulares de ATP se realizó mediante un ensayo basado en la reacción quimioluminiscente de luciferina-luciferasa (Kit de determinación de ATP, Molecular Probes™, ThermoFisher Scientific). Para ello, las células fueron sembradas en placas Petri de 35 x 10 mm y tratadas como se indica en el ensayo de isquemia *in vitro*. Posteriormente fueron recogidas y tratadas en placas de 96 pocillos con el tampón de reacción establecido en el kit con DTT 1 mM, luciferina 0,5 mM y luciferasa 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Tras 1 minuto a temperatura ambiente, la intensidad de la señal luminiscente fue leída en un lector de placas (SpectraMax® M Series Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices; CA, USA). La concentración de proteína de las muestras se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith, Krohn *et al.*, 1985).

Se realizó una curva patrón de ATP y otra de albúmina bovina sérica (BSA) en el mismo tampón de extracción que se utilizó para las muestras. Los niveles de ATP intracelular de las muestras se expresaron en nmol/mg proteína y se reflejan como porcentaje respecto al tratamiento control.

Determinación de niveles intracelulares de NAD⁺ y NADH

La medida de los niveles intracelulares de NAD⁺ y NADH se realizó mediante un ensayo de quimioluminiscencia de luciferina-luciferasa (Kit de determinación NAD/NADH-Glo™; Promega). Para ello, las células fueron sembradas en placas Petri de 35 x 10 mm y tratadas como se indica en el ensayo de isquemia *in vitro*. Tras 1 hora de incubación, la intensidad de la señal luminiscente fue leída en un lector de placas (SpectraMax® M Series Multi-Mode Microplate Reader; Molecular Devices; CA, USA). La concentración de proteína de las muestras se determinó por el método del ácido bicinonínico (BCA). Se realizó una curva patrón de BSA en el mismo tampón de extracción que se utilizó para las muestras. Los niveles intracelulares de NAD⁺ y NADH celular se expresaron en nmol/mg de proteína y a partir de ambos se obtuvo el cociente NAD⁺/NADH, como un indicador del estado energético implicado en el catabolismo celular.

Determinación de niveles intracelulares de NADP⁺ y NADPH

La medida de los niveles celulares de NADP⁺ y NADPH se realizó mediante un ensayo de bioluminiscencia de luciferina-luciferasa (Kit de determinación NADP/NADPH-Glo™; Promega). Para ello, las células fueron sembradas en placas Petri de 35 x 10 mm y tratadas como se indica en el ensayo de isquemia *in vitro*. Tras 1 hora de incubación, la señal luminiscente fue leída en un lector de placas SpectraMax® M Series Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices; CA, USA). La concentración de proteína de las muestras se determinó por el método del ácido bicinonínico (BCA). Se realizó una curva patrón de BSA en el mismo tampón de extracción que las muestras. Los niveles intracelulares de NADP⁺ y NADPH celular se expresaron en nmol/mg proteína y a partir de ambos se obtuvo el cociente NAD⁺/NADH, como un indicador del estado energético implicado en el anabolismo celular.

Análisis de niveles de proteínas

Con el fin de analizar las variaciones en el nivel de proteínas celulares se empleó la técnica de Western Blot (Bollag, Rozycki *et al.*, 1996) en extractos celulares totales.

Una vez terminado el esquema de tratamiento descrito anteriormente en placas Petri de 35 x 10 mm, el medio de cultivo fue aspirado y las placas lavadas con suavidad con PBS. Posteriormente se añadió a cada placa 100 µl de tampón de lisis RIPA (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, desoxicolato sódico 0,5%, NP-40 1%, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM), se sonicaron y centrifugaron a 100000 g durante 60 minutos y a 4°C. La concentración proteica de los extractos obtenidos se determinó usando el método de Bradford.

Las muestras fueron separadas por electroforesis utilizando geles de acrilamida *Criterion XT Precast Bis-Tris Gels* al 10-12% (según peso molecular de la proteína en estudio), marcador proteico *Precision Plus Protein All Blue Standards* (#161-0373, Bio-Rad), tampón *MOPS XT* y equipo *Mini-protean II*. La electroforesis se realizó a amperaje constante (40 mA) durante un periodo de 40 minutos.

Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Immobilon-P, PVDF 0.45µm, #IPVH00010 Merck Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con leche desnatada o BSA al 5% en TBS-T (Tampón Tris 20 mM pH 7,5; NaCl 0,5 M; Tween 20 0,1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes en una solución de TBS-T con BSA al 5%. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la tabla 1.

Posteriormente las membranas fueron lavadas con TBS con Tween 20 al 0,05% e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (HRP conjugado) de cabra anti-conejo o ratón (Bio-Rad) diluido 1/10000 en TBS-T y leche desnatada al 5%. Tras diversos lavados, las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando el revelador SuperSignal West Pico Substrate (Pierce). Las membranas fueron incubadas de nuevo con un anticuerpo anti-actina a fin normalizar los niveles de proteínas. La densidad de las bandas correspondientes a las distintas proteínas fue normalizada acorde a la densidad de la banda de la actina correspondiente. Las proteínas fosforiladas fueron normalizadas además acorde a la expresión total de la proteína (fosforilada y no fosforilada).

Tabla 1. Anticuerpos primarios.

Proteína diana	Casa comercial #Referencia	Origen	Dilución
Actina	Cell Signaling #5125 (HRP conjugada)	Conejo	1/20000
Akt	Millipore #05-591	Ratón	1/1000
ERK	Cell Signaling #9102	Conejo	1/2000
GSK -3 β	Cell Signaling #9315	Conejo	1/1000
JNK	Cell Signaling #9252	Conejo	1/1000
mTOR	Cell Signaling #2983	Conejo	1/1000
p38 MAPK	Cell Signaling #9212	Conejo	1/1000
p70 S6 kinase α	Santa Cruz #sc-230	Conejo	1/1000
Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling #9271, #4051	Conejo	1/1000
Phospho-ERK	Cell Signaling #9106	Ratón	1/1000
Phospho-GSK-3 α/β (Ser21/9)	Cell Signaling #9331	Conejo	1/1000
Phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Abcam #ab4821	Conejo	1/1000
Phospho-mTOR (Ser2448)	Cell Signaling #2971	Conejo	1/1000
Phospho-p38 MAPK	Cell Signaling #9216	Ratón	1/1000
Phospho-p70 S6 kinase α (Thr389)	Cell Signaling #9234	Conejo	1/1000

3.4. Mantenimiento y propagación de las líneas celulares

El mantenimiento y la propagación de todas las líneas celulares utilizadas en esta Tesis se llevaron a cabo en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; 41965039 GIBCO, USA) con suero bovino fetal (10%) (Hyclone, USA) manteniéndolas a 37°C en atmósfera al 95% de humedad y 5% de CO₂.

3.5. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular, bien para descartar la toxicidad de los flavonoides en estudio, bien para estudiar su efecto neuroprotector, se determinó mediante la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán.

El ensayo se fundamenta en la capacidad de las células viables de reducir las sales de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT), por unas deshidrogenasas mitocondriales a formazán, producto insoluble de color azul oscuro - violáceo. Esta técnica constituye una medida cuantitativa de la viabilidad celular ya que la cantidad de formazán que se produce es proporcional al número de células viables presentes en el cultivo, y es medible espectrofotométricamente (Mosmann, 1983).

Así pues, para la realización de este ensayo con las líneas celulares APPswe y HT22, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en medio DMEM a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%. La densidad celular en la siembra varió según la línea celular: 20000 células/pocillo para APPswe y 5000 células/pocillo para HT22. Al día siguiente, las células se trataron con los compuestos en estudio durante 24 horas; a continuación se retiró el medio y se incorporó la sal de MTT a 0,4 mg/ml de medio de cultivo. La placa se mantuvo en incubador durante 1 hora para permitir la formación de los cristales de formazán, que se disolvieron añadiendo en el pocillo el mismo volumen de DMSO que el de medio de cultivo.

En el caso de realizar este ensayo con la línea MC65, se sembraron 400000 células en placas Petri de 35 x 10 mm. Al día siguiente de la siembra se realizó el tratamiento con los compuestos en estudio en presencia, además, de tetraciclina en el medio. Tras 24 horas se procedió igual que con las placas de 96 pocillos.

Por último, se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas DigiScan (Programa DigiWin). Los resultados se expresan en porcentaje de viabilidad, considerando el 100% de viabilidad la media aritmética de las absorbancias de los pocillos correspondientes a las células no tratadas.

4. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, y los resultados obtenidos se expresaron como la media $\pm$ error estándar medio. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido del test *post hoc* de Newman-Keuls de comparación múltiple. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San José, California).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evaluación de la actividad antiamiloidogénica *in vitro*

1.1. Inhibición de la actividad β -secretasa

En la tabla 2 se indican los distintos porcentajes de inhibición de la actividad β -secretasa en presencia de los flavonoides a una concentración de 100 μ M. Como control positivo se ha utilizado el flavonoide rutina (Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011) a la misma concentración que los compuestos en estudio. El porcentaje de inhibición se ha calculado a partir del descenso de la emisión de fluorescencia (debido a la inhibición de la hidrólisis del sustrato fluorogénico) con respecto a la fluorescencia emitida por la reacción control de β -secretasa (Cai, Wang *et al.*, 2001).

Tabla 2. Inhibición de la actividad β -secretasa.

Flavonoide	% Inhibición
Morina	64,34 $\pm$ 3,77*
Isoquercitrina	52,28 $\pm$ 1,30*
Hesperidina	10,40 $\pm$ 2,39
Neohesperidina	15,60 $\pm$ 4,81
Rutina	68,61 $\pm$ 2,79*

(Test de Newman-Keuls; **p<0,001; *p<0,01 respecto de la reacción control)

Tanto morina como isoquercitrina produjeron una inhibición de la reacción control de β -secretasa mayor del 50% ($p < 0,01$), similar a la obtenida con la rutina. Como se observa en la figura 19, ambos flavonoides mostraron un efecto concentración-dependiente en el rango de concentración 1-100 μ M, siendo la morina el flavonoide con mejor perfil de actividad.

La enzima β -secretasa (BACE, *β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme*) se considera una importante diana farmacológica en la enfermedad de Alzheimer (EA), de ahí la importancia de aportar nuevos compuestos que puedan reducir su actividad (Shimmyo, Kihara *et al.*, 2008, Williams y Spencer, 2012). La inhibición específica de esta enzima en los endosomas celulares disminuiría la producción de β -amiloide y como consecuencia el

proceso de fibrillogénesis (Cai, Wang *et al.*, 2001), sin alterar las funciones de la enzima sobre el resto de sustratos no amiloidogénicos (Ben Halima, Mishra *et al.*, 2016).

Yoshiari Shimmyo y colaboradores ya señalaron la actividad inhibidora de morina (Shimmyo, Kihara *et al.*, 2008). En sus estudios de *docking* molecular, los autores hacen referencia a una posible interacción del grupo hidroxilo en C2' de morina con el aminoácido Asp228 del centro catalítico de BACE por medio de un puente de hidrógeno. Asimismo, sus resultados indican que la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones C3' y C4' podrían estabilizar la unión de los flavonoides con el centro activo de la enzima BACE por puentes de hidrógeno, lo cual podría explicar el efecto inhibidor de isoquercitrina, no descrito con anterioridad.

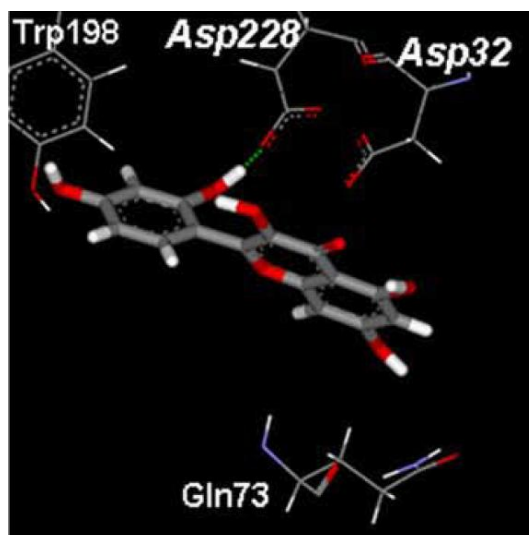


Figura 18. Interacción de morina con el centro catalítico de BACE-1 (Shimmyo, Kihara *et al.*, 2008).

Estos compuestos, mediante la inhibición de la actividad β -secretasa *in vivo*, podrían favorecer el predominio de la vía no amiloidogénica en el procesamiento de la APP, incrementando como consecuencia la liberación del fragmento α APPs, que ha demostrado propiedades neuroprotectoras (Zhou, Chan *et al.*, 2011).

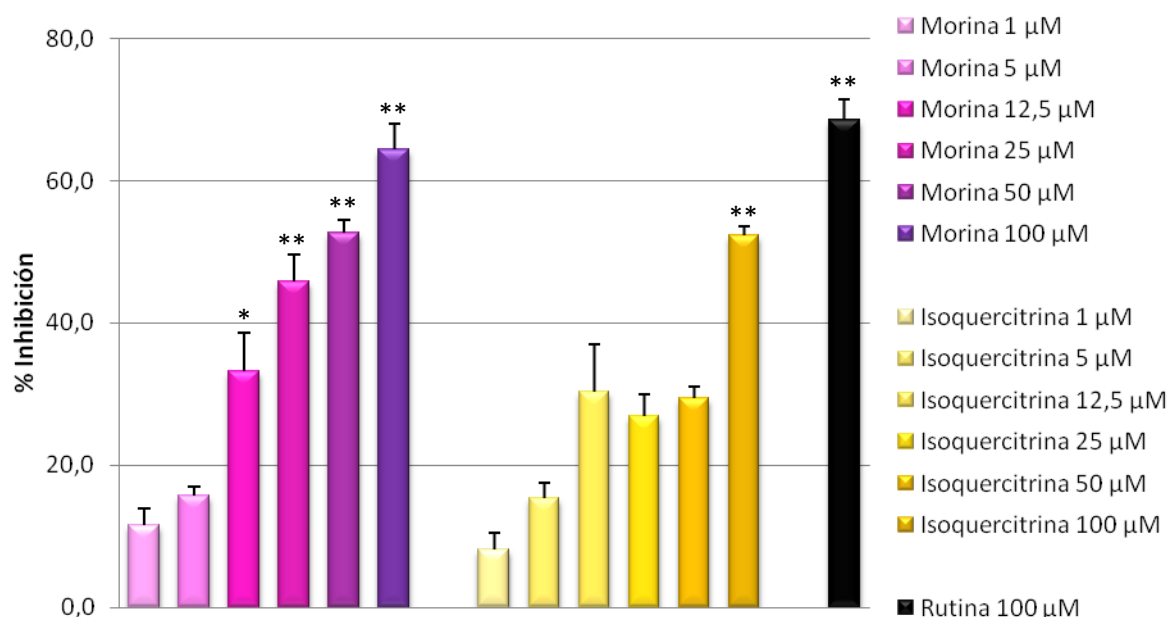


Figura 19. Inhibición de la actividad β -secretasa por morina e isoquercitrina (Test de Newman-Keuls; ** $p<0,001$; * $p<0,01$ respecto de la reacción control).

1.2. Inhibición de la actividad γ -secretasa

Los flavonoides objeto de estudio fueron ensayados en el rango de concentración 10-50 μM . Como control positivo se utilizó el compuesto L-685,458, inhibidor potente y específico de la actividad γ -secretasa. La actividad inhibitoria de los flavonoides en estudio se ha expresado en forma de porcentaje de inhibición, que se ha calculado a partir del descenso de la emisión de fluorescencia (debido a la inhibición de la hidrólisis del sustrato fluorogénico) con respecto a la fluorescencia emitida por la reacción control de γ -secretasa.

Solo los flavonoles, morina e isoquercitrina, produjeron un efecto inhibitorio reseñable a la concentración de 50 μM . Isoquercitrina mostró un efecto superior pues alcanzó el 50% de inhibición de la reacción control y, además, mostró un efecto concentración-dependiente (figura 20).

Las características de este ensayo *in vitro* nos han permitido demostrar una disminución de la intensidad de fluorescencia por interacción del flavonoide con el complejo enzimático. Esta actividad inhibitoria “directa” del complejo γ -secretasa no ha sido descrita con anterioridad para morina e isoquercitrina, si bien estudios previos han demostrado que algunos flavonoles modulan la actividad γ -secretasa a través de la inhibición selectiva de la

isoforma 3α de la enzima glucógeno sintasa quinasa 3α (GSK3 α) (Phiel, Wilson *et al.*, 2003, Rezai-Zadeh, Douglas Shytle *et al.*, 2009).

De acuerdo a la hipótesis amiloidea, compuestos capaces de inhibir o modular la actividad γ -secretasa pueden disminuir la acumulación del péptido β A, como se ha puesto de manifiesto en modelos animales (Imbimbo y Giardina, 2011, D'Onofrio, Panza *et al.*, 2012). Sin embargo, los compuestos desarrollados hasta el momento han desencadenado importantes efectos adversos en humanos, principalmente por impedir la metabolización de otros sustratos de γ -secretasa que son vitales para las funciones celulares (Sambamurti, Greig *et al.*, 2011, Golde, Koo *et al.*, 2013, Zhang, Li *et al.*, 2014).

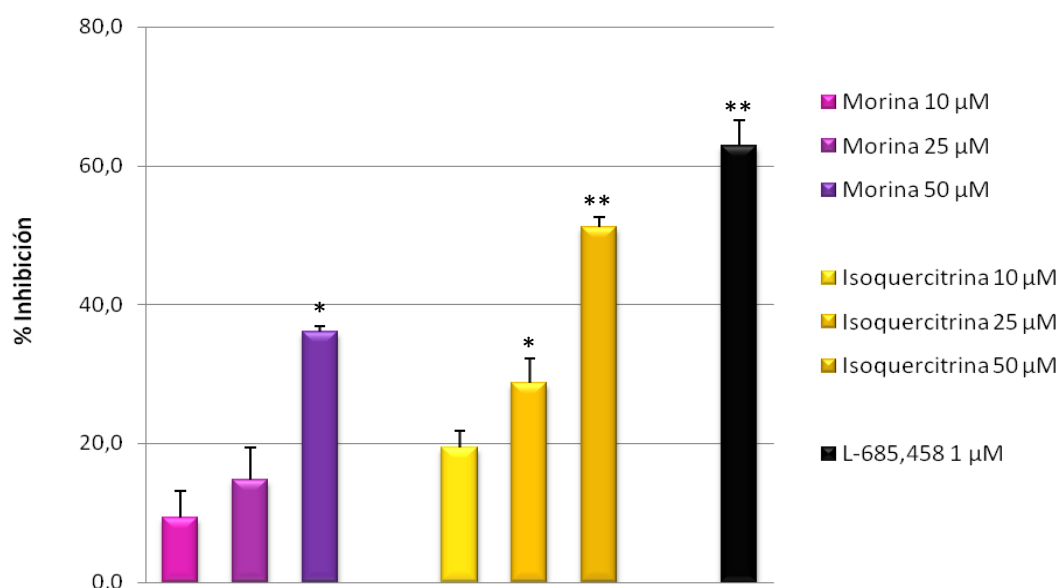


Figura 20. Inhibición de la actividad γ -secretasa por morina e isoquercitrina (Test de Newman-Keuls; ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de la reacción control).

1.3. Inhibición de la actividad acetilcolinesterasa

Se estudiaron los distintos flavonoides a una concentración de 100 μM en la actividad AChE. Como control positivo se utilizó un inhibidor selectivo, competitivo y reversible de AChE, la galantamina, a concentración de 10 μM . El grado de inhibición de la actividad enzimática se ha calculado a partir del descenso de absorbancia (debido a la inhibición de la hidrólisis de tiocolina) con respecto a la absorbancia de la reacción control de AChE.

Como se puede apreciar en la figura 21, todos los compuestos ensayados mostraron cierta actividad inhibitoria de AChE. Si bien el efecto inhibitorio de estos compuestos fue estadísticamente significativo respecto de la reacción control de AChE, ninguno de ellos presentó una inhibición de la reacción enzimática superior al 40% a la concentración de 100 μM . Aun así, morina e isoquercitrina se podrían destacar como los compuestos con mayor actividad.

Son numerosos los estudios sobre flavonoides que describen su actividad como inhibidores de AChE (Guo, Xie *et al.*, 2010, Uriarte-Pueyo y Calvo, 2011). De acuerdo a la bibliografía existente, esta actividad se basa en la presencia de grupos hidroxilo libres en los anillos A y B, capaces de formar puentes de hidrógeno con el centro activo de la enzima mientras que el doble enlace C2-C3 estabiliza la interacción del flavonoide con la enzima (Khan, Orhan *et al.*, 2009, Katalinic, Rusak *et al.*, 2010, Xie, Yang *et al.*, 2014).

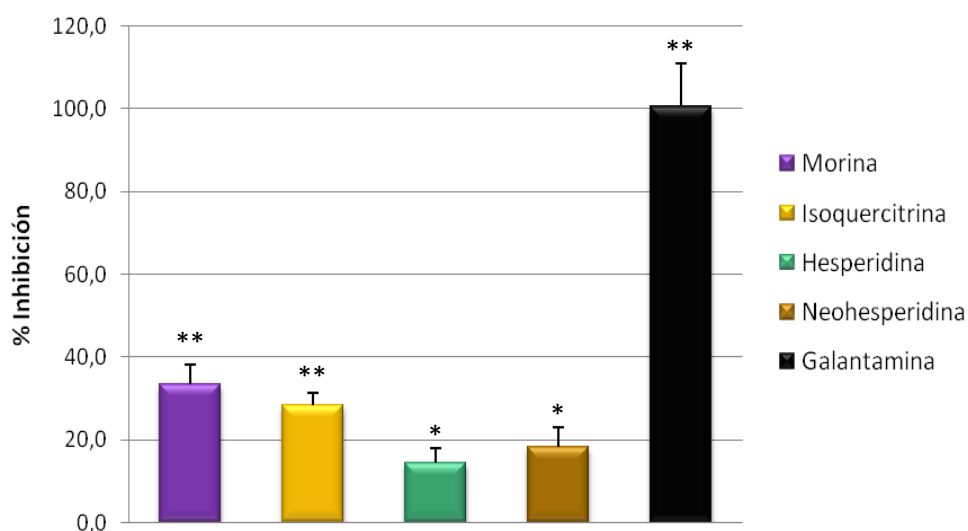


Figura 21. Inhibición de la actividad AChE (Test de Newman-Keuls; ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de la reacción control).

1.4. Agregación y desagregación del péptido β -amiloide

Se estudió *in vitro* tanto la capacidad de los compuestos para inhibir el proceso de agregación del péptido β -amiloide como la capacidad para favorecer la desestabilización de los agregados una vez formados. En ambos casos, se utilizó rutina como control positivo, flavonoide con probada actividad antiagregante y desagregante (Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011).

1.4.1. Inhibición de la agregación del péptido β -amiloide (βA_{25-35})

Para evaluar la inhibición de la agregación de βA , los compuestos en estudio se adicionaron al péptido βA_{25-35} en su conformación nativa, que es soluble (10 μM), desde el primer momento en que éste se sometió a incubación a 37°C en atmósfera húmeda y durante 72 horas. Los flavonoides se ensayaron a una concentración final de 10 μM .

En la tabla 3 se muestran los porcentajes de inhibición de la agregación de βA_{25-35} , obtenidos a partir del descenso de la emisión de fluorescencia de la tioflavina T con respecto a la fluorescencia de la reacción control de fibrillogénesis de βA_{25-35} .

Tabla 3. Inhibición de la agregación de βA_{25-35} (10 μM).

Flavonoide (10 μM)	% Inhibición
Morina	75,29 $\pm$ 3,03*
Isoquercitrina	95,27 $\pm$ 4,25*
Hesperidina	# —
Neohesperidina	# —
Rutina	69,84 $\pm$ 4,23*

(Test de Newman-Keuls; * $p < 0,01$ respecto de la reacción control. #No se ha calculado. Estos compuestos incrementan la emisión de fluorescencia)

De los cuatro flavonoides ensayados, morina e isoquercitrina produjeron una inhibición de la agregación del péptido β -amiloide superior al compuesto de referencia, el flavonol rutina. Por ello, se estudiaron a distintas concentraciones (1, 5 y 10 μ M). En la figura 22 se puede observar el efecto concentración-dependiente de morina e isoquercitrina en la inhibición de la agregación de β A₂₅₋₃₅.

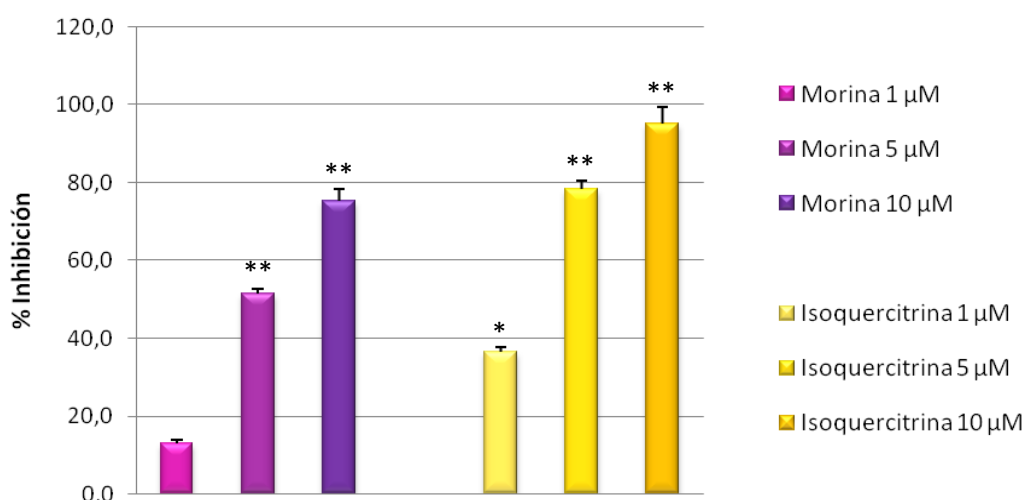


Figura 22. Inhibición de la agregación de β A₂₅₋₃₅ por morina e isoquercitrina (Test de Newman-Keuls; **p<0,001, *p<0,01 respecto del control).

1.4.2. Desagregación del péptido β -amiloide (β A₂₅₋₃₅)

Tras los experimentos de inhibición de la agregación se estudió la capacidad de estos flavonoides para desagregar o desestabilizar las fibrillas de β -amiloide previamente formadas. En este caso, los compuestos en estudio se adicionaron al péptido β A₂₅₋₃₅ (10 μ M) tras haberse completado el proceso de fibrillogénesis por la incubación a 37°C (72 horas) en atmósfera húmeda, y se mantuvieron durante 24 horas (96 horas transcurridas desde el inicio de la incubación del péptido β A₂₅₋₃₅). Los flavonoides se ensayaron a una concentración final de 10 μ M.

En la tabla 4 se muestran los porcentajes de desagregación del péptido β A₂₅₋₃₅, obtenidos a partir del descenso de la emisión de fluorescencia de la tioflavina T con respecto a la fluorescencia de la reacción control de fibrillogénesis de β A₂₅₋₃₅. Se aprecia que, a 10 μ M, el compuesto más activo fue la isoquercitrina, con una capacidad desagregante del 65,09% (p < 0,01), muy similar al control positivo.

Tabla 4. Desagregación de βA_{25-35} (10 μM).

Flavonoide (10 μM)	% Desagregación
Morina	28,46 $\pm$ 7,75*
Isoquercitrina	65,09 $\pm$ 4,93*
Hesperidina	# —
Neohesperidina	# —
Rutina	63,81 $\pm$ 3,57*

(Test de Newman-Keuls; * $p < 0,01$ respecto de la reacción control. #No se ha calculado. Estos compuestos incrementan la emisión de fluorescencia.)

Consecuentemente, se ensayaron distintas concentraciones de morina e isoquercitrina (1, 5 y 10 μM), y se demostró que isoquercitrina producía un efecto concentración-dependiente de la desagregación de βA (figura 23).

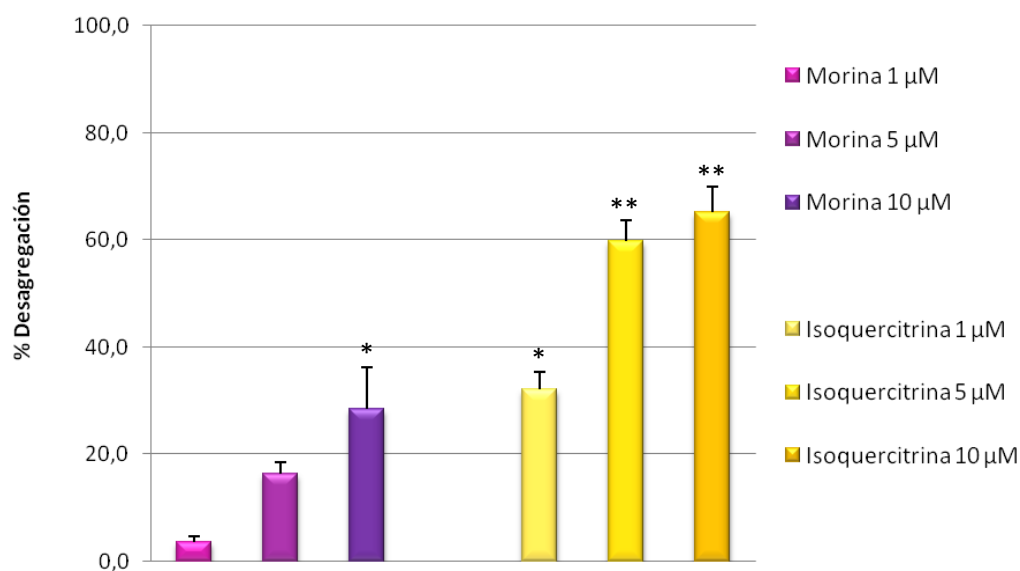


Figura 23. Desagregación de βA_{25-35} por morina e isoquercitrina (Test de Newman-Keuls, ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de la reacción control).

Se ha descrito que algunos polifenoles son capaces de desestabilizar las fibrillas de β -amiloide preformadas de manera concentración-dependiente, para lo que requieren en su estructura al menos dos anillos fenólicos separados por una cadena espaciadora de 2-6 átomos y un mínimo de tres grupos hidroxilo en los anillos aromáticos. Estos requisitos estructurales favorecen una interacción hidrofóbica entre la parte lipófila del polifenol y la región hidrófoba del β A (zona de interacción β A/ β A), bloqueando la asociación entre moléculas β A que conducen a la formación de las fibrillas (Ono, Yoshiike *et al.*, 2003). Los anillos fenólicos podrían interactuar con los residuos aromáticos de las fibrillas amiloides interrumpiendo en el péptido el apilamiento π - π , mientras que los grupos hidroxilo podrían actuar como interruptores de la formación de láminas β , estructuras muy estables, a través de enlaces de hidrógeno competitivos (González-Albadalejo, Sanz *et al.*, 2015).

Morina e isoquercitrina cumplen estos requisitos estructurales para inhibir potencialmente la formación de agregados de β -amiloide y promover su desagregación, siendo conocida la capacidad de morina para interactuar directamente con el péptido β A (Hanaki, Murakami *et al.*, 2016), uniéndose a sus extremos e impidiendo no solo la agregación peptídica, sino también desestabilizando los puentes de hidrógeno que fortalecen las placas formadas (Lemkul y Bevan, 2010). No obstante, comparando ambos flavonoles cabe destacar que isoquercitrina ha mostrado una actividad superior a morina y al compuesto de referencia, tanto inhibitoria del proceso de agregación como desestabilizante de las fibrillas una vez formadas, y dicha interacción en el proceso de fibrillogénesis no había sido descrita previamente para este flavonol.

Mientras que las características estructurales de morina e isoquercitrina favorecen su interacción con las zonas hidrofóbicas del péptido formando una estructura estable con el mismo y retrasando la formación de agregados, la introducción de un disacárido en el hidroxilo 7 del anillo A en hesperidina y neohesperidina confiere a estos flavonoides un mayor tamaño molecular y una menor hidrofobicidad que no favorecen dicha interacción con el péptido (Liu, Guo *et al.*, 2014). Se ha descrito que la glicosilación de grupos hidroxilo disminuye la afinidad de unión de flavonoides con proteínas ya que incrementa la polaridad de la molécula y disminuye su capacidad para penetrar en el interior de regiones hidrofóbicas de estructuras proteicas o peptídicas (Xiao, Cao *et al.*, 2009).

2. Efecto neuroprotector en modelos celulares de neurotoxicidad inducida por estrés oxidativo

2.1. Efecto de la concentración de flavonoide en la viabilidad celular

Previamente al estudio del efecto neuroprotector de los flavonoides en los diferentes modelos celulares de neurotoxicidad, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular con el fin de conocer el intervalo de concentración no tóxica de flavonoide en cada una de las líneas celulares:

- Neuroblastoma humano MC65
- Neuroblastoma humano APPswe
- Neuroblastoma hipocampal murino HT22

Para ello las células fueron tratadas con cada uno de los flavonoides en estudio, incorporándolos al medio de cultivo y manteniéndolos en el mismo durante al menos un periodo de 24 horas.

2.1.1. Viabilidad celular en neuroblastoma MC65

En la figura 24 se puede observar que el tratamiento de 24 horas con los flavonoides morina, hesperidina y neohesperidina a 10 μ M, respectivamente, y en presencia de tetraciclina no disminuye significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, ésta se ve afectada en presencia de isoquercitrina a concentraciones superiores a 1 μ M, disminuyendo significativamente a 5 y 10 μ M ($p < 0,001$). Esta línea celular es conocida por ser especialmente sensible a determinados compuestos en las condiciones del modelo experimental (Maezawa, Hong *et al.*, 2006, Hong, Maezawa *et al.*, 2007), por lo que el descenso de viabilidad ocasionado por isoquercitrina se ha tenido en cuenta en la realización de los ensayos de toxicidad intracelular por oligómeros de β A.

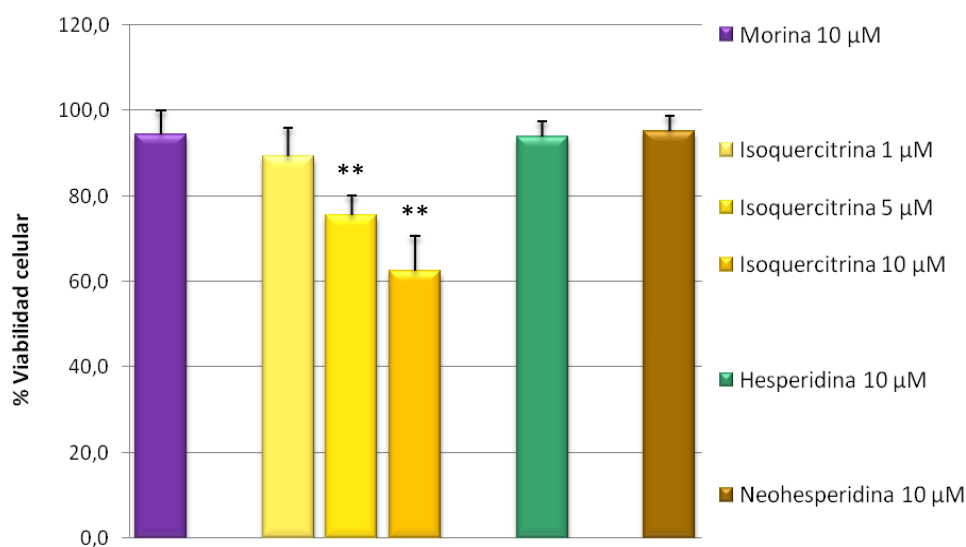


Figura 24. Viabilidad celular de la línea MC65 tras tratamiento de 24 horas con los flavonoides (Test de Newman-Keuls, **p < 0,001 respecto a células control).

2.1.2. Viabilidad celular en neuroblastoma APPswe

En la figura 25 se indica el porcentaje de viabilidad celular resultante tras el tratamiento de las células de neuroblastoma APPswe con los distintos compuestos, a concentración de 10 µM. Como se aprecia, ninguno de los flavonoides produjo un descenso significativo en la viabilidad celular. Cabe hacer alusión a un ligero incremento de la viabilidad de las células tratadas con morina (aproximadamente un 20% superior a la viabilidad de las células control no tratadas), que se ha reproducido en las diferentes réplicas de este ensayo.

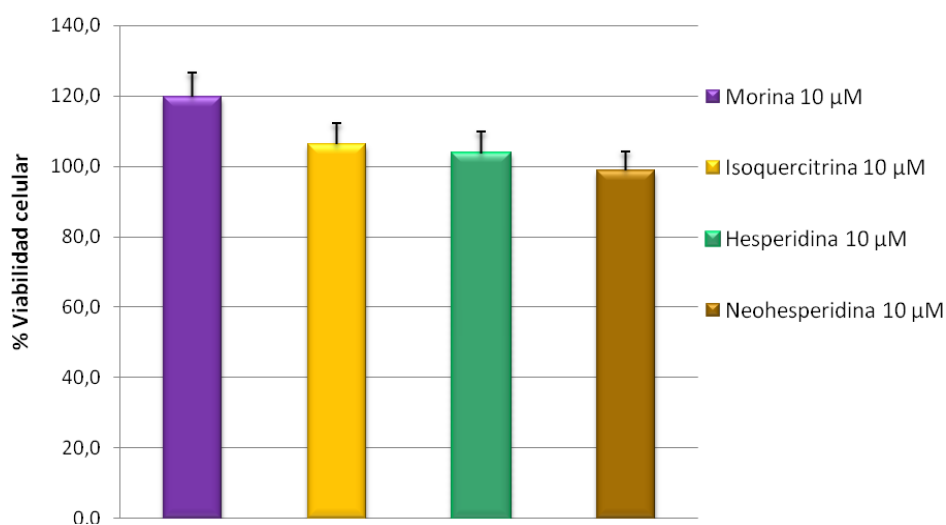


Figura 25. Viabilidad celular de la línea APPswe tras tratamiento de 24 horas con los flavonoides.

2.1.3. Viabilidad celular en neuroblastoma HT22

En la figura 26 se puede observar cómo los tratamientos con los flavonoides a concentración de 50 μ M no afectan significativamente a la viabilidad de las células HT22.

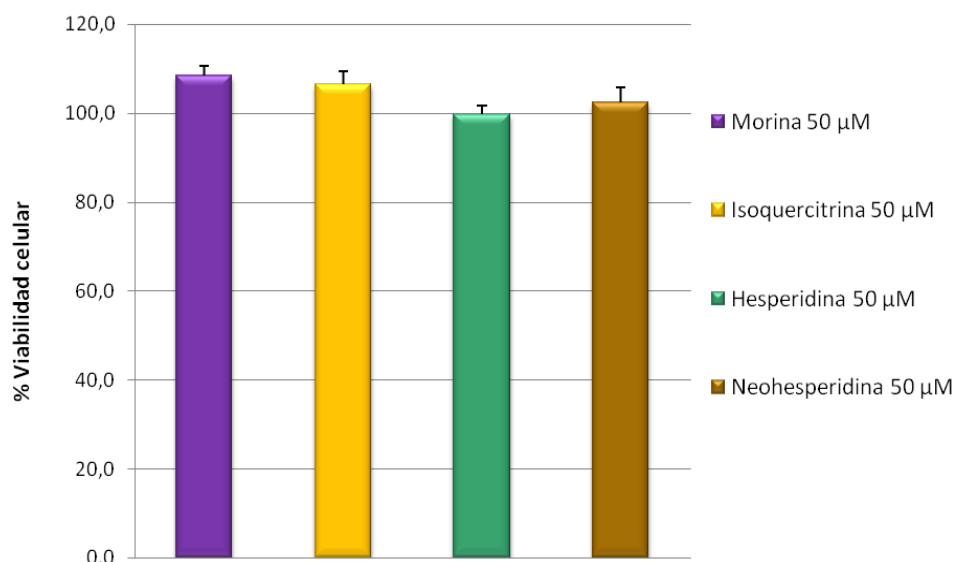


Figura 26. Viabilidad celular de la línea HT22 tras tratamiento de 24 horas con los flavonoides.

A la vista de las concentraciones de flavonoide utilizadas y de los valores de viabilidad celular, se puede afirmar que la línea celular HT22 es más resistente a la toxicidad de los compuestos en estudio que las líneas de neuroblastoma humano MC65 y APPswe. Algunas de las características principales de estas líneas celulares que pueden explicar la diferente sensibilidad de las células a los flavonoides en estudio son:

- La concentración más elevada de proteasoma en las células HT22 se localiza en el núcleo y en condiciones normales existe una elevada actividad proteasomal que proporciona a las proteínas nucleares una elevada protección (Jung, Engels *et al.*, 2006).
- La línea de neuroblastoma SH-SY5Y es extremadamente sensible a la expresión condicional del dominio carboxilo terminal de β PP (expresión del transgen APP-C99). Esta expresión condicional, que caracteriza a la línea como MC65, conduce a la acumulación intracelular de fragmentos peptídicos que sensibilizan a las células al estrés oxidativo activando un mecanismo de muerte celular mediado por desoxirribonucleasas (Sopher, Fukuchi *et al.*, 1996).

- ➔ La simulación de la neurotoxicidad inducida por β A *in vivo* es más eficaz en un sistema de células de neuroblastoma SH-SY5Y que sobre-expresa la mutación sueca de APP (APPswe), que en el tratamiento de las células con β A mediante la adición al medio de cultivo. Dicha mutación confiere a las células una extremada sensibilidad al estrés oxidativo debido a una mayor producción de β A que las células no transgénicas (Marques, Keil *et al.*, 2003, Keil, Bonert *et al.*, 2004).

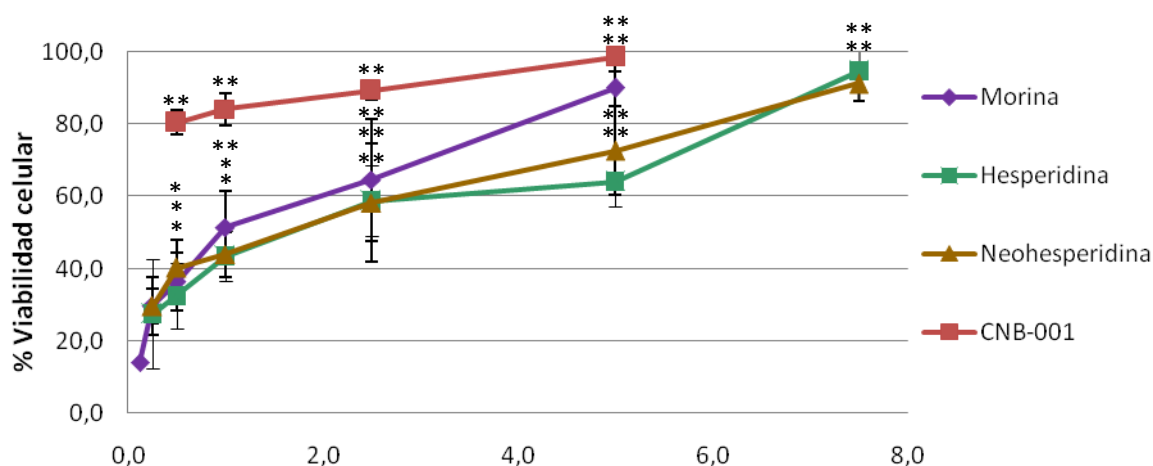
Por tanto, con las características particulares de cada una de las líneas celulares (MC65, APPswe y HT22) pretendemos alcanzar los objetivos de esta Tesis Doctoral, es decir, proponer diferentes mecanismos de protección para moléculas con estructura flavonoide mediante diferentes paradigmas experimentales, basados en la modificación de la homeostasia energética, que reproducen algún rasgo fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer.

2.2. Muerte celular inducida por oligómeros de β -amiloide

Veinticuatro horas después de la siembra de las células MC65, el medio de cultivo se reemplazó por un medio de suero reducido, carente de tetraciclina (con el fin de inducir la generación del fragmento C99), y conteniendo los respectivos flavonoides en estudio. Al cuarto día, se determinó el grado de descenso de la viabilidad celular.

Como se puede observar en la figura 27A, tras 96 horas de tratamiento, los flavonoides morina, neohesperidina y hesperidina, respectivamente, mostraron un efecto protector en las células MC65, en el rango de concentración de 0,25-7,5 μ M. Dicho efecto fue algo mayor con morina, cuyo tratamiento dio lugar a un incremento de la viabilidad celular muy próximo al derivado de curcumina (CNB-001), utilizado como control positivo a la concentración de 5 μ M. Por otro lado, el flavonol isoquercitrina, debido a su toxicidad en esta línea celular, fue ensayado en un rango de concentración menor (0,005-0,25 μ M), mostrando un significativo aumento de la viabilidad celular que llegó hasta el 60% (de la viabilidad de las células control) a la concentración de 0,25 μ M (figura 27B).

A



B

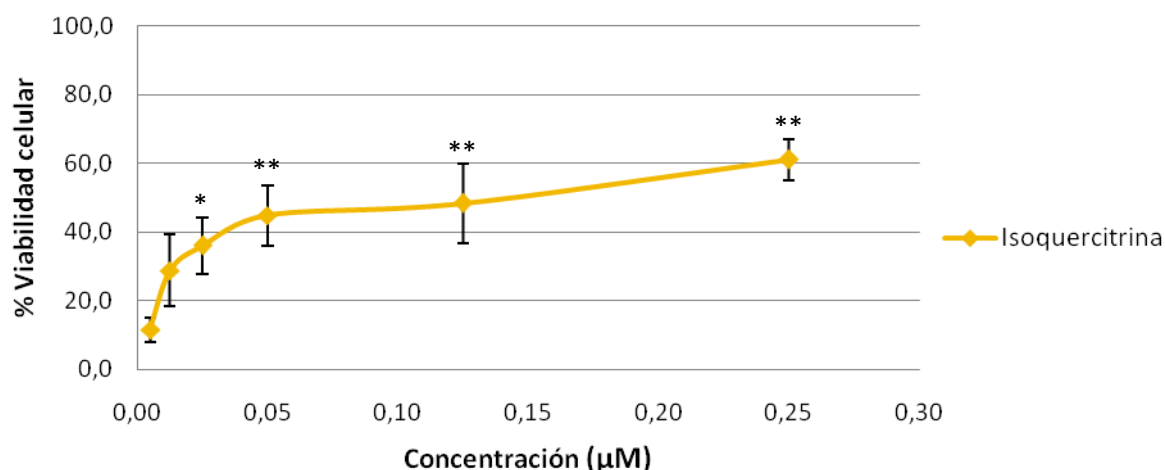


Figura 27. Protección de los flavonoides frente a la toxicidad amiloide intracelular en células MC65 (Test de Newman-Keuls, ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células control).

En este modelo de neurotoxicidad inducida en la línea MC65, la eliminación de la tetraciclina del medio de cultivo provoca la expresión condicional del fragmento C99, que es procesado por γ -secretasa para liberar el péptido β A. El descenso drástico de la viabilidad celular sobreviene debido a una acumulación intracelular de oligómeros de β A. Aunque la toxicidad extracelular de los oligómeros de β A juega un papel relevante en la EA, es la acumulación intracelular del β A la que se considera clave en la patogénesis de la enfermedad, antes incluso de su agregación formando placas, dado que los oligómeros solubles promueven la muerte celular por distintos mecanismos (Talaga, 2004, McIlwain, Berger *et al.*, 2013).

En nuestros ensayos de viabilidad se ha puesto de manifiesto un notable efecto preventivo de la citotoxicidad como consecuencia del tratamiento con los respectivos flavonoides, que podría explicarse por diversos mecanismos, teniendo en cuenta que el proceso de muerte celular en este modelo de neurotoxicidad es exclusivamente intracelular. Prueba de ello es, por ejemplo, la insensibilidad de esta línea celular a la aplicación extracelular del péptido βA_{25-35} (Sopher, Fukuchi *et al.*, 1996) o la ausencia de citotoxicidad en presencia extracelular de agregados de βA de elevado peso molecular (Woltjer, Maezawa *et al.*, 2003).

En el caso de morina e isoquercitrina, como se ha podido comprobar en los ensayos *in vitro*, la neuroprotección observada en la línea MC65 podría atribuirse no sólo a una potencial capacidad inhibitoria de γ -secretasa sino a la unión del flavonoide a las formas monomérica y/o oligoméricas intracelulares del péptido βA , o al menos a la inhibición directa del proceso de fibrillogénesis *in vitro* del péptido βA_{25-35} , tal como hacen otros compuestos descritos como neuroprotectores (Maezawa, Hong *et al.*, 2006). Sin embargo, hesperidina y neohesperidina, que no han mostrado dichas actividades *in vitro*, han ejercido una protección celular significativa con porcentajes de viabilidad celular superiores al 80% a la concentración de 7,5 μM . Por tanto, cabe plantear diferentes mecanismos que expliquen la neuroprotección ejercida por los compuestos en estudio en este modelo de neurotoxicidad.

En primer lugar, el efecto neuroprotector que ejercen hesperidina y neohesperidina en la línea MC65 se puede atribuir a su capacidad antioxidante, ya que se ha demostrado que ésta interviene en la protección de la viabilidad celular de ciertos modelos celulares de neurotoxicidad (Hwang y Yen, 2008, Tamilselvam, Braidy *et al.*, 2013) e incluso ha sido descrita para éstos y otros flavonoides en cultivos primarios celulares, donde se ha demostrado que reducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) inducida por especies tanto monoméricas como oligoméricas de βA (Lee, Ha *et al.*, 2005, Ho, Poon *et al.*, 2015). Además, el aumento de la viabilidad celular en la línea MC65 se correlaciona estrechamente con la reducción en la producción de ERO (Chojnacki, Liu *et al.*, 2015), dado que se ha demostrado que el estrés oxidativo contribuye de forma significativa al desarrollo de citotoxicidad en esta línea debido a la acumulación intracelular de βA . La sobre-expresión condicional del fragmento C99 en estas células desencadena, por ejemplo, una pronunciada fragmentación del DNA por inducción de desoxirribonucleasas conduciendo a la muerte celular, proceso que parece estar modulado y/o mediado por ERO. Y así, la hiperoxigenación incrementa la actividad desoxirribonucleasa mientras que la

hipoxigenación y el tratamiento con antioxidantes la disminuye (Sopher, Fukuchi *et al.*, 1996).

Por otro lado, también se ha descrito que algunos flavonoides ejercen una significativa actividad neuroprotectora a través de la modulación de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes en modelos de toxicidad por βA , tanto en la línea de neuroblastoma MC65 (Li, Tsai *et al.*, 2010) como en la línea de feocromocitoma PC12 (Kim, Sul *et al.*, 2009, Ye, Meng *et al.*, 2010).

2.3. Generación intracelular de radicales libres

En la tabla 5 se muestra el porcentaje de inhibición de cada uno de los flavonoides en estudio en la generación intracelular de radicales libres inducida por peróxido de hidrógeno. Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- a) Células sin tratamiento (células control)
- b) Células tratadas con peróxido de hidrógeno
- c) Células pretratadas con flavonoide (30 minutos) más peróxido de hidrógeno

La diferencia entre el valor de la intensidad de fluorescencia emitida por las células tratadas con peróxido de hidrógeno y el valor de la intensidad de fluorescencia emitida por las células que no reciben ningún tratamiento representa el 100% de magnitud en la generación intracelular de radicales libres.

Todos los flavonoides se probaron a 10 μM , y como compuesto de referencia y control positivo se empleó rutina a la misma concentración. Como se puede observar en la tabla 5, morina e isoquercitrina inhiben totalmente la generación intracelular de radicales libres producida por el peróxido de hidrógeno a 50 μM , mientras que hesperidina y neohesperidina mostraron sólo una inhibición parcial.

Tabla 5. Inhibición de la generación intracelular de radicales libres por los flavonoides en estudio.

Flavonoide (10 μ M)	% INHIBICIÓN
Morina	100 $\pm$ 1,95**
Isoquercitrina	100 $\pm$ 1,02**
Hesperidina	48,48 $\pm$ 4,49**
Neohesperidina	45,58 $\pm$ 3,08**
Rutina	100 $\pm$ 8,41**

(Test de Newman-Keuls, **p<0,001 respecto de células tratadas con peróxido de hidrógeno.)

Morina e isoquercitrina se probaron a concentraciones de 0,01, 0,05, 0,1 y 1 μ M, mientras que hesperidina y neohesperidina se probaron a 1, 5 y 10 μ M. Dichos resultados aparecen representados en la figura 28.

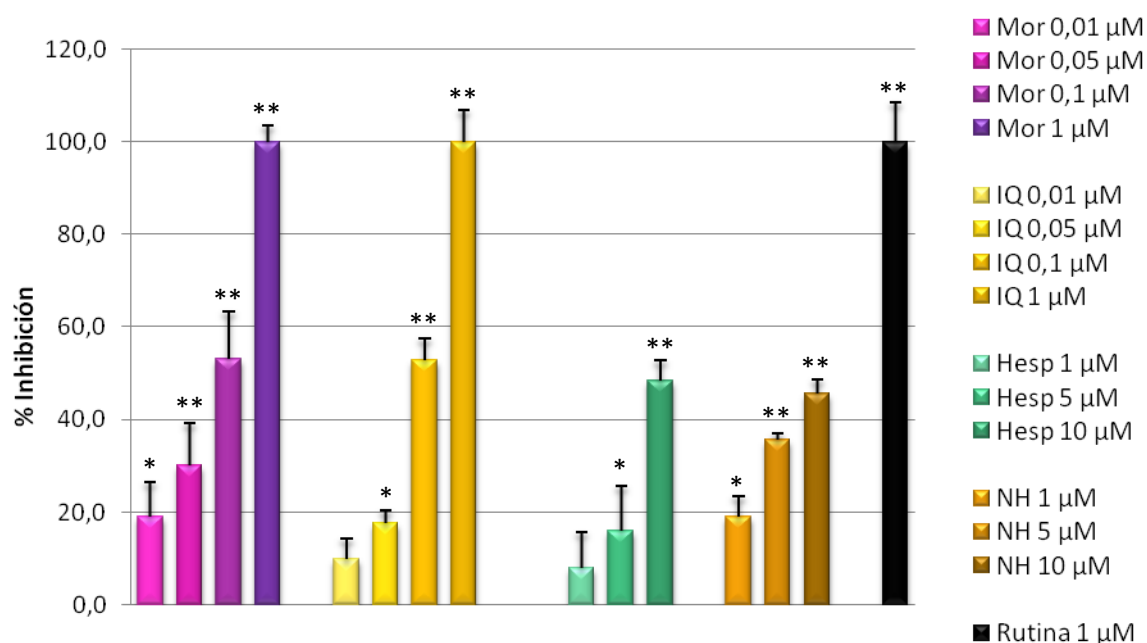


Figura 28. Inhibición de la generación intracelular de radicales libres inducida por H₂O₂ (50 μ M) (Test de Newman-Keuls, **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con H₂O₂).

Como puede observarse, los flavonoles inhibieron de forma estadísticamente significativa la generación intracelular de radicales libres a concentraciones de 1 y 0,1 μM ($p < 0,001$), con porcentajes de inhibición superiores al 50% a 0,1 μM y del 100% a 1 μM . Las flavonas, sin embargo, mostraron una actividad mucho menor, próxima al 50% de inhibición a una concentración de 10 μM , diez veces mayor que la concentración a la que los flavonoles muestran el 100% de inhibición.

La capacidad captadora de radicales libres por flavonoides se ha descrito tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Ishige, Schubert *et al.*, 2001, Rice-Evans, 2001), si bien dicha capacidad depende tanto de la molécula como de las condiciones experimentales (Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011). En general, se considera que los requisitos estructurales que proporcionan una importante actividad antioxidante incluyen un grupo 3',4'-dihidroxicatecol en el anillo B, una insaturación en las posiciones 2 y 3 y un grupo oxo en la posición 4 del anillo C (Fraga, Galleano *et al.*, 2010, Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011), todo ello con una disposición espacial mayoritariamente coplanar (Dajas, Rivera-Megret *et al.*, 2003). De los cuatro compuestos estudiados, isoquercitrina cumple todos estos requisitos, y morina tres de ellos, si bien presenta dos grupos hidroxilo en el anillo B que podrían conjugarse con la estructura resonante del benceno, aportando estabilidad. Sin embargo, hesperidina y neohesperidina no sólo carecen de la insaturación en las posiciones 2 y 3 del anillo C, lo que les resta planaridad, sino que además presentan una metilación en la posición 4 del anillo C que impide la completa conjugación del catecol con el benceno. Estas diferencias en sus estructuras podrían explicar las diferencias observadas en su actividad antioxidante.

El presente trabajo de investigación es el primero que describe la actividad antioxidante de estos compuestos en un modelo celular de neuroblastoma humano (línea SH-SY5Y) que sobre-expresa la proteína precursora del β -amiloide (APP) humana portadora de la mutación sueca (APP^{swe}).

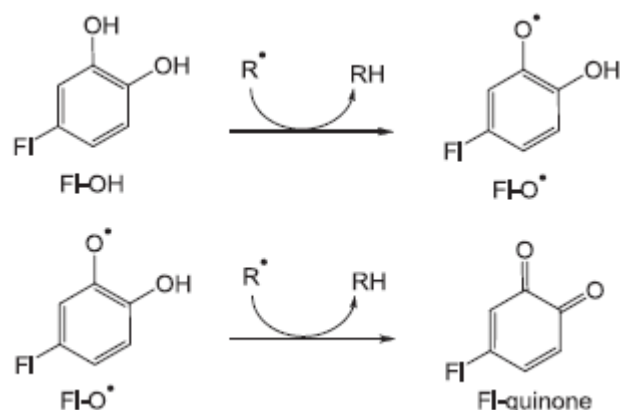


Figura 29. Principal mecanismo de captación de radicales libres (R[•]) por flavonoides (Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011).

En la EA se propone que el estrés oxidativo asociado al péptido β -amiloide está mediado por el peróxido de hidrógeno (Ali, Separovic *et al.*, 2005). Por tanto, los compuestos que disminuyen el daño provocado por esta molécula, el peróxido de hidrógeno, podrían utilizarse en el tratamiento de esta patología. En el presente estudio, morina e isoquercitrina se han mostrado como las moléculas con mayor capacidad de inhibir la toxicidad provocada por peróxido de hidrógeno, efecto neuroprotector en consonancia con el observado por otros autores (Rogerio, Kanashiro *et al.*, 2007, Zhang, Kang *et al.*, 2009, Jung, Kim *et al.*, 2010, Jung, Kim *et al.*, 2010), y comparable al ejercido por rutina, compuesto de referencia utilizado en este estudio (Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011).

2.4. Determinación de la actividad quimotripsina del proteasoma 20S y 26S

Inicialmente se realizaron tratamientos de 24 horas, en células APPswe intactas, con cada uno de los flavonoides en estudio a distintas concentraciones, con el fin de esclarecer si ejercían *per se* algún efecto sobre la actividad quimotripsina proteasomal basal. Como se puede observar en la tabla 6, ninguno de los flavonoides provocó cambios en la actividad quimotripsina dependiente de ATP (26S). Sin embargo, morina (1 μ M) e isoquercitrina (0,1-10 μ M) mostraron un efecto inhibitorio significativo de la actividad no dependiente de ATP (20S).

El efecto observado con morina a 1 μ M podría resultar de un proceso de *hormesis* por el cual la exposición de las células a concentraciones bajas de dicho compuesto, que produce citotoxicidad a concentraciones mayores, induce un efecto o respuesta beneficiosa adaptativa celular (Mattson, 2008, Bhakta-Guha y Efferth, 2015). El fenómeno de hormesis ya ha sido descrito para distintos compuestos con estructura flavonoide (Siow y Mann, 2010, Vargas y Burd, 2010, Pietsch, Saul *et al.*, 2011, Pallauf, Duckstein *et al.*, 2016).

La inhibición ejercida por morina e isoquercitrina, que no deriva en una disminución de la viabilidad celular, podría inducir un reajuste de los sistemas de degradación de proteínas intracelulares; por ejemplo, desencadenando un aumento de la actividad catepsina B. Las células poseen dos sistemas de degradación de proteínas intracelulares, el sistema ubiquitina-proteasomal y la autofagia. Aunque durante años se han considerado como dos sistemas distintos y separados, recientemente se ha demostrado su estrecha correlación. Actualmente, se conoce poco acerca de cómo la presencia de formas silvestres o mutadas de la APP (APPwt y APPmut, respectivamente) en modelos celulares y animales de EA alteran potencialmente el equilibrio entre las diferentes vías proteolíticas intracelulares. Aun así, se ha observado que la expresión de una isoforma mutada de APP se correlaciona con un aumento en el estrés oxidativo, una marcada inhibición de las actividades del proteasoma y un deterioro en el flujo autofágico. Concretamente, la expresión de APPmut es capaz de inducir de forma robusta la expresión de catepsina B y reducir significativamente la elevación de proteínas ubiquitinadas tras la administración de un inhibidor del proteasoma (Cecarini, Bonfili *et al.*, 2014). La activación del procesamiento de catepsina B hacia su forma madura puede considerarse una estrategia de las neuronas con EA para deshacerse de la sobrecarga de proteínas ubiquitinadas inducida por el tratamiento con un determinado inhibidor proteasomal. La catepsina B reduce los niveles de péptidos β A, especialmente la especie más proclive a la agregación, β A₁₋₄₂, a través de escisión proteolítica, generando péptidos β A truncados en el extremo C-terminal que poseen un menor carácter amiloidogénico que β A₁₋₄₂. Por tanto, la catepsina B probablemente cumpla funciones antiamiloidogénicas y neuroprotectoras (Mueller-Steiner, Zhou *et al.*, 2006). Con estas evidencias proporcionadas por la literatura científica, las propiedades inhibitoras del proceso de fibrillogénesis que hemos observado y descrito anteriormente para morina e isoquercitrina podrían atribuirse también a un aumento de la expresión de catepsina B, que podría haber resultado de la inhibición de la actividad quimotripsina 20S. En definitiva, las células resistentes a la toxicidad por inhibición del proteasoma pueden alcanzar niveles más elevados de proteasas lisosómicas y, por tanto, ser más eficientes al derivar las proteínas

intracelulares a estas proteasas tras el tratamiento con el inhibidor del proteasoma, y así prevenir o retrasar la acumulación deletérea de proteínas tóxicas. Sin embargo, se ha descrito que concentraciones anormalmente elevadas de catepsina en el citosol podrían dañar simultáneamente la membrana lisosómica desde el exterior y producir daño mitocondrial mediante la activación de Bid y la liberación de citocromo c, así como la activación de caspasa 9 y caspasa 3. Por tanto, es posible que la supervivencia celular dependa de una inhibición moderada de la actividad 20S, que conduzca a un incremento moderado de catepsina (Siklos, BenAissa *et al.*, 2015).

Además, la inhibición proteasomal por morina e isoquercitrina en células APPswe podría seguir un patrón similar al de otros paradigmas experimentales en los que se ha puesto de manifiesto que la aplicación de inhibidores del proteasoma atenúa la muerte neuronal, ya que es posible que la inhibición proteasomal induzca una forma beneficiosa de proteínas no proteasómicas de choque térmico (*Heat shock protein*, Hsp) (Bush, Goldberg *et al.*, 1997, Ding y Keller, 2001). Las Hsp son chaperonas moleculares que, junto con co-chaperonas como CHIP (*C-terminus Hsp70 interacting protein*), pueden estabilizar proteínas para la degradación proteasomal e influir así en el descenso de los niveles de β A y en el mantenimiento de la viabilidad celular, según se ha demostrado en líneas neuronales y en neuronas primarias (Qian, McDonough *et al.*, 2006, Kumar, Ambasta *et al.*, 2007, Edkins, 2015). En presencia de inhibidores del proteasoma, los niveles de APP endógenos aumentan significativamente y, en consecuencia, aumenta la interacción con CHIP. Al mismo tiempo, entre las diversas proteínas de choque térmico, los niveles de Hsp70 se inducen de forma más consistente por inhibición del proteasoma. De esta forma, los complejos de CHIP, Hsp70 y APP (así como fragmentos C-terminales) se estabilizan por la acción del inhibidor proteasomal. CHIP se comporta como un interruptor bimolecular ya que, por un lado interacciona con Hsp para estabilizar APP, mientras que también promueve la ubiquitinación de una subpoblación de moléculas de APP que están destinadas a la degradación proteasomal (Ding y Keller, 2001, Kumar, Ambasta *et al.*, 2007).

Tabla 6. Actividad quimotripsina proteasomal 20S y 26S.

	% Actividad 20S	% Actividad 26S
Morina (μM)		
0,05	100 ± 1,07	96,83 ± 0,76
0,1	92,89 ± 4,33	95,15 ± 1,95
1	62,36 ± 2,53*	96,88 ± 1,33
10	100 ± 5,60	100 ± 4,15
Isoquercitrina (μM)		
0,05	98,95 ± 2,92	99,22 ± 3,76
0,1	55,12 ± 4,02*	98,93 ± 2,79
1	49,35 ± 2,05**	90,30 ± 5,78
10	42,69 ± 1,77**	90,82 ± 3,92
Hesperidina (μM)		
1	100 ± 1,70	100 ± 7,40
10	100 ± 0,93	100 ± 1,10
Neohesperidina (μM)		
1	99,90 ± 1,05	100 ± 1,00
10	99,60 ± 2,41	100 ± 0,52

Test de Newman-Keuls, **p<0,001; *p<0,01 respecto de células control.

Teniendo en consideración estos resultados y el aumento de la actividad caspasa 3 como consecuencia del tratamiento con morina a 10 μM (se mostrará más adelante), se decidió estudiar la actividad protectora de los flavonoides, a concentraciones menores de 10 μM y durante un tiempo de tratamiento menor de 24 horas, frente a un agente oxidante, el peróxido de hidrógeno. Por ello, se realizó un pretratamiento de 3 horas con cada flavonoide a 0,5 y 1 μM, respectivamente, seguido de una exposición de 30 minutos al peróxido de hidrógeno, a una concentración de 50 μM. La recogida de los pellets celulares se realizó a las 16 horas de la retirada del peróxido de hidrógeno.

Los resultados de actividad proteasomal 20S y 26S, respectivamente, en células sometidas a estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno se muestran en las figuras 30 y 31.

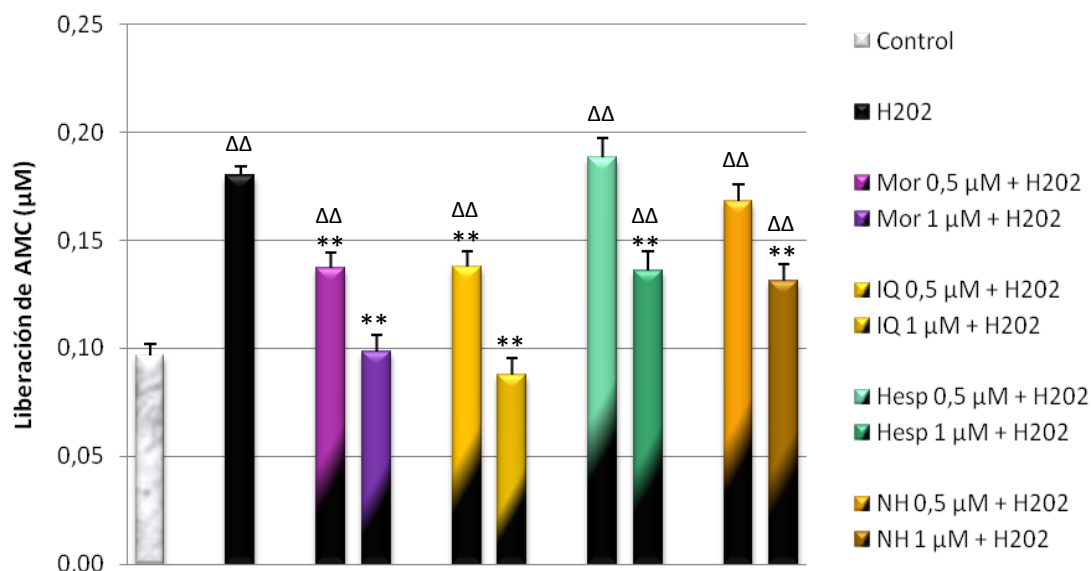


Figura 30. Actividad quimotripsina proteasomal no dependiente de ATP (20S)
(Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con H_2O_2 ; ΔΔ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

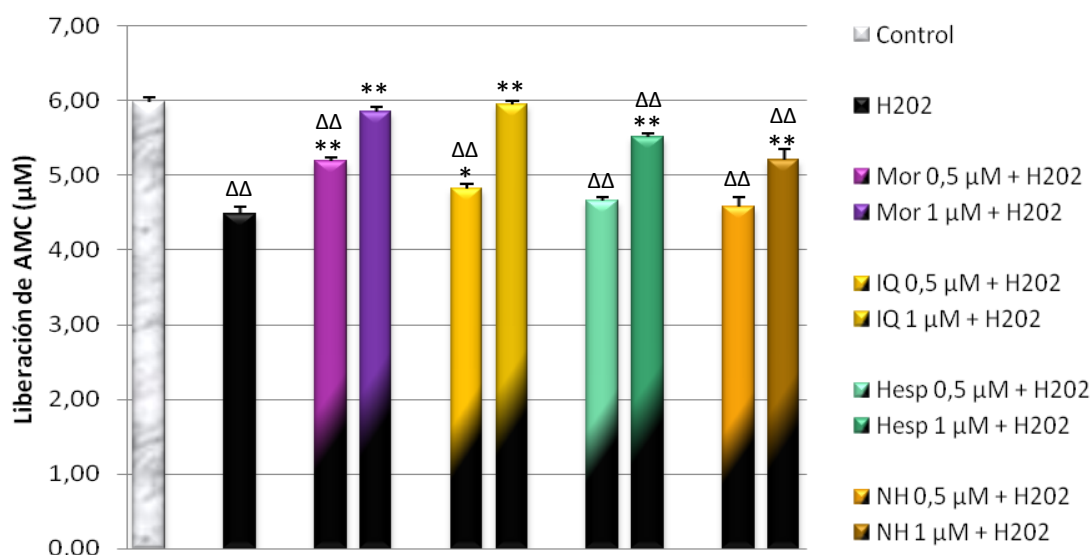


Figura 31. Actividad quimotripsina proteasomal dependiente de ATP (26S)
(Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con H_2O_2 ; ΔΔ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno produjo un marcado aumento de la actividad 20S respecto de las células control ($p < 0,001$), como se ha podido observar a partir del incremento de la intensidad de fluorescencia (expresado en concentración de 7-amino-4-metilcumarina, AMC) (figura 30). El pretratamiento de las células con morina e isoquercetrina a la mayor concentración (1 μM) previno totalmente el aumento de la actividad 20S inducida por el peróxido de hidrógeno ($p < 0,001$). Hesperidina y neohesperidina, sin embargo, lo hicieron de una forma parcial aunque también significativamente ($p < 0,001$).

En la determinación de la actividad 26S, observamos que las células sometidas al peróxido de hidrógeno experimentaron un descenso de dicha actividad en relación a las células control ($p < 0,001$), a partir del descenso de la intensidad de fluorescencia (figura 31). El pretratamiento de las células con morina e isoquercetrina a la mayor concentración (1 μM) previo al estrés aplicado, previno totalmente la disminución de la actividad 26S inducida por el peróxido de hidrógeno ($p < 0,001$). Hesperidina y neohesperidina también ejercieron un efecto preventivo del descenso de dicha actividad, aunque parcialmente ($p < 0,001$).

Si bien los cuatro flavonoides mejoran el perfil global de actividad proteasomal celular, alterada por la exposición celular al peróxido de hidrógeno, dicha mejora fue especialmente relevante en el caso de morina e isoquercitrina ya que a la concentración de 1 μM previnieron significativamente el incremento de la actividad 20S y el descenso de la actividad 26S.

Hasta el momento se han realizado pocos estudios en busca de compuestos que protejan la actividad proteasomal, cuya alteración está estrechamente ligada a la acumulación neurofibrilar característica de la EA, contribuyendo significativamente en el desarrollo de ésta y otras enfermedades neurodegenerativas (Dennissen, Kholod *et al.*, 2012, Dantuma y Bott, 2014, Bonet-Costa, Pomatto *et al.*, 2016). Dado que el incremento del estrés oxidativo constituye uno de los principales procesos responsables del deterioro de la ruta ubiquitina-proteasomal por favorecer la conjugación de la ubiquitina y disminuir la actividad quimotripsina del proteasoma (Shang y Taylor, 2011), nos pareció apropiado e interesante determinar el potencial efecto protector de los flavonoides en estudio sobre la actividad proteasomal 20S y 26S, pues habíamos demostrado previamente su actividad antioxidante en la línea de neuroblastoma APPswe.

Para compuestos ampliamente estudiados por su actividad antioxidante, como la N-acetilcisteína, se ha descrito que el efecto protector en la neurotoxicidad inducida por disfunción proteasomal neuronal es principalmente debido a su capacidad captadora (*scavenger*) de ERO y al mantenimiento de los niveles de glutatión reducido (GSH) (Cheng, Anand *et al.*, 2016). Ya se han descrito en la literatura algunos estudios con flavonoides, como apigenina, que por su capacidad antioxidante han mostrado un significativo efecto neuroprotector en modelos de neurotoxicidad inducida por inhibición de la actividad proteasomal (Kim, Nam *et al.*, 2016). Igualmente, nuestro grupo de investigación ha estudiado diversos flavonoides, y entre ellos, quercetina y su heterósido rutina, han mostrado actividad neuroprotectora mediante la inducción generalizada de las enzimas antioxidantes, modulando así la actividad quimotripsina del proteasoma (20S y 26S) (Martin-Aragon, Jimenez-Aliaga *et al.*, 2016). Esta influencia del flavonoide quercetina en la funcionalidad celular se ha puesto de manifiesto, por ejemplo, en un modelo de EA en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, que expresa el péptido humano βA_{1-42} en células musculares y responden con parálisis a la agregación del mismo. En este paradigma experimental, el incremento en la agregación de βA_{1-42} se correlaciona claramente con el fenotipo de parálisis, y tanto la concentración de βA_{1-42} agregado, como la magnitud de la parálisis, se reducen de una forma dosis-dependiente por quercetina mediante un incremento de la degradación proteasomal y la macroautofagia (Regitz, Dussling *et al.*, 2014).

También se han considerado otros mecanismos atribuidos a flavonoides, distintos a la actividad antioxidante, responsables de la protección frente a la disfunción proteasomal. Es el caso de fisetina, cuyo efecto neurotrófico descrito en neuronas corticales de rata podría ser el principal responsable de la restauración de la actividad proteasomal (Maher, 2008). En consonancia con este estudio, es interesante destacar que en nuestros experimentos de viabilidad celular con células APPswe tratadas con morina, hemos observado un aumento significativo de la viabilidad celular respecto de las células control que no reciben tratamiento (figura 25).

La protección de la integridad del proteasoma podría suponer una estrategia prometedora para el tratamiento de la EA, dado que además se ha demostrado que el incremento o mantenimiento de la actividad del proteasoma promueve la resistencia celular al estrés oxidativo y aumenta la supervivencia celular (Kwak, Cho *et al.*, 2007, Chondrogianni, Voutetakis *et al.*, 2015).

2.5. Determinación de la actividad caspasa 3, 8 y 9

Para determinar si los flavonoides *per se* ejercían algún efecto en el grado de activación de caspasa 3, 8 y 9, se realizaron inicialmente tratamientos de 24 horas con cada flavonoide. En el caso de los tratamientos con isoquercitrina, hesperidina y neohesperidina no se observaron cambios significativos en la intensidad de fluorescencia emitida por hidrólisis del sustrato fluorogénico específico respecto a las células control. Sin embargo, las células tratadas con morina a 10 μM presentaron un aumento de la actividad caspasa 3, sin experimentar un descenso de la viabilidad celular (Tabla 7). Por tanto, se decidió utilizar concentraciones de flavonoide inferiores a 10 μM en esta línea celular que iba a servir como modelo de neurotoxicidad.

Tabla 7. Actividad de caspasa 3, 8 y 9.

	Caspasa 3	Caspasa 8	Caspasa 9
Morina (μM)			
0,05	101,01 $\pm$ 3,81	99,88 $\pm$ 3,56	91,70 $\pm$ 6,84
0,1	91,50 $\pm$ 8,83	98,81 $\pm$ 1,40	103,95 $\pm$ 1,32
1	97,52 $\pm$ 5,68	96,35 $\pm$ 4,15	102,32 $\pm$ 1,36
10	144 $\pm$ 9,78**	98,23 $\pm$ 1,84	103,45 $\pm$ 4,99
Isoquercitrina (μM)			
0,05	106,55 $\pm$ 5,05	98,02 $\pm$ 2,93	95,51 $\pm$ 7,72
0,1	102,44 $\pm$ 3,49	97,95 $\pm$ 2,82	100,07 $\pm$ 1,55
1	100,03 $\pm$ 10,65	97,30 $\pm$ 1,73	92,67 $\pm$ 6,71
10	101,02 $\pm$ 5,84	96,19 $\pm$ 3,29	102,56 $\pm$ 9,01
Hesperidina (μM)			
1	111,73 $\pm$ 5,42	97,88 $\pm$ 1,48	97,91 $\pm$ 4,63
10	99,50 $\pm$ 2,52	101,33 $\pm$ 2,71	98,31 $\pm$ 5,45
Neohesperidina (μM)			
1	106,12 $\pm$ 5,15	102,57 $\pm$ 4,11	103,94 $\pm$ 6,55
10	108,06 $\pm$ 7,10	101,96 $\pm$ 3,08	107,31 $\pm$ 4,46

Test de Newman-Keuls, **p<0,001; *p<0,01 respecto de células control.

A continuación se estudió la capacidad de los flavonoides para prevenir la activación de caspasas tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno a 50 μ M. En las figuras 32, 33 y 34 se representa la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF) obtenida de las muestras de cada uno de los grupos de tratamiento.

El tratamiento de las células con peróxido de hidrógeno produjo un marcado aumento de la actividad caspasa 3 respecto de las células control ($p < 0,001$), como se ha podido observar a partir del incremento de la intensidad de fluorescencia (figura 32). El pretratamiento de las células con cualquiera de los flavonoides en estudio previno parcialmente el aumento de dicha actividad inducida por el peróxido de hidrógeno ($p < 0,01$). Dicho efecto no pareció depender de la concentración de flavonoide.

En la determinación de la actividad caspasa 9, observamos que las células sometidas al peróxido de hidrógeno experimentaron también un incremento de dicha actividad en relación a las células control ($p < 0,001$) (figura 33). El pretratamiento de las células con cualquiera de los flavonoides en estudio previno parcialmente el aumento de dicha actividad.

En el caso de la actividad caspasa 8, no se observaron cambios significativos entre las células tratadas con peróxido de hidrógeno y células control (figura 34).

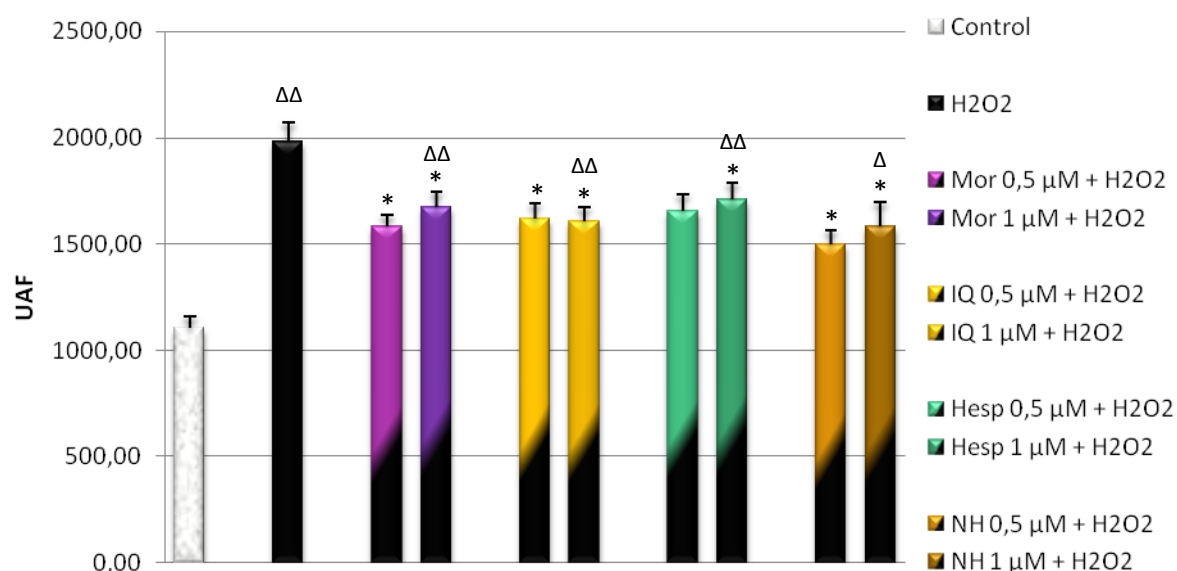


Figura 32. Actividad caspasa 3 en células APPswe (Test de Newman-Keuls; ** $p < 0,001$, * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con H₂O₂; ΔΔ $p < 0,001$, Δ $p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

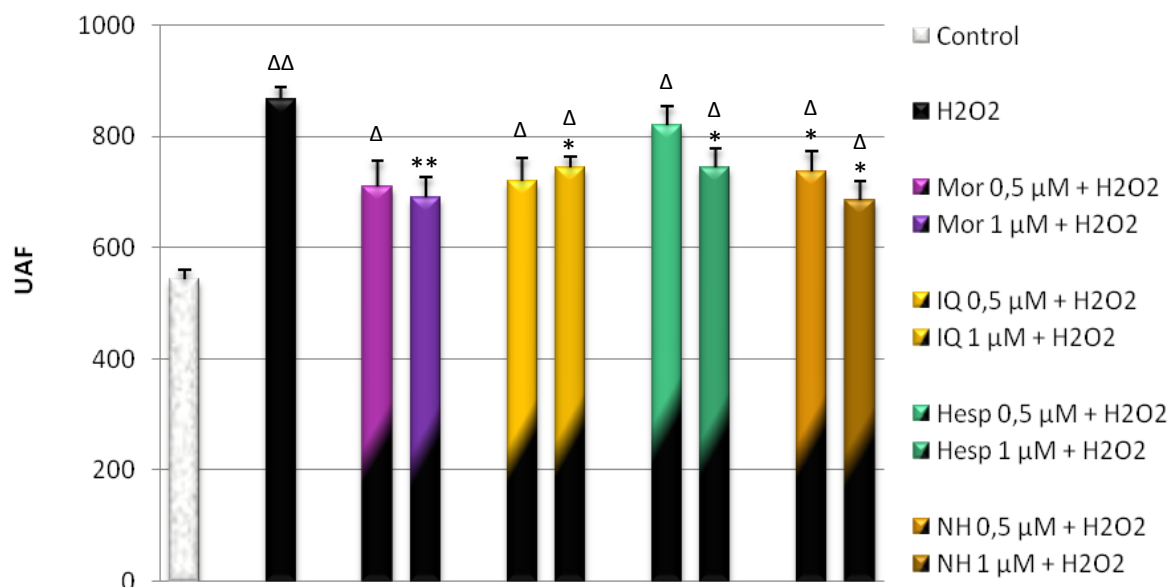


Figura 33. Actividad caspasa 9 en células APPswe (Test de Newman-Keuls; **p<0,001, *p<0,01 respecto de células tratadas con H₂O₂; ΔΔp<0,001, Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

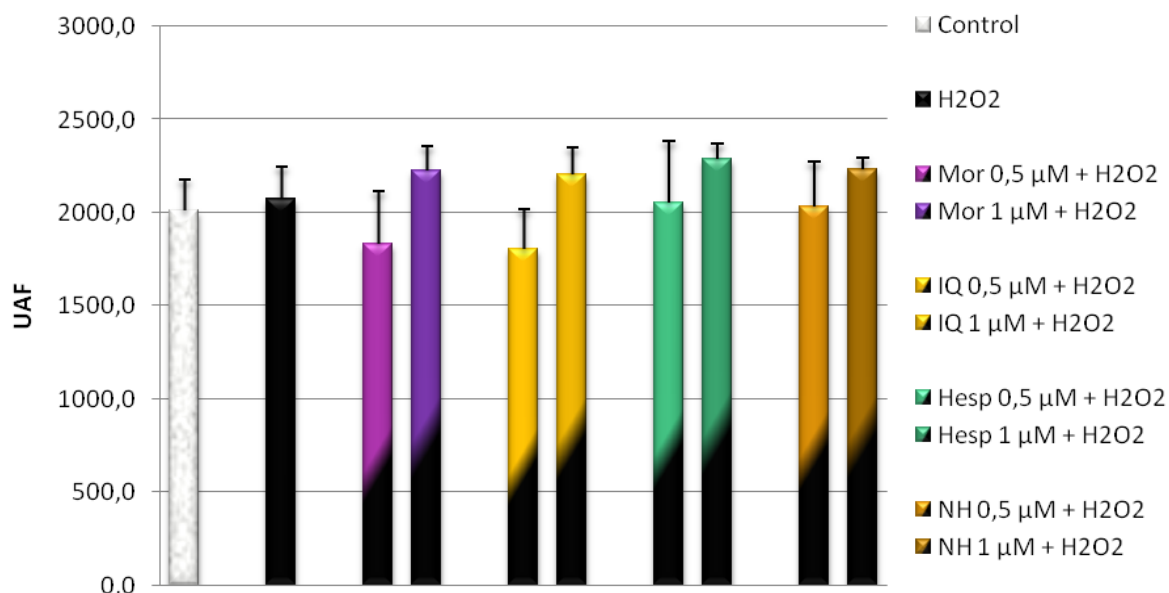


Figura 34. Actividad caspasa 8 en células APPswe (Test de Newman-Keuls; **p<0,001, *p<0,01 respecto de células tratadas con H₂O₂; ΔΔp<0,001, Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

Se ha descrito que la transfección de líneas neuronales con el gen que codifica para la APP portadora de la doble mutación sueca proporciona a las células APP^{swe} una expresión moderada de APP humana, que da lugar a la producción de niveles de β A “fisiológicos” que se aproximan a la situación *in vivo* (Marques, Keil *et al.*, 2003). Sin embargo, la expresión de APP con la doble mutación sueca desencadena en las células una mayor vulnerabilidad a la inducción de muerte celular, tras la exposición a un estrés oxidativo adicional, que la expresión de la forma silvestre (*wild-type*, wt) (Eckert, Steiner *et al.*, 2001), demostrándose que la capacidad de activación de caspasa 3 es significativamente mayor en células APP^{swe} en comparación con células APP^{wt} (Marques, Keil *et al.*, 2003).

El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que se ha utilizado ampliamente como inductor de estrés oxidativo en modelos *in vitro* ya que es altamente soluble, difusible y capaz de atravesar las membranas celulares, induciendo la muerte por apoptosis en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y a través de la activación de caspasa 3 (Sebastia, Pertusa *et al.*, 2006). Este mecanismo de apoptosis se ha puesto de manifiesto en nuestros experimentos, mediante los que hemos constatado una activación significativa de caspasa 3 tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno, respecto de las células que no son sometidas a estrés. La activación de caspasa 9, que también hemos observado, indica que las células expuestas al peróxido de hidrógeno han sufrido una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial, evento desencadenante de la vía de intrínseca de apoptosis (McIlwain, Berger *et al.*, 2013).

En células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, el estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno produce un incremento en los niveles intracelulares de péptido β A y un descenso significativo en los niveles de la proteína APP y de su fragmento carboxi-terminal generado por escisión β (Misonou, Morishima-Kawashima *et al.*, 2000). Examinando la implicación de la caspasa 8, caspasa iniciadora que se relaciona principalmente con la vía extrínseca de apoptosis, hemos observado que no se activa en estas células en respuesta a la señal de estrés oxidativo, quizás porque los mecanismos de muerte celular están mediados sobre todo por el péptido β A acumulado intracelularmente más que por el péptido β A secretado extracelularmente. Nuestra observación es congruente con estudios de apoptosis llevados a cabo en cultivos celulares de neuroblastoma, a partir de los que se ha podido diferenciar el mecanismo de muerte por oligómeros del mecanismo de muerte por agregados fibrilares. Concretamente, se ha puesto de manifiesto que las células tratadas con agregados muestran una elevada activación de caspasa 8 y una activación insignificante de caspasa 9 con respecto a las células control, mientras que las células

tratadas con oligómeros muestran una leve activación de caspasa 8 y una activación mayor de caspasa 9. Estos hallazgos sugieren que los agregados extracelulares β A podrían imitar las placas extracelulares que “perturban” la membrana celular y activar directa o indirectamente un receptor de muerte, induciendo una vía extrínseca de apoptosis a través de la activación de caspasa 8. Por el contrario, los oligómeros β A podrían imitar los oligómeros difusibles que atraviesan la membrana neuronal, y penetrando en el ambiente intracelular podrían promover mecanismos celulares que conducen a la activación de la vía intrínseca y a la activación de caspasa 9 (Picone, Carrotta *et al.*, 2009). Además, otros autores ya habían propuesto anteriormente que el péptido β A no desempeña un papel significativo en la escisión de la pro-caspasa 8, demostrando la ausencia de activación de dicha caspasa mediada por β -amiloide mediante imágenes *in vivo* de células individuales de neuroblastoma (Onuki, Nagasaki *et al.*, 2002).

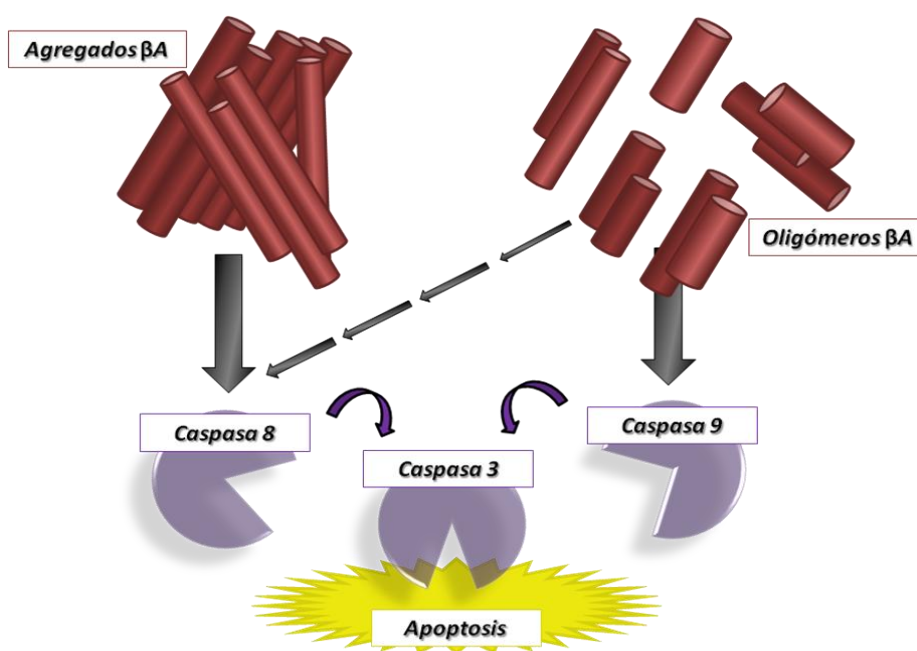


Figura 35. Diferentes acciones de oligómeros y de agregados fibrilares en la activación de la apoptosis de células de neuroblastoma. En la membrana celular, los agregados pueden activar la vía apoptótica extrínseca (caspasa 8) y, posteriormente, la señalización mediada por caspasa 3. Los oligómeros, aunque pueden inducir la apoptosis mediante la activación de caspasa 8, lo hacen principalmente mediante la liberación de citocromo c y la activación de caspasa 9.

La evaluación de los flavonoides en estudio demuestra que éstos confieren neuroprotección a la línea de neuroblastoma SH-SY5Y que expresa la APP^{swe} y que es susceptible de sufrir apoptosis por exposición al peróxido de hidrógeno. La neuroprotección conferida por dichos flavonoides podría muy probablemente transcurrir a través de un mecanismo de modulación de caspasas o de señalización intracelular que conduce a la disminución de la expresión de las mismas, posiblemente a través de la expresión de proteínas de señalización de supervivencia celular. Concretamente, el equilibrio entre las proteínas de la familia Bcl-2 pro-apoptóticas (Bad, Bax y Bak) y anti-apoptóticas (Bcl-XL y Bcl-2) es un determinante clave de la apoptosis. La relación Bcl-2/Bax se considera un “interruptor” que activa o inhibe la vía de muerte celular mitocondrial mediante la regulación de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (Qu, Zhou *et al.*, 2012), que condiciona la liberación de citocromo c, esencial en los eventos que conducen a la cascada de activación de caspasas. Además, la reducción significativa de la actividad de caspasa 9 en células pretratadas con los respectivos flavonoides indica que éstos influyen en la expresión de caspasa 9 o están directamente involucrados en su inactivación. Dichos compuestos también afectan a la actividad de caspasa 3 ya que la caspasa 9 está implicada en su activación. Hay que añadir, finalmente, que es muy posible que las células APP^{swe} posean la capacidad de regular positivamente la expresión de enzimas antioxidantes como consecuencia del pretratamiento con los respectivos flavonoides y, posteriormente, de la exposición al peróxido de hidrógeno, como se ha observado cuando estas células han sido tratadas con quercetina o su heterósido rutina (Martin-Aragon, Jimenez-Aliaga *et al.*, 2016). En definitiva, el presente estudio ha demostrado que los cuatro flavonoides atenúan la apoptosis de células APP^{swe} mediante la reducción de la actividad de caspasa 3 y caspasa 9.

Dado que la fosforilación anormal de APP es una característica patológica de la EA, resulta interesante destacar aquí la influencia de la doble mutación sueca de APP (APP^{swe}) en el estrés oxidativo que conduce a la señalización mediante quinasas activadas por mitógenos. En la neurona, los estímulos de estrés desencadenan la activación de JNK casi exclusivamente en el cuerpo celular, fosforilando tanto dianas intranucleares (por ejemplo, c-Jun) como citoplasmáticas, incluyendo la APP. Se ha descrito que la activación de JNK y c-Jun es mucho más prominente en células APP^{swe} que en células APP^{wt}. Esto sugiere que la activación de la vía JNK podría depender de los niveles intracelulares de β A (Marques, Keil *et al.*, 2003) e incluso de los niveles de sAPP α , pues se ha descrito que este fragmento es capaz de proteger a las neuronas del estrés proteasomal y de la activación de caspasas

efectoras mediante la inhibición de la vía de señalización JNK pro-apoptótica (Copanaki, Chang *et al.*, 2010). Por tanto, compuestos que promueven el procesamiento no amiloidogénico de APP en modelos de EA, como el flavonoide baicaleína, contribuyen al aumento de los niveles de sAPP α y, por tanto, a la atenuación de la activación JNK (Zhang, Obregon *et al.*, 2013). Debido al hecho de que las proteínas de la familia Bcl-2 son inactivadas a través de la fosforilación por JNK, se hace evidente que la activación de JNK altera la función mitocondrial, conduciendo a la muerte celular (Muresan y Muresan, 2005).

En modelos neuronales de estrés por peróxido de hidrógeno se ha demostrado una reducción de la actividad caspasa y del fenómeno de apoptosis mediante la inhibición de la activación de las vías de las quinasas activadas por mitógenos JNK/ERK por diversos flavonoides, como baicaleína (Moslehi, Meshkini *et al.*, 2012), didimina (Morelli, Piscioneri *et al.*, 2014), 3',4',7-trihidroxiflavona (Kwon, Hong *et al.*, 2015) y genisteína (Qian, Cao *et al.*, 2015), entre otros.

Los flavonoides que hemos estudiado en el modelo celular de APPswe han demostrado acciones inhibitoras de la vía de señalización de quinasas activadas por mitógenos, aunque en modelos de estrés no neuronales. Por ejemplo, morina ejerce efectos anti-apoptóticos en un modelo celular de estrés por radiación ionizante mediante la disminución de la activación de JNK (Zhang, Kang *et al.*, 2011), e isoquercitrina es capaz de reducir la activación de JNK en modelos celulares de inflamación (Lee, Park *et al.*, 2008). En el mecanismo de inhibición de la adhesión de monocitos a células endoteliales, se ha puesto de manifiesto que hesperidina no bloquea la fosforilación de ERK/JNK inducida por concentraciones elevadas de glucosa, sin embargo, inhibe completamente la fosforilación de p38 MAPK en células endoteliales (Kim, Kim *et al.*, 2011). Y en cuanto a hesperetina (genina de la hesperidina, hesperetina 7-rutinósido), se ha probado que posee capacidad para atenuar la fosforilación de JNK de cardiomiocitos en apoptosis (Yang, Liu *et al.*, 2014).

Puesto que se ha demostrado que la vía JNK/c-Jun se encuentra activada en neuronas de cerebros EA y que interviene de forma prominente en la muerte neuronal por oligómeros de β A (Akhter, Sanphui *et al.*, 2015), las acciones inhibitorias sobre esta vía de señalización que ejercen los flavonoides en estudio en otros modelos de estrés merecen ser destacadas ya que podrían contribuir en la atenuación de la activación de caspasas en nuestro modelo celular de neuroblastoma APPswe.

2.6. Oxitosis celular inducida por glutamato

En el desarrollo de este modelo de neurotoxicidad y para el ensayo de los compuestos en estudio se establecieron 16 grupos experimentales, como se indica a continuación:

- a) Células sin tratamiento
- b) Células tratadas con glutamato 2 mM
 - b.1) Células tratadas exclusivamente con glutamato 2 mM (control negativo)
 - b.2) Células tratadas con morina + glutamato 2 mM
 - b.3) Células tratadas con isoquercitrina + glutamato 2 mM
 - b.4) Células tratadas con hesperidina + glutamato 2 mM
 - b.5) Células tratadas con neohesperidina + glutamato 2 mM
- c) Células tratadas con glutamato 5 mM
 - c.1) Células tratadas exclusivamente con glutamato 5 mM (control negativo)
 - c.2) Células tratadas con morina + glutamato 5 mM
 - c.3) Células tratadas con isoquercitrina + glutamato 5 mM
 - c.4) Células tratadas con hesperidina + glutamato 5 mM
 - c.5) Células tratadas con neohesperidina + glutamato 5 mM
- d) Células tratadas con glutamato 10 mM
 - d.1) Células tratadas exclusivamente con glutamato 10 mM (control negativo)
 - d.2) Células tratadas con morina + glutamato 10 mM
 - d.3) Células tratadas con isoquercitrina + glutamato 10 mM
 - d.4) Células tratadas con hesperidina + glutamato 10 mM
 - d.5) Células tratadas con neohesperidina + glutamato 10 mM

En una primera evaluación del efecto neuroprotector de los flavonoides en estudio, los cuatro compuestos se probaron a la concentración de 50 μ M. La exposición de las células al glutamato (2, 5 y 10 mM, respectivamente) durante 24 horas produjo un descenso drástico de la viabilidad celular, entre el 70-90%, respecto de las células control (figura 36). El tratamiento de las células con morina e isoquercitrina, respectivamente, previno de forma

significativa ($p < 0,001$) el descenso acusado de la viabilidad celular. El efecto protector fue superior con isoquercitrina, con la que se alcanzaron porcentajes de viabilidad del 100% para tratamientos de glutamato de 2 y 5 mM, y superiores al 80% con el tratamiento de glutamato de 10 mM. En cuanto a morina, el efecto protector fue marcadamente dependiente de la concentración de glutamato; y así la viabilidad celular alcanzó valores superiores al 80 y al 60% y próximos al 40% para concentraciones de glutamato de 2, 5 y 10 mM, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento de las células con hesperidina o neohesperidina no ejerció ninguna influencia positiva en el descenso acentuado de la viabilidad celular producida por el glutamato (figura 36).

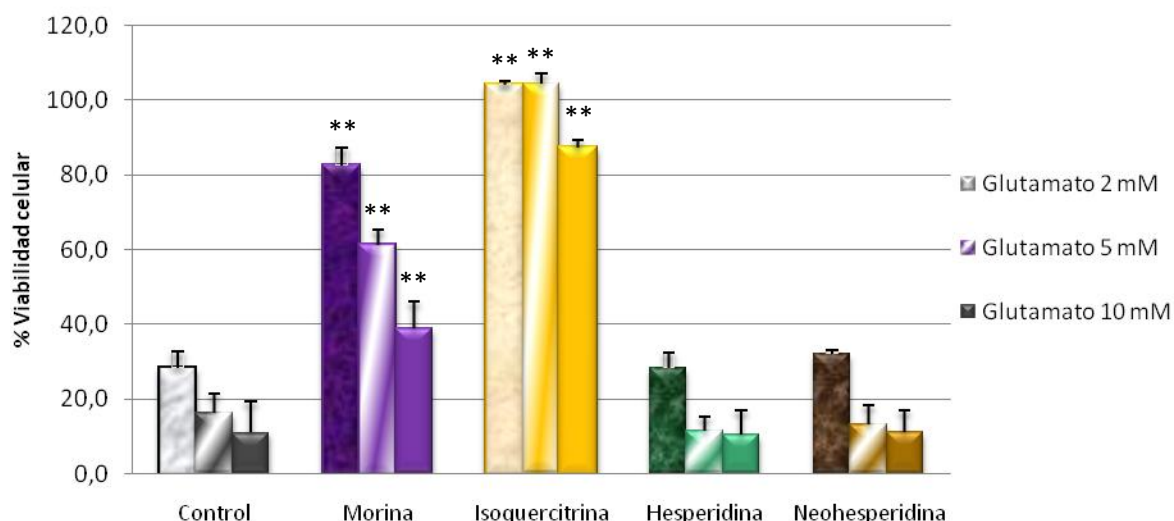
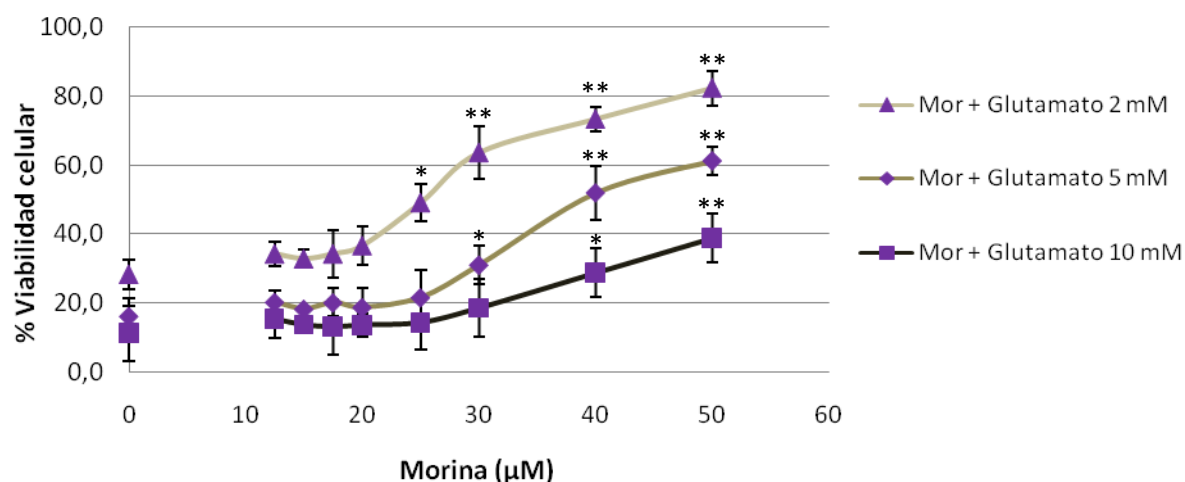


Figura 36. Protección de los flavonoides frente a la toxicidad por glutamato (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con glutamato 2, 5 y 10 mM, respectivamente).

A continuación, en una segunda evaluación, se ensayó la influencia de ambos flavonoles, morina e isoquercitrina, sobre la viabilidad celular en el rango de concentración 10-50 μ M, para las tres concentraciones de glutamato. En ambos casos se aprecia un efecto concentración-dependiente en la viabilidad celular; entre 25 y 50 μ M para morina, y entre 10 y 25 μ M para isoquercitrina (figuras 37A y B).

A



B

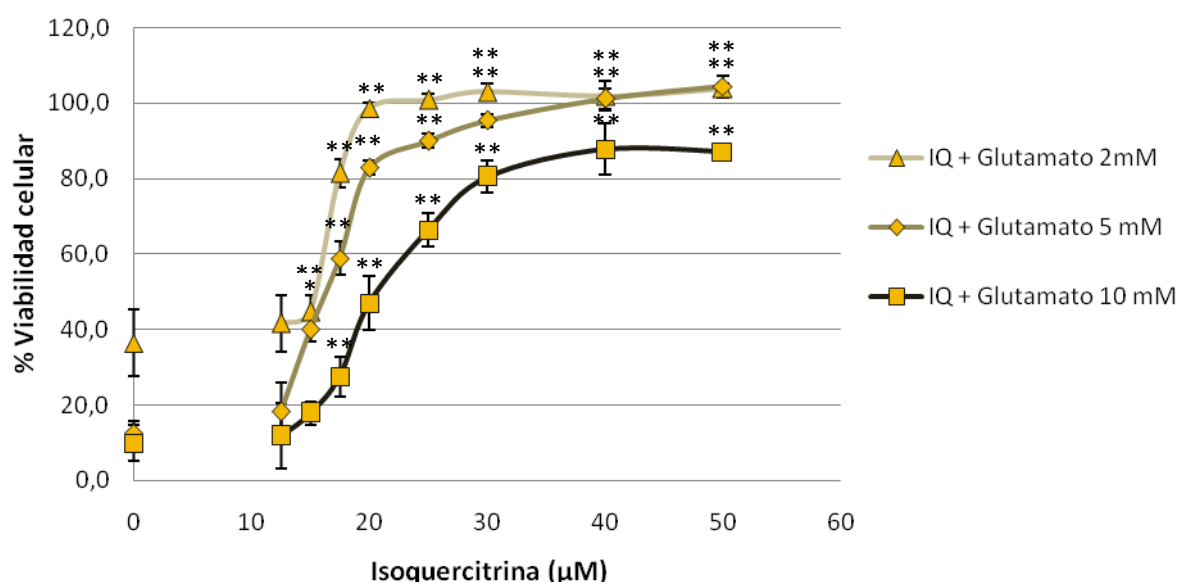


Figura 37. Protección de los flavonoides morina (A) e isoquercitrina (B) frente a la toxicidad por glutamato (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con glutamato 2, 5 y 10 mM, respectivamente).

El hipocampo es un área esencial para la función de la memoria que se ve afectada significativamente en la EA. Dado que las neuronas del hipocampo se encuentran entre las más vulnerables al estrés oxidativo, su protección frente al mismo constituye una estrategia terapéutica de la EA. El fenómeno de oxitosis comparte numerosas características fisiopatológicas y morfológicas con la muerte neuronal observada en la EA. Por ejemplo, la depleción de las reservas intracelulares de GSH es un fenómeno común en el

envejecimiento normal, que se ve incluso incrementado en las enfermedades asociadas a la edad. Además, en este modelo se genera estrés oxidativo de algún modo similar a lo que ocurre en condiciones fisiopatológicas, a diferencia de los modelos en los que se induce la acumulación de ERO a través de oxidantes externos (Prior, Chiruta *et al.*, 2014).

Por ello, en la evaluación del potencial neuroprotector de los flavonoides en estudio, hemos considerado conveniente la utilización de un modelo celular hipocampal que, al no expresar receptores ionotrópicos de glutamato, sufre un proceso de muerte celular exclusivamente iniciado por un daño oxidativo intracelular. Los estudios de Schubert y colaboradores (Tan, Schubert *et al.*, 2001) prueban que los compuestos que protegen las células HT22 de la toxicidad del glutamato son también eficaces protectores de neuronas corticales primarias de rata frente a la toxicidad por dicho aminoácido, demostrando así que la respuesta de las neuronas HT22 al estrés oxidativo es típica de las neuronas corticales.

En nuestros ensayos, hemos establecido un periodo prolongado de tratamiento, de 24 horas, con concentraciones elevadas de glutamato, atendiendo al mecanismo de toxicidad de este aminoácido en la línea celular HT22. El mecanismo de toxicidad está basado en la inhibición del transporte de cistina (dímero de cisteína) debido a un exceso de glutamato extracelular (por adición exógena al medio de cultivo), de forma que se reducen los niveles intracelulares de cisteína, precursor y factor limitante en la biosíntesis del glutatión (Murphy, Miyamoto *et al.*, 1989). La depleción de glutatión reducido (GSH) conduce a la muerte neuronal ya que, además de ser el principal antioxidante endógeno, también participa en la síntesis y reparación del ADN. No obstante, la pérdida de GSH en células HT22 hasta del 85% del nivel de las células control desencadena un incremento de ERO de sólo cinco a diez veces, si bien una mayor pérdida de GSH puede estimular la mitocondria para llegar a producir un aumento en ERO de hasta cien veces, lo que conduce a la elevación del Ca^{2+} citosólico que precede a la muerte celular (Tan, Sagara *et al.*, 1998).

En este paradigma experimental de lesión neuronal se ha demostrado que las actividades de enzimas antioxidantes (SOD, GR, GPx y CAT) descienden de forma significativa y que la reducción de la acumulación de ERO por antioxidantes previene la muerte celular (Jeong, Hwang *et al.*, 2014), confirmando que la protección frente a oxitosis se puede conseguir principalmente impidiendo la cascada oxidativa que origina el exceso de glutamato en tres puntos diferentes: previniendo la disminución de GSH, bloqueando la producción de ERO e inhibiendo el aumento intracelular de Ca^{2+} (Tan, Schubert *et al.*, 2001).

Los trabajos de Química Médica de Schubert y colaboradores (Ishige, Schubert *et al.*, 2001), dirigidos a la selección de compuestos de origen natural con el fin de identificar candidatos en la prevención de la muerte neuronal, nos sirven aquí de referencia para hacer un análisis de la influencia de la estructura de nuestros flavonoides en los niveles de GSH, de ERO y del flujo de Ca^{2+} . Además, estudios anteriores de nuestro grupo con los flavonoides quercetina y su heterósido rutina, constituyen un precedente fundamental en los mecanismos de protección neuronal basados en el incremento del potencial redox (Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011).

En primer lugar, tres parecen ser los determinantes estructurales necesarios para la protección frente al glutamato: la presencia de grupo hidroxilo en posición C3, un anillo C insaturado, y la hidrofobicidad de la molécula (Ishige, Schubert *et al.*, 2001). Sorprendentemente, el número de grupos hidroxilo en un flavonoide no se correlaciona con el efecto protector, pero la insaturación del anillo C en un flavonoide es esencial para la protección frente a la toxicidad por glutamato. Isoquercitrina y morina poseen en su estructura tanto el grupo hidroxilo en posición C3 como el anillo C insaturado.

En general, cuanto más hidrófobo es un flavonoide mayor protección presenta frente a la toxicidad por glutamato. Por tanto, la disminución de la hidrofobicidad por glicosilación (isoquercitrina, respecto de quercetina), polihidroxilación o ionización disminuye el efecto protector respecto al compuesto parental. La presencia de grupo hidroxilo en C2' también disminuye la hidrofobicidad porque favorece la ionización de la molécula (Agrawal y Schneider, 1983), resultando en una disminución de la eficacia, como se aprecia en morina en relación a isoquercitrina.

Algunos flavonoides, como fisetina y quercetina (genina de isoquercitrina), pueden ejercer una modulación directa del metabolismo de GSH, manteniendo sus niveles en presencia de glutamato e incluso aumentarlos (Ishige, Schubert *et al.*, 2001). Este aumento de los niveles basales de GSH puede ser producido por una regulación positiva de la enzima limitante de la velocidad de síntesis del GSH, la γ -glutamilcisteín sintasa (Sagara, Dargusch *et al.*, 1998), como se ha demostrado por ejemplo para quercetina, en cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo (Arredondo, Echeverry *et al.*, 2010). Nuestro grupo ha puesto de manifiesto un aumento del GSH intracelular y del cociente GSH/GSSG en células APPswe tratadas con quercetina y rutina, respectivamente (Jimenez-Aliaga, Bermejo-Bescos *et al.*, 2011). Respecto a isoquercitrina, otros investigadores han descrito que aumenta los niveles de GSH tras el descenso producido en los mismos como consecuencia del estrés oxidativo

inducido por peróxido de hidrógeno en células ganglionares de retina (Jung, Kim *et al.*, 2010).

Por otro lado, también se han descrito flavonoles capaces de bloquear los canales de Ca^{2+} dependientes de GMPc, inhibiendo la entrada de Ca^{2+} (Tan, Schubert *et al.*, 2001). En otros modelos celulares, morina ha demostrado capacidad de atenuar la sobrecarga intracelular de Ca^{2+} posterior a la activación de receptores AMPA, mecanismo que contribuye a sus propiedades protectoras en oligodendrocitos y neuronas corticales (Ibarretxe, Sanchez-Gomez *et al.*, 2006). Isoquercitrina también posee capacidad de reducir significativamente la concentración de Ca^{2+} intracelular inducida por reperusión tras privación de oxígeno y glucosa en neuronas corticales de rata en cultivo primario (Wang, Li *et al.*, 2013).

La muerte celular por oxitosis está modulada, asimismo, por factores neurotróficos y por la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGLURs) (Schubert, Kimura *et al.*, 1992, Sagara y Schubert, 1998). Existen numerosas evidencias de que las quinasas MAPK/ERK (MEK) están específicamente involucradas en la lesión neuronal oxidativa. La activación de ERK, aunque frecuentemente se encuentra involucrada en la supervivencia y/o proliferación neuronal, también está asociada con la muerte neuronal que se produce en respuesta a determinados insultos dependiendo del tipo celular y/o estímulo (Murray, Alessandrini *et al.*, 1998, Alessandrini, Namura *et al.*, 1999). Así, la ruta de señalización ERK1/2 está involucrada en los efectos protectores derivados de la activación de los receptores mGLURs del subtipo I (grupo I) durante la fase inicial en la que se restauran los niveles de GSH a los niveles basales, sin embargo también contribuye a la muerte en la fase tardía de la exposición al glutamato (Luo y DeFranco, 2006). Últimamente se ha descrito que el glutamato induce la fosforilación temprana (< 1 hora) de ERK1/2 independientemente de la concentración, mientras que una concentración elevada de dicho aminoácido desencadena la persistencia de la fosforilación de ERK1/2 (16-24 horas) que es mediada por receptores metabotrópicos mGLURs del subtipo 5 (grupo I) y cuyo bloqueo farmacológico ha mostrado efectos neuroprotectores (Sato, Yamanaka *et al.*, 2016). Por tanto, cualquier propuesta de intervención farmacológica dirigida a la vía ERK1/2 debe tener en cuenta los efectos divergentes de esta vía de señalización.

En el modelo de oxitosis por glutamato, determinados flavonoides han mostrado una inhibición persistente de la fosforilación de ERK1/2 protegiendo significativamente a las células HT22 frente al estrés oxidativo inducido (Luo y DeFranco, 2006, Yang, Park *et al.*, 2013, Jeong, Hwang *et al.*, 2014). Por ejemplo, quercetina no sólo suprime la fosforilación de MAPKs en la oxitosis por glutamato en células HT22, sino que reduce la sobreproducción intracelular de ERO y el flujo intracelular de Ca^{2+} , reduciendo la expresión de calpaína y la escisión de espectrina, la alteración del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$), la activación de proteínas pro-apoptóticas Bid y Bax y la liberación de citocromo c en respuesta al estrés oxidativo inducido por glutamato (Yang, Kim *et al.*, 2013). Morina e isoquercitrina también presentan actividad inhibitoria de MAPK quinasas que, aunque se han descrito en modelos celulares de inflamación, podrían intervenir en la prevención de la neurotoxicidad de células HT22 inducida por glutamato (Li, Zhang *et al.*, 2016, Wang, Guo *et al.*, 2016).

En el presente trabajo, hemos puesto de manifiesto que morina e isoquercitrina promueven la supervivencia neuronal en la línea HT22, como lo demuestran los valores de viabilidad celular respecto de las células tratadas exclusivamente con glutamato a diferentes concentraciones. Tras un periodo de 24 horas de exposición al glutamato, las células que no reciben tratamiento con flavonoide se encuentran en la fase terminal irreversible de muerte celular. Ya que la depleción de GSH y la elevación de los niveles de ERO no representan la fase terminal irreversible de la muerte celular en la línea HT22 sometida a estrés oxidativo, los efectos protectores de morina o isoquercitrina podrían estar asociados, no sólo con una restauración de los niveles de GSH o la reducción en las ERO elevadas, sino con la inhibición tardía o persistente de la vía de señalización ERK1/2.

2.7. Isquemia inducida por ácido yodoacético en la línea celular hipocampal HT22

El proceso de neurotoxicidad asociado a isquemia-reperfusión se reprodujo experimentalmente mediante la inducción de isquemia química en la línea celular hipocampal HT22 empleando el ácido yodoacético (IAA, *iodoacetic acid*). El IAA es un potente agente alquilante que se une al sitio activo de la enzima de la glicolisis gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) inhibiendo su actividad catalítica de forma irreversible (Prior, Chiruta *et al.*, 2014).

En el desarrollo de este modelo de neurotoxicidad y para el ensayo de los compuestos en estudio se establecieron los grupos experimentales siguientes:

- a) Células sin tratamiento
- b) Células tratadas con IAA 15 μ M
 - b.1) Células tratadas exclusivamente con IAA 15 μ M (control negativo)
 - b.2) Células tratadas con morina + IAA 15 μ M
 - b.3) Células tratadas con isoquercitrina + IAA 15 μ M
 - b.4) Células tratadas con hesperidina + IAA 15 μ M
 - b.5) Células tratadas con neohesperidina + IAA 15 μ M
- c) Células tratadas con IAA 20 μ M
 - c.1) Células tratadas exclusivamente con IAA 20 μ M (control negativo)
 - c.2) Células tratadas con morina + IAA 20 μ M
 - c.3) Células tratadas con isoquercitrina + IAA 20 μ M
 - c.4) Células tratadas con hesperidina + IAA 20 μ M
 - c.5) Células tratadas con neohesperidina + IAA 20 μ M
- d) Células tratadas con IAA 30 μ M
 - d.1) Células tratadas exclusivamente con IAA 30 μ M (control negativo)
 - d.2) Células tratadas con morina + IAA 30 μ M
 - d.3) Células tratadas con isoquercitrina + IAA 30 μ M
 - d.4) Células tratadas con hesperidina + IAA 30 μ M
 - d.5) Células tratadas con neohesperidina + IAA 30 μ M

En una primera evaluación del efecto neuroprotector de los flavonoides en estudio, los cuatro compuestos se probaron a la concentración de 50 μ M. La exposición de las células al IAA durante 2 horas produjo un descenso drástico de la viabilidad celular, concentración dependiente, oscilando entre el 50-90% respecto de las células control (figura 38). El tratamiento de las células con morina e isoquercitrina, respectivamente, previno de forma significativa ($p < 0,001$) el descenso acusado de la viabilidad celular para tratamientos con IAA a la menor e intermedia concentración (15 y 20 μ M). Con ambos flavonoles se alcanzaron porcentajes de viabilidad celular superiores al 80% para la menor concentración de IAA (15 μ M), lo que supone un incremento de aproximadamente el 30% con respecto a las células expuestas exclusivamente al IAA. Asimismo, para tratamientos con IAA a la mayor concentración (30 μ M), morina e isoquercitrina aumentaron significativamente la viabilidad celular, suponiendo un incremento de hasta casi un 50% en el caso de morina. El tratamiento de las células con neohesperidina no condujo a ningún cambio notable en la viabilidad, aunque se observó un incremento muy leve en la misma que resultó ser significativo ($p < 0,01$) para las células tratadas con la menor concentración de IAA. En último lugar, no se observó ninguna modificación de la viabilidad celular con la exposición de las células a hesperidina, en relación al tratamiento exclusivo con IAA.

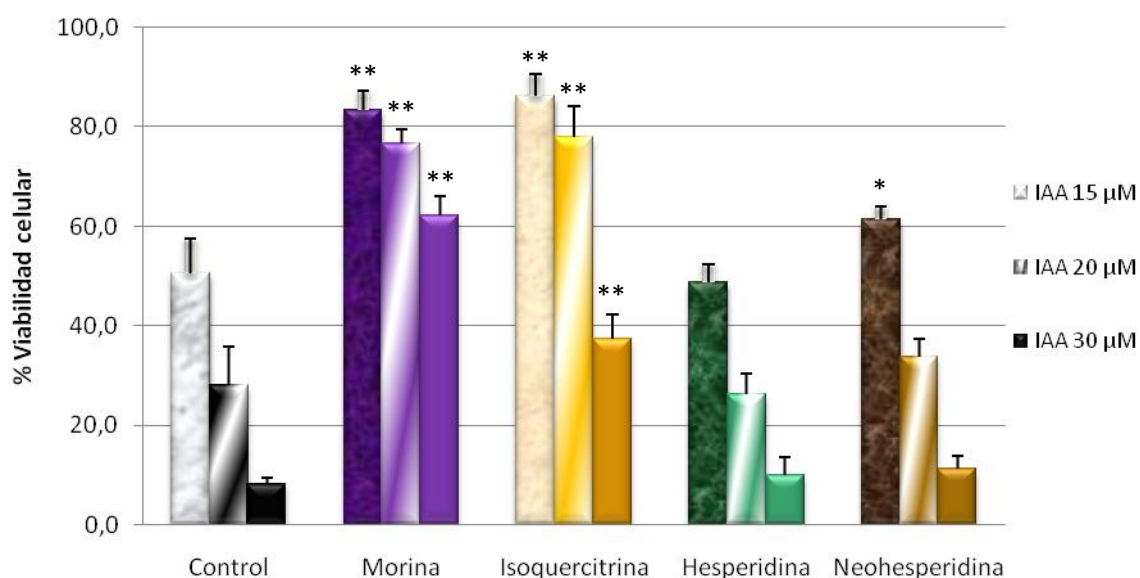


Figura 38. Protección de los flavonoides frente a la isquemia inducida con IAA (2 horas) en células HT22 (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA, 15, 20 y 30 μ M, respectivamente).

Posteriormente, en una segunda evaluación se estudió el efecto de los flavonoles, morina e isoquercitrina, sobre la viabilidad celular en un rango de concentración de 10-50 μM para las tres concentraciones de IAA. En ambos casos se aprecia un efecto protector concentración-dependiente sobre la viabilidad celular en el rango de concentración de flavonoide de 0-20 μM aproximadamente (figuras 39A y B).

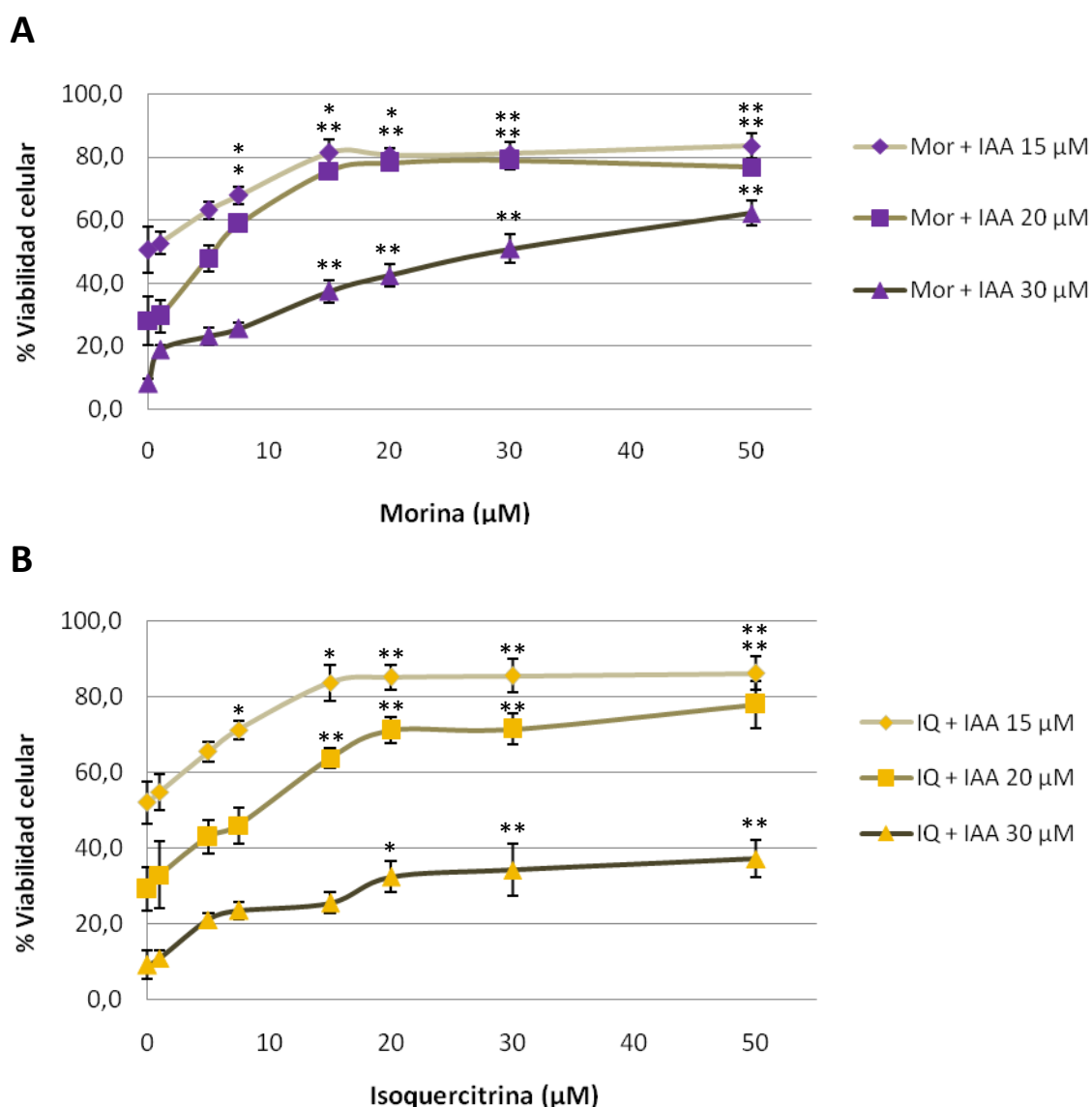


Figura 39. Protección de morina (A) e isoquercitrina (B) frente a la isquemia inducida por IAA (2 horas) en células HT22 (Test de Newman-Keuls: $**p < 0,001$; $*p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA, 15, 20 y 30 μM , respectivamente).

En los tratamientos con los flavonoides se determinó cuándo se requería que éstos estuvieran presentes, con respecto al tratamiento con IAA, para proporcionar protección y prevenir la muerte celular inducida por IAA. La presencia de morina o isoquercitrina durante y después del tratamiento con IAA permitió observar un efecto protector significativo, si bien estábamos particularmente interesados en comprobar si los flavonoides en estudio proporcionaban o no protección por adición al medio de cultivo tras la eliminación del IAA. Cuando estos compuestos estuvieron presentes sólo durante el tratamiento con IAA o bien tras la remoción del IAA se observó una protección considerablemente menor (datos no mostrados). Por tanto, se ha puesto de manifiesto que el daño neuronal causado durante la isquemia disminuye notablemente por la presencia continua del flavonol en el medio de cultivo durante el periodo completo de 24 horas, aunque se ha descrito que ciertos antioxidantes pueden proteger las neuronas cuando están presentes exclusivamente antes o después del insulto (Maher, Salgado *et al.*, 2007).

En este modelo de isquemia hemos comprobado, además, que la lesión de las células es notablemente mayor durante el período post-isquemia que durante el período de insulto, sugiriendo que el mecanismo subyacente a la citotoxicidad inducida por IAA durante el período post-isquemia probablemente difiera del que subyace a la lesión durante el período de isquemia inicial. Un motivo podría ser que durante el período de isquemia se generan ERO cuya acción tóxica podría progresar durante el período post-isquémico (Mehta, Manhas *et al.*, 2007, Nakka, Gusain *et al.*, 2008).

El estudio de nuestros flavonoides en este modelo de neurotoxicidad, a la vista de sus propiedades antioxidantes en primera instancia, parece perfectamente razonable por las propias características del paradigma experimental. Esto es, la generación de ERO se ha puesto de manifiesto en modelos neuronales de inhibición metabólica conducentes a isquemia química por exposición a IAA, y una proporción significativa de la lesión producida en las células por IAA puede ser abolida por la presencia de diversos antioxidantes. Por ejemplo, se ha demostrado el excepcional efecto protector de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en cultivos neuronales durante el período post-isquemia, lo que sugiere que una fracción importante del daño neuronal que se desarrolla en este período tiene su origen en la generación continua de anión superóxido (Sperling, Bromberg *et al.*, 2003).

Por tanto, la observación obtenida con nuestros flavonoides en este modelo, por la que ejercen un efecto protector cuando se adicionan desde el inicio del insulto isquémico y se mantienen hasta el final del periodo post-isquemia considerado (24 horas), puede encontrar su fundamento en la inhibición de la generación de ERO durante el período de isquemia así como en el período post-isquémico.

Los estudios epidemiológicos y la búsqueda de biomarcadores de EA muestran una clara relación entre EA e isquemia (Altunoglu, Guntas *et al.*, 2015, Fujii, Takahashi *et al.*, 2016). Además de la propia muerte celular que desencadena la isquemia *per se* y de los numerosos casos existentes de demencia post-isquémica (Ulamek-Kozioł, Pluta *et al.*, 2016), se ha descrito que los procesos isquémicos producen un importante incremento en la actividad tanto de β -secretasa como de γ -secretasa, principalmente a través de la generación de estrés oxidativo y de la activación de quinasas reguladas por estrés (Vassar, Kovacs *et al.*, 2009, Pluta, Furmaga-Jablonska *et al.*, 2013), así como de un descenso en la actividad α -secretasa y de proteasas capaces de degradar el péptido β -amiloide (por ejemplo, neprilisina) (Nalivaeva, Fisk *et al.*, 2004, Nalivaeva y Turner, 2016). Incluso se ha observado que en los procesos de isquemia-reperfusión cerebrales se acumulan formas hiperfosforiladas de Tau, frecuentemente detectadas en pacientes con EA (Fujii, Takahashi *et al.*, 2016).

Por todo ello, la isquemia cerebral se considera en la actualidad como uno de los procesos neuropatológicos fundamentales capaces de desencadenar el desarrollo de EA (Reitz y Mayeux, 2014, Ulamek-Kozioł, Pluta *et al.*, 2016). Por tanto, limitar el daño ocasionado a nivel cerebral tras un episodio de isquemia constituye una estrategia en la prevención del desarrollo de EA y otros procesos neurodegenerativos.

Las neuronas, debido a la elevada actividad de los canales transmembrana y de las bombas, poseen una elevada demanda metabólica que se cubre predominantemente por la fosforilación oxidativa utilizando como combustible la glucosa disponible del medio extracelular. Dada la limitada capacidad de almacenamiento de glucosa de las neuronas, en procesos isquémicos se produce rápidamente una depleción energética por la ausencia de glucosa en el medio, fenómeno que se puede simular experimentalmente con la inhibición irreversible de la enzima glicolítica GAPDH. Estudios previos ya han señalado la capacidad anti-isquémica de los flavonoides, aunque no es del todo conocido el mecanismo por el cual ejercen su actividad (Dajas, Rivera-Megret *et al.*, 2003, Hwang, Shih *et al.*, 2012, Lalkovicova y Danielisova, 2016).

Con el fin de estudiar el mecanismo neuroprotector de nuestros flavonoides frente a la toxicidad por IAA, basada en la alteración de la homeostasia energética, decidimos incorporar como herramienta de trabajo inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial (inhibidores OXPHOS, *oxidative phosphorylation*) al medio de cultivo celular, teniendo en cuenta que:

- Las células requieren una plasticidad metabólica para mantener la homeostasia energética según las condiciones ambientales o los procesos patológicos (Gohil, Sheth *et al.*, 2010, Lanning, Looyenga *et al.*, 2014). Y ya que éstas obtienen el ATP tanto por fosforilación oxidativa mitocondrial como por glicolisis citosólica, ambas vías deben estar perfectamente reguladas.
- La mitocondria es capaz de generar señales moleculares (mediante ERO, proteínas y mediadores lipídicos) que pueden actuar localmente o viajar a dianas distantes, como por ejemplo el núcleo. Es decir, la mitocondria funciona como un puesto avanzado de señalización mediante quinasas, desacetilasas y otras enzimas de transducción de señales (Cheng, Hou *et al.*, 2010).
- Existen evidencias suficientes de que ciertos flavonoides poseen capacidad de acumularse en la mitocondria e interferir en sus procesos (Fiorani, Guidarelli *et al.*, 2010, de Oliveira, Nabavi *et al.*, 2016).

Los inhibidores que se utilizaron fueron los siguientes:

a) Inhibidores de la transferencia electrónica

- ➔ Rotenona. Inhibidor del complejo I al impedir la unión de la ubiquinona a la NADH-ubiquinona oxidoreductasa.
- ➔ Difenilfeniliodonio (DPI). Inhibidor del complejo I mediante inhibición de enzimas NAD(P)H oxidasas.
- ➔ 2-tenoiltrifluoroacetona (TTFA). Inhibidor del complejo II.
- ➔ Antimicina A. Inhibidor del complejo III.

b) Inhibidor de la ATP sintasa o complejo V

- ➔ Oligomicina A

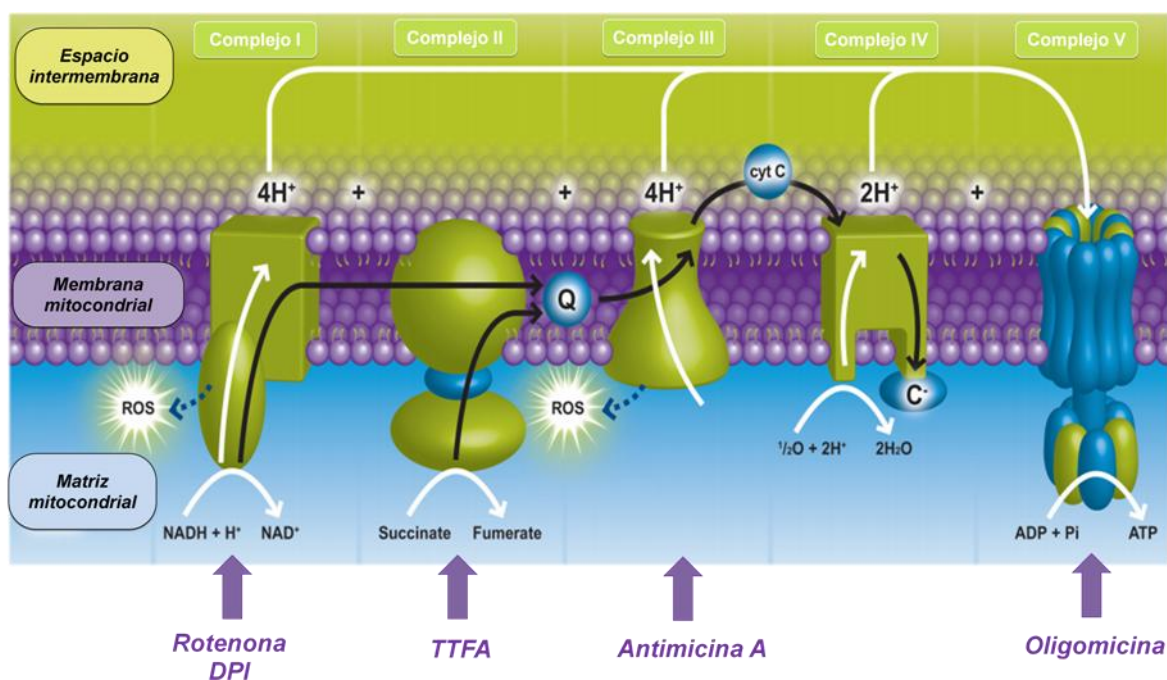


Figura 40. Esquema de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. Interacción de los inhibidores OXPHOS empleados (*Adaptación de imagen tomada de Abcam.com, 2011*).

En primer lugar se valoró el impacto de los inhibidores OXPHOS sobre la viabilidad celular. A continuación, se repitió el ensayo de ischemia estableciendo los siguientes grupos experimentales para cada inhibidor OXPHOS y flavonoide:

- Células sin tratamiento (células control)
- Células tratadas con flavonoide
- Células tratadas con inhibidor OXPHOS
- Células tratadas con IAA
- Células tratadas con flavonoide + inhibidor OXPHOS
- Células tratadas con IAA + inhibidor OXPHOS
- Células tratadas con IAA + flavonoide
- Células tratadas con IAA + flavonoide + inhibidor OXPHOS

Estos tratamientos se hicieron de manera similar a los tratamientos de los ensayos de ischemia inicialmente descritos, seleccionando concentraciones de inhibidor OXPHOS que produjeran una inhibición efectiva del complejo correspondiente (rotenona 2 μ M; DPI 100 nM; TTFA 50 μ M; antimicina A 10 nM y oligomicina A 0,5 μ M) (Hong y Pedersen, 2008, Lanning, Looyenga *et al.*, 2014).

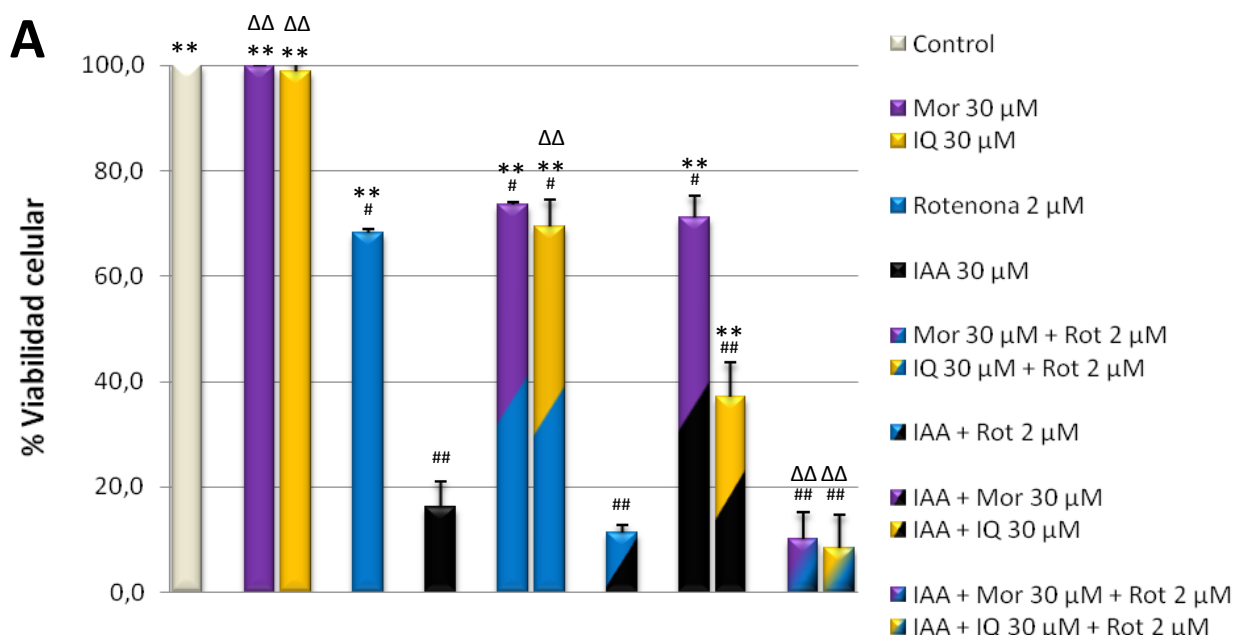


Figura 41. Efecto de morina e isoquercitrina en la viabilidad de células HT22 expuestas a IAA y/o inhibidor OXPHOS: (A) Rotenona; (B) DPI; (C) TTFA; (D) Antimicina A; (E) Oligomicina A. Test de Newman-Keuls: ### $p < 0,001$; # $p < 0,01$ respecto de células control (sin tratamiento). ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA. ΔΔ $p < 0,001$; Δ $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA más flavonoide.

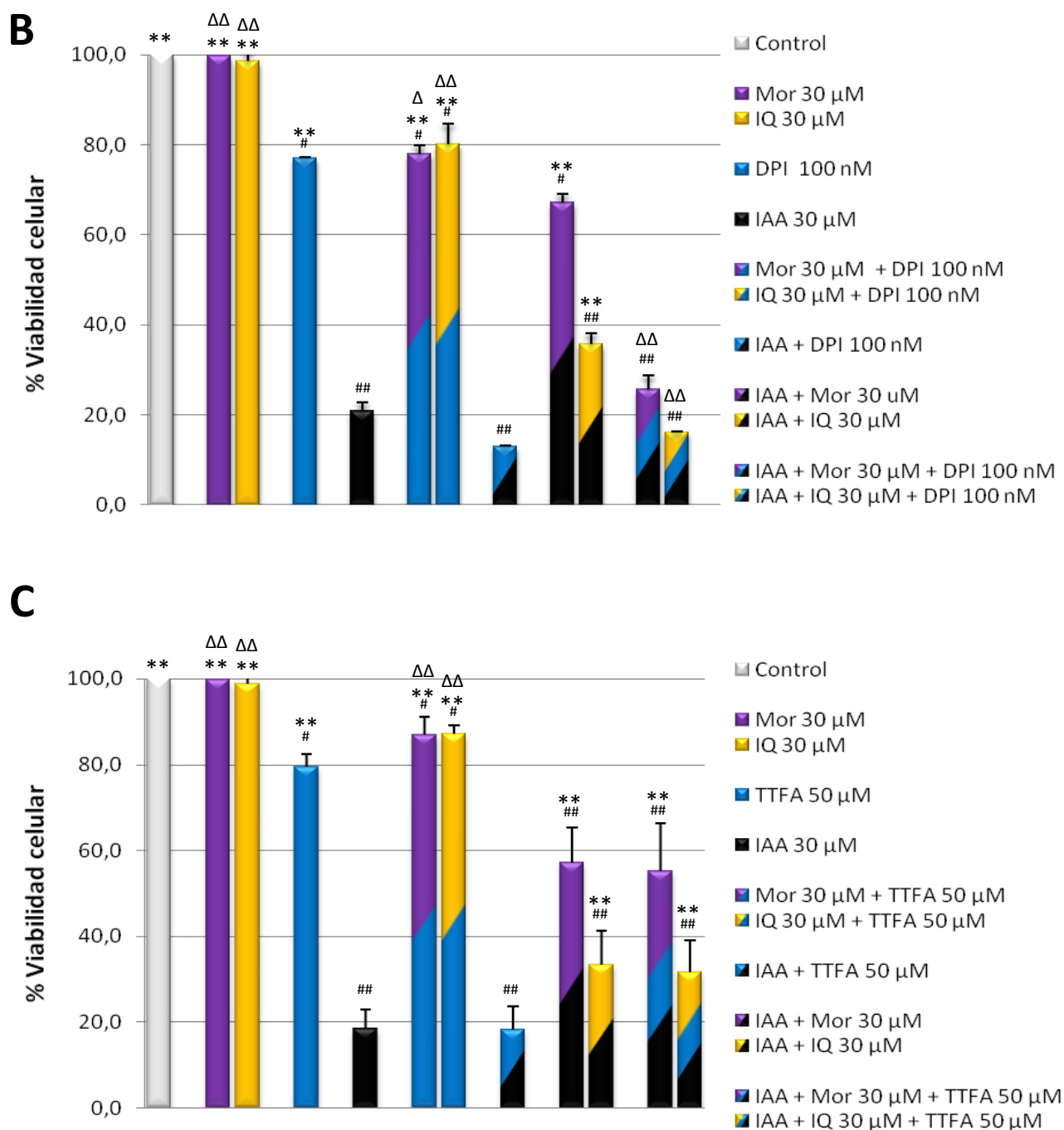


Figura 41. Efecto de morina e isoquercitrina en la viabilidad de células HT22 expuestas a IAA y/o inhibidor OXPHOS: (A) Rotenona; (B) DPI; (C) TTFA; (D) Antimicina A; (E) Oligomicina A. Test de Newman-Keuls: $^{##}$ $p < 0,001$; $^{\#}$ $p < 0,01$ respecto de células control (sin tratamiento). ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA. $^{\Delta\Delta}$ $p < 0,001$; $^{\Delta}$ $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA más flavonoide.

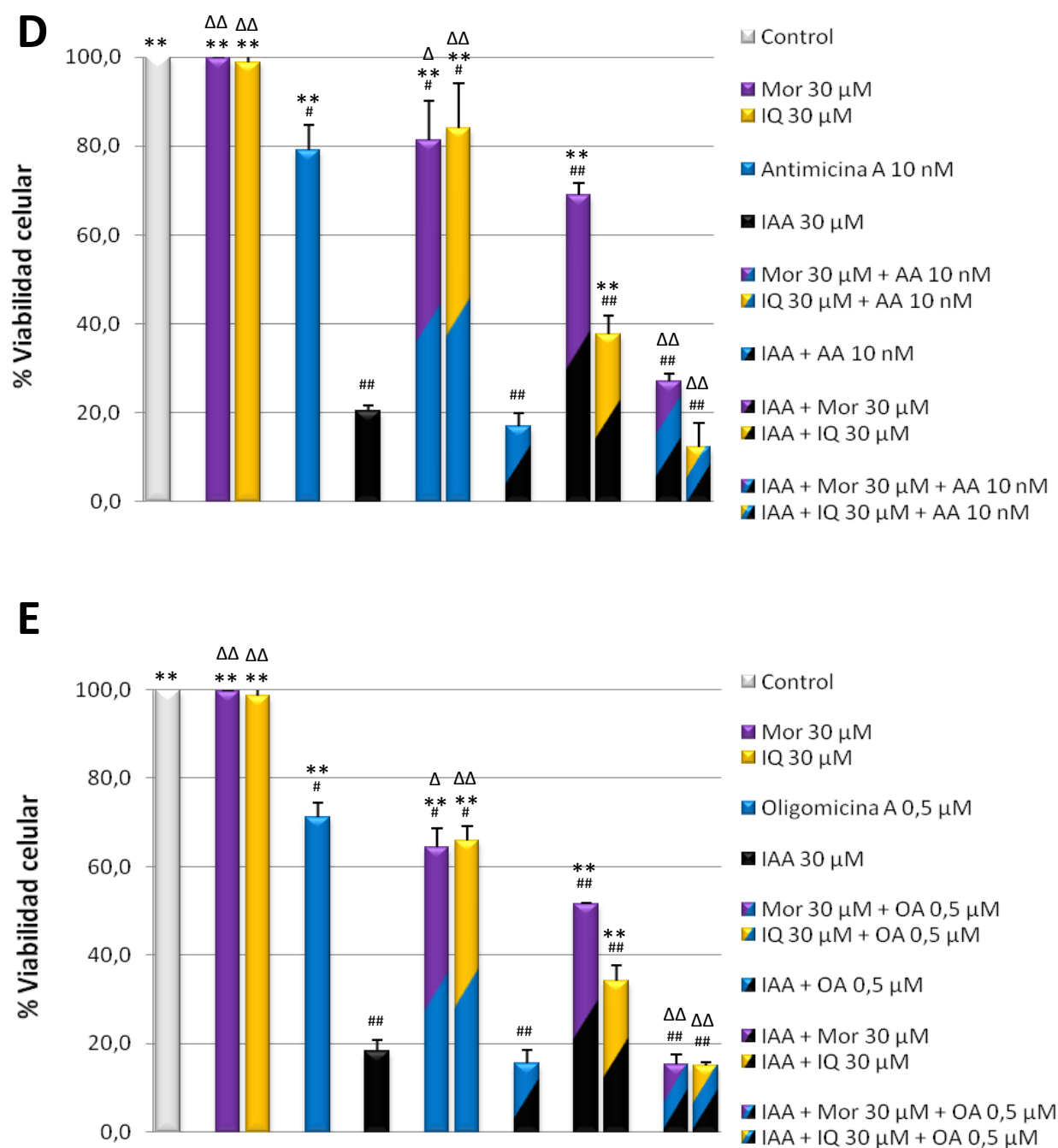


Figura 41. Efecto de morina e isoquercitrina en la viabilidad de células HT22 expuestas a IAA y/o inhibidor OXPHOS: (A) Rotenona; (B) DPI; (C) TTFA; (D) Antimicina A; (E) Oligomicina A. Test de Newman-Keuls: $^{###}p<0,001$; $^{\#}p<0,01$ respecto de células control (sin tratamiento). $^{**}p<0,001$; $^{*}p<0,01$ respecto de células tratadas con IAA. $^{\Delta\Delta}p<0,001$; $^{\Delta}p<0,01$ respecto de células tratadas con IAA más flavonoide.

A la vista de los resultados obtenidos (figura 41), cabe destacar en primer lugar que morina e isoquercitrina a la concentración de 30 μM no modifican la supervivencia de células HT22 en relación a las células control que no reciben ningún tratamiento, como ya habíamos observado previamente al comienzo del estudio a la concentración de 50 μM . Por el contrario, el tratamiento de las células exclusivamente con cualquiera de los inhibidores OXPHOS disminuye la viabilidad celular alrededor de un 20-30% con respecto a las células control, lo que no se ve modificado significativamente en los tratamientos con inhibidor OXPHOS más morina o isoquercitrina; es decir, los flavonoles no revierten la disminución de la viabilidad debida al inhibidor OXPHOS.

En esta serie de experimentos, la exposición de las células al IAA a la máxima concentración (30 μM) produjo un descenso de la supervivencia celular de alrededor el 80%. Como ya habíamos observado en los estudios iniciales, la adición del flavonolol correspondiente a las células expuestas al IAA ejerce una influencia positiva en la supervivencia, de mayor magnitud para morina que para isoquercitrina, respecto de las células tratadas con IAA. Por otro lado, la adición de un inhibidor OXPHOS a las células expuestas al IAA no ejerce ningún efecto adicional en la supervivencia, probablemente porque el IAA ya provocó una caída crítica y más o menos completa en los niveles de ATP al inhibir irreversiblemente la glicolisis.

Finalmente, la presencia de inhibidores de los complejos I (rotenona y DPI), III (antimicina A) y ATP sintasa (oligomicina A) en concomitancia con IAA hace desaparecer el efecto protector de los flavonoides, pero no así la presencia del inhibidor del complejo II (TTFA).

Asumiendo que la concentración de inhibidor OXPHOS utilizada en el ensayo ejerce una inhibición efectiva de la fosforilación oxidativa, las células teóricamente sobreviven mayoritariamente gracias a la obtención de ATP por la vía de la glicolisis. Por tanto, si inhibiendo la glicolisis el tratamiento con flavonol provoca un aumento de la viabilidad celular, y la adición del inhibidor OXPHOS provoca un descenso drástico de la misma, similar al producido por el IAA, podríamos sugerir en una primera instancia que morina e isoquercitrina ejercen un efecto favorable en la fosforilación oxidativa (Sperling, Bromberg *et al.*, 2003).

Estudios previos señalan que algunos flavonoides como la quercetina, estructuralmente relacionada con morina e isoquercitrina, son capaces de interaccionar con el complejo I (Carrasco-Pozo, Mizgier *et al.*, 2012) e incluso modificar su actividad (Karuppagounder, Madathil *et al.*, 2013, Skemiene, Liobikas *et al.*, 2015), pero no influir directamente en la

actividad de los complejos II y III (Lagoa, Graziani *et al.*, 2011). De acuerdo a la bibliografía más reciente, los flavonoides podrían favorecer el flujo electrónico mitocondrial a través del complejo I, mimetizando la acción de la coenzima Q en su papel como aceptor electrónico, para después transferir los electrones al complejo III. El carácter aceptor de electrones propuesto, por ejemplo para quercetina, podría explicarse por la presencia de un grupo carbonilo en la posición C4 de su anillo de pirona, que se asemeja al carbonilo reducible presente en la posición C4 del anillo de benzoquinona (Sandoval-Acuna, Lopez-Alarcon *et al.*, 2012, Sandoval-Acuna, Ferreira *et al.*, 2014, Skemienne, Liobikas *et al.*, 2015). Esta hipótesis igualmente explicaría que la inhibición del complejo II no interfiriera con el mecanismo protector de los flavonoides en estudio, y así observamos que ambos flavonoles provocaron un incremento de la viabilidad celular cuando las células fueron tratadas simultáneamente con IAA (glícolisis inhibida) y TTFA (inhibidor del complejo II).

En relación al efecto del inhibidor del complejo I DPI, llama la atención que la concomitancia del tratamiento con IAA, DPI y morina aumente la viabilidad celular con respecto al tratamiento con IAA y DPI. En este sentido, se ha descrito que bajo condiciones de supresión de la función del complejo mitocondrial I, ciertos flavonoides pueden dirigir parte del flujo electrónico hacia la región del citocromo c de la cadena respiratoria y facilitar la recuperación de la función de los complejos II y III. La otra parte del flujo electrónico parece dirigirse a una oxidación “libre” que puede actuar como un mecanismo adicional normalizando el potencial redox celular y disminuyendo la acidosis intracelular que se produce por inhibición del complejo I. Este efecto *energotrópico* de ciertos flavonoides, bajo supresión del complejo I, es más evidente a bajas concentraciones, y la relación oxidación acoplada/oxidación “libre” en presencia de flavonoide depende de la concentración del mismo. A bajas concentraciones de flavonoide ambas vías se potencian en una magnitud similar, aunque la vía de oxidación acoplada generalmente se activa más tempranamente (Luk'ianova, Germanova *et al.*, 2007). Sin embargo, el efecto que ejerce morina en la viabilidad celular en nuestro modelo celular de estudio, en presencia de DPI, no se observa con el otro inhibidor del complejo I, la rotenona. La explicación podría encontrarse en la inhibición de la actividad proteasomal (20S) que ejerce dicho inhibidor del complejo I (Chou, Li *et al.*, 2010).

Últimamente se ha demostrado que un flavonol del té verde, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), induce significativamente la fosforilación oxidativa y la producción de ATP tanto en neuronas como en astrocitos humanos, a bajas concentraciones, sin alterar el equilibrio redox (Castellano-Gonzalez, Pichaud *et al.*, 2016). La producción de ATP inducida por

EGCG sólo es bloqueada por inhibidores de la citocromo c oxidasa (complejo IV) y de la ATP sintasa, sugiriendo que el EGCG modula la actividad de este complejo, como lo confirma la determinación de la actividad enzimática. Considerando que la disfunción del complejo IV se ha observado en pacientes con EA y otras enfermedades neurodegenerativas, resulta interesante, en el contexto de nuestro estudio, el hallazgo de que ciertos flavonoles posean capacidad de restaurar la función mitocondrial y evitar la pérdida subsiguiente de la función sináptica.

2.7.1. Determinación de niveles intracelulares de ATP

Con respecto a la relación entre viabilidad celular y niveles intracelulares de ATP, se ha aceptado, en general, que los inhibidores de los complejos I-IV de la cadena de transporte electrónico causan la muerte celular debido a la depleción de ATP, ya que la producción de ATP es el proceso principal de los complejos mitocondriales. Sin embargo, se ha demostrado, por ejemplo, que el agotamiento de ATP no es responsable de la apoptosis inducida por inhibidores de la cadena de transporte electrónico en neuronas dopaminérgicas (Watabe y Nakaki, 2007). Asimismo, parece que el agotamiento de ATP no está relacionado con la muerte celular en otros tipos de células (Han e Im, 2008). Por ello, con el fin de comprobar si los cambios observados en la viabilidad celular se relacionan directamente o no con los niveles de ATP intracelulares y si, por tanto, el aumento de la viabilidad celular por el tratamiento con los flavonoles es debido a un aumento en los niveles intracelulares de ATP, a continuación se llevó a cabo su determinación en los distintos paradigmas experimentales que hemos considerado previamente.

Para cada flavonoide se establecieron los siguientes grupos de tratamiento:

- a) Células sin tratamiento (células control)
- b) Células tratadas con IAA 30 μ M
- c) Células tratadas con IAA 30 μ M y flavonoide a 10, 20 y 30 μ M, respectivamente
- d) Células tratadas con flavonoide a 10, 20 y 30 μ M, respectivamente

En la figura 42 se indican los niveles de ATP para cada grupo experimental, expresados como porcentaje respecto a las células control.

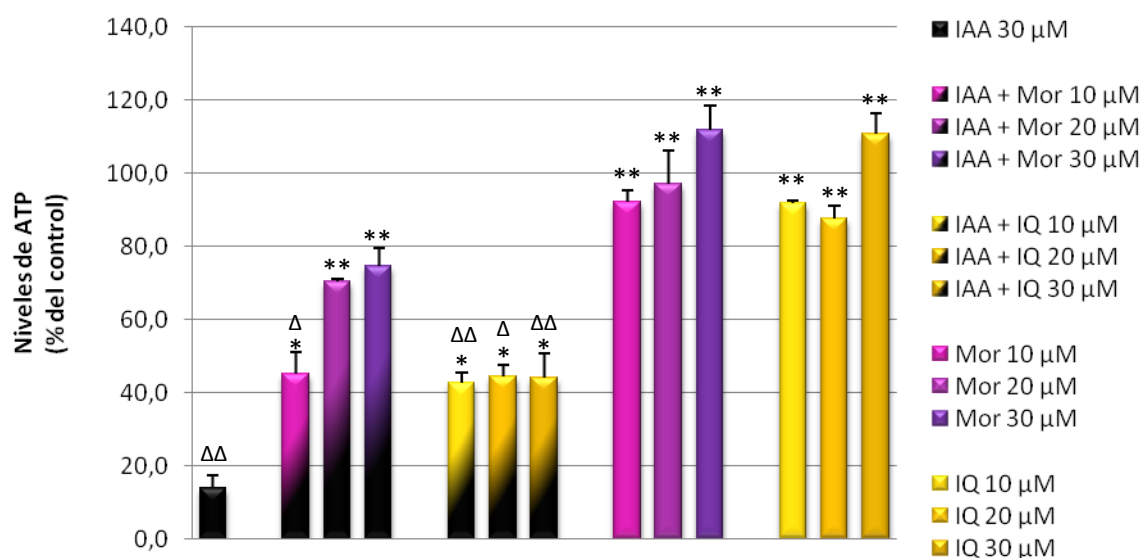


Figura 42. Niveles intracelulares de ATP en los distintos tratamientos (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. ΔΔ p<0,001; Δ p<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

Como se puede observar en la figura 42, el tratamiento con IAA hace descender drásticamente los niveles de ATP intracelulares en más de un 80% respecto de las células control que no reciben tratamiento. En células HT22 intactas, es decir, en ausencia de inhibidor de la glicolisis, ninguno de los flavonoles en estudio ejerció cambios significativos en los niveles de ATP respecto a las células control.

En células expuestas al inhibidor de la glicolisis, tanto morina como isoquercitrina evitan parcialmente la depleción energética, desencadenando un incremento aproximado de los niveles de ATP del 60% ($p < 0,001$) y del 30% ($p < 0,01$), respectivamente, a la concentración superior ensayada (30 µM), respecto del tratamiento exclusivo con IAA.

En el ensayo con los inhibidores OXPHOS, el flavonol se probó a la concentración de 30 µM. Se establecieron los siguientes grupos de tratamiento:

- Células sin tratamiento (células control)
- Células tratadas con IAA 30 µM
- Células tratadas con IAA 30 µM y flavonoide 30 µM
- Células tratadas con IAA 30 µM, flavonoide 30 µM e inhibidor OXPHOS (Rotenona 2 µM; DPI 100 nM; TTFA 50 µM; antimicina A 10 nM u oligomicina A 0,5 µM)

En la figura 43 se puede observar que el tratamiento concomitante de las células con el IAA, el inhibidor mitocondrial y el flavonol da lugar a unos niveles de ATP que no difieren significativamente de los que se alcanzan con la exposición exclusiva de las células a IAA. Es decir, la mejora de los niveles de ATP en las células expuestas a IAA por la adición del flavonol se ve abolida con la adición del inhibidor mitocondrial, salvo en el caso de TTFA, (inhibidor del complejo II), cuyos niveles de ATP se corresponden con los valores de supervivencia celular (figura 41C). Por tanto, si el flavonol incrementa los niveles de ATP cuando la glicolisis está inhibida, y con la incorporación del inhibidor mitocondrial los valores de ATP descienden significativamente, se puede deducir que el efecto beneficioso de los flavonoles en la isquemia química se dirige a favorecer la generación de ATP mediante la vía de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Sin embargo, se ha descrito que los inhibidores de la cadena electrónica mitocondrial no influyen necesariamente en el contenido de ATP intracelular o lo hacen moderadamente (Zhang, Tirmenstein *et al.*, 2001), como hemos podido observar con TTFA en nuestros ensayos.

Los inhibidores mitocondriales inducen citotoxicidad severa a través de la inhibición de Akt y p38 MAPK, aumento de la concentración intracelular del Ca^{2+} y disminución del potencial de membrana mitocondrial. TTFA induce una citotoxicidad más leve que otros inhibidores mitocondriales. La diferente respuesta de las células a TTFA resulta controvertida ya que TTFA es un inhibidor de la cadena mitocondrial, aunque podría ejercer otras acciones en dianas diferentes de las proteínas mitocondriales que ayudaran a las células a sobrevivir y superar la citotoxicidad inducida por el propio TTFA a través de la inhibición del complejo II. La expresión aumentada de Bcl-2 y la activación de Akt que se ha descrito en otras líneas celulares podrían tener lugar en las células HT22 para evitar o paliar la apoptosis (Han e Im, 2008).

A diferencia de los inhibidores mitocondriales rotenona, antimicina A y oligomicina A, se ha descrito que TTFA prolonga en la misma magnitud la duración de cada fase del ciclo celular (G1, S y G2/M), retrasando así la progresión global del ciclo celular. Este retraso se acompaña de un aumento de ERO y de la oxidación simultánea de GSH, además de una ligera disminución en el nivel de ATP intracelular. Finalmente, se ha demostrado que el retraso en la progresión del ciclo celular causado por TTFA se debe principalmente a la sobreproducción de ERO y al posterior estrés oxidativo, como se ha hecho evidente por su reversión tras el pretratamiento de las células con antioxidantes (Byun, Kim *et al.*, 2008).

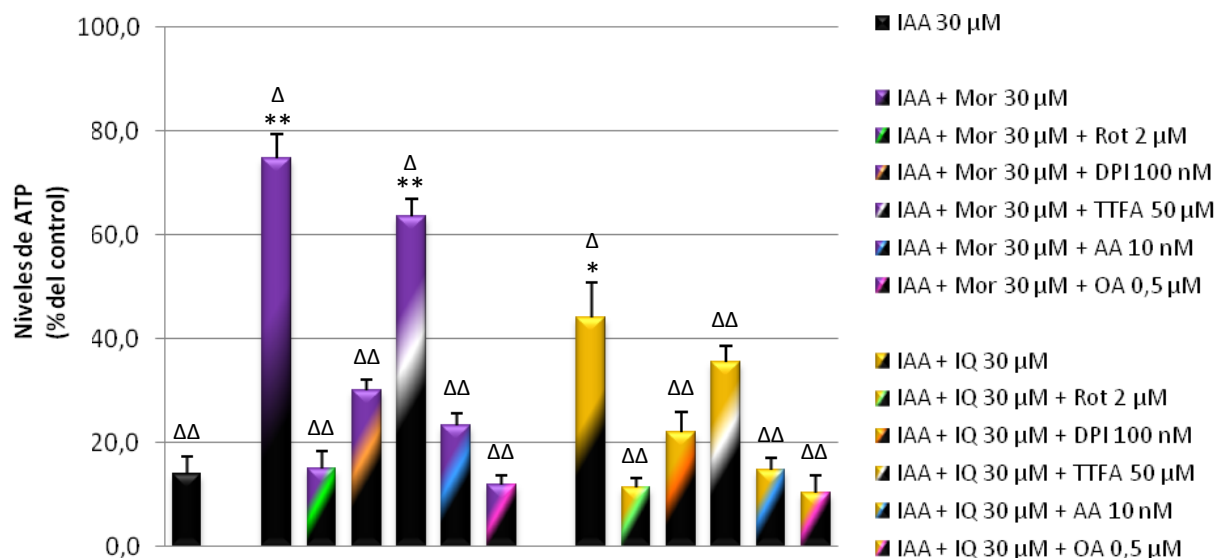


Figura 43. Niveles intracelulares de ATP en los distintos tratamientos con inhibidores OXPHOS (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA. ΔΔ $p < 0,001$; Δ $p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

Maher y colaboradores (2007) pusieron a punto este modelo de isquemia química en la línea celular HT22 con el fin de estudiar compuestos con potencial actividad neuroprotectora en el accidente cerebrovascular. Sobre la base del mecanismo de acción del IAA, el tratamiento de las células con dicho compuesto ejerce principalmente su impacto en la glicolisis, mientras que produce poco efecto en la función mitocondrial. Sin embargo, los cambios observados como consecuencia del tratamiento de las células con IAA incluyen un descenso de los niveles de ATP intracelular, alteraciones en el potencial de membrana, hidrólisis de fosfolípidos y un aumento de ERO. Estos cambios son mayores que los observados con la inhibición de la función mitocondrial exclusivamente y son más similares a los efectos observados con la combinación de inhibidores mitocondriales más inhibidores de la captación de glucosa (Maher, Salgado *et al.*, 2007).

En nuestros ensayos, hemos conseguido reproducir en gran medida la respuesta celular al IAA y a los inhibidores mitocondriales en la misma línea celular HT22. Podemos deducir que las células HT22 poseen una dependencia significativa de la glicolisis dado el descenso drástico que sufren tanto la viabilidad celular como los niveles de ATP cuando dicha vía de obtención de energía se inhibe con IAA. Por otro lado, el incremento importante en la supervivencia celular y en el contenido de ATP por el tratamiento con el flavonol correspondiente, en condiciones de glucolisis inhibida, nos permite concluir que las células HT22 son capaces de utilizar el mecanismo de la fosforilación oxidativa mitocondrial para su

supervivencia. Y precisamente este proceso es el que morina e isoquercetina podrían favorecer. Concretamente, un potencial efecto *energotrópico* de morina e isoquercitrina podría sugerirse a la vista del incremento en los niveles de ATP detectados en presencia de DPI (inhibidor del complejo I) y IAA, en relación al tratamiento exclusivo con IAA.

En otros modelos celulares, se ha puesto de manifiesto que morina e isoquercitrina son compuestos capaces de aumentar la capacidad de defensa antioxidante celular mediante la activación de la señalización Nrf2 (factor de transcripción *NF-E2 p45-related factor 2*), que implica la activación de la vía ERK, con el fin de proteger a las células de la citotoxicidad oxidativa inducida por diferentes peróxidos (Bhullar y Rupasinghe, 2015, Rizvi, Mathur *et al.*, 2015, Rizvi, Mathur *et al.*, 2015, Mathur, Rizvi *et al.*, 2016, Lee, Han *et al.*, 2017). La capacidad de activación de dicho factor de transcripción puede explicar los efectos observados con morina e isoquercitrina en favor de la respiración mitocondrial, dado que se ha comprobado recientemente que Nrf2 afecta a la eficiencia de la fosforilación oxidativa y a la síntesis de ATP (Dinkova-Kostova y Abramov, 2015). Mientras la deficiencia de Nrf2 da lugar a una disminución de la eficacia de la fosforilación oxidativa en mitocondrias cerebrales, la activación de Nrf2 tiene el efecto opuesto. Y así, los niveles de ATP son significativamente más elevados en células con una regulación constitutiva elevada de Nrf2 y menores cuando la expresión de Nrf2 es nula (Holmstrom, Baird *et al.*, 2013).

Es más, el uso de inhibidores de la fosforilación oxidativa y de inhibidores de la glicolisis ha revelado que el factor de transcripción Nrf2 modifica la forma en que las células producen ATP. Por ejemplo, la oligomicina provoca un descenso drástico en los niveles de ATP en neuronas *Nrf2-wild type*, sin embargo, en células *Nrf2-knockout* aumenta dichos niveles de ATP y son lenta pero completamente agotados por el tratamiento con IAA, lo que indica que en ausencia de Nrf2 la glicolisis, y no la fosforilación oxidativa, es la principal fuente de producción de ATP. Por lo tanto, la deficiencia de Nrf2 reduce la contribución de la fosforilación oxidativa y aumenta la contribución de la glicolisis hacia la síntesis de ATP. Este efecto es particularmente pronunciado cuando Nrf2 está ausente y es consistente con la dependencia del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de la presencia de glucosa en el medio y de niveles incrementados de intermediarios de la glicolisis (Glucosa-6-P, fructosa-6-P, piruvato, lactato) después de la caída de Nrf2 (Mitsuishi, Taguchi *et al.*, 2012). El aumento de los niveles de ATP después de la inhibición de la F_1F_0 -ATPasa por oligomicina indica que en ausencia de Nrf2, la F_1F_0 -ATPasa funciona como una ATPasa y no como una ATP sintasa, es decir, funciona en sentido inverso. Tal inversión en la actividad refleja muy probablemente la necesidad de bombear protones a través de la membrana

mitocondrial interna en un intento de mantener el $\Delta\psi_m$, que es crucial para la integridad funcional de este orgánulo. La reversión de la función de la F_1F_0 -ATPasa también se evidencia por la despolarización mitocondrial observada tras la administración de oligomicina a células *Nrf2-knockout* (Holmstrom, Baird *et al.*, 2013). En general, en condiciones de deficiencia de Nrf2, el ATP se produce principalmente en la glicolisis, y este ATP es utilizado en parte por la F_1F_0 -ATPasa para mantener el $\Delta\psi_m$.

A la vista de estas observaciones realizadas por otros autores, podemos sugerir que la potencial activación de Nrf2 por morina e isoquercitrina en el presente modelo de isquemia química probablemente modifique la forma en que las células producen ATP. Y así, los niveles de ATP puedan incrementarse significativamente por un refuerzo en la fosforilación oxidativa.

2.7.2. Determinación de niveles intracelulares de NAD^+ y NADH

Existen numerosas evidencias que sugieren que además del estado energético (niveles intracelulares de ATP), el estado redox celular es un mecanismo principal que regula la supervivencia y la muerte celular (Oka, Hsu *et al.*, 2012). Particularmente, la disminución en la actividad de la cadena de transporte electrónico da lugar a un espectro de alteraciones celulares que no pueden explicarse fácilmente por una simple deficiencia en la producción de ATP (Vafai y Mootha, 2012). El equilibrio entre el consumo de NADH a través del transporte de electrones (oxidación de NADH a NAD^+) y su generación por las deshidrogenasas mitocondriales mantiene el consiguiente nivel redox $NADH/NAD^+$ en la célula en estado estacionario, por lo que la alteración mitocondrial puede derivarse, por ejemplo, de un exceso de equivalentes reductores (estrés reductor o pseudohipoxia, con estancamiento de las reacciones acopladas a NAD^+) o de un gradiente de protones reducido (deterioro del pH y de la síntesis de ATP por la F_1F_0 -ATPasa).

Con el fin de comprobar si la viabilidad de las células HT22 se relaciona directamente o no con el poder reductor celular y que, por tanto, el aumento de la viabilidad celular por el tratamiento con los flavonoles es debido a un aumento en el poder reductor, a continuación se llevó a cabo la determinación de los niveles intracelulares de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina NADH y NADPH en los distintos paradigmas experimentales que hemos considerado previamente.

En este ensayo, se establecieron los grupos experimentales siguientes:

- Células control, sin tratamiento
- Células tratadas con morina a 10, 20 y 30 μM , respectivamente
- Células tratadas con isoquercitrina a 10, 20 y 30 μM , respectivamente
- Células tratadas con IAA 30 μM
- Células tratadas con IAA 30 μM y morina a 10, 20 y 30 μM , respectivamente
- Células tratadas con IAA 30 μM e isoquercitrina a 10, 20 y 30 μM , respectivamente

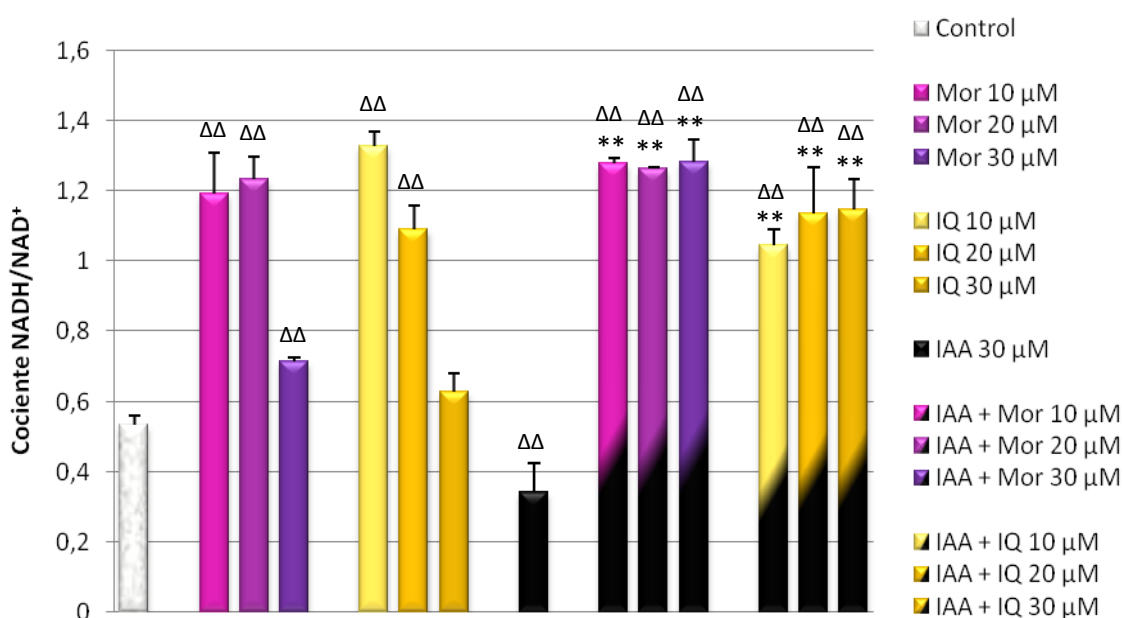


Figura 44. Modificación del cociente NADH/NAD^+ en el modelo de isquemia química por IAA (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA. $\Delta\Delta$ $p < 0,001$; Δ $p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

En la figura 44 se observa que el tratamiento de las células con morina o isoquercitrina, exclusivamente, ejerce un aumento de aproximadamente el doble en el cociente NADH/NAD^+ a las concentraciones de 10 y 20 μM respecto de las células control. El efecto parece depender de la concentración de flavonol, ya que a la máxima concentración ensayada (30 μM) dicho cociente presenta valores muy similares a los de las células control.

La inhibición de la glicolisis en las células HT22 por exposición a IAA produce un descenso significativo, de aproximadamente el 35%, en el cociente NADH/NAD^+ respecto a las células control. La presencia de morina o isoquercitrina, en condiciones isquémicas, desencadena un incremento en dicho cociente, de aproximadamente el triple con respecto al observado en las células expuestas a IAA. Los valores con morina o isoquercitrina en estas condiciones no son significativamente diferentes de los valores obtenidos con estos compuestos en células intactas que no fueron expuestas al IAA.

La exposición de las células a IAA inhibe la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), cuya coenzima NADH es específica y el NADPH es incapaz de sustituir. La inhibición de GAPDH implica la disminución en la formación de piruvato, ATP y NADH, lo que explica el descenso que experimenta el cociente NADH/NAD^+ . Puesto que el papel principal del NADH en la célula es la producción de ATP, los niveles del mismo deberían estar estrechamente relacionados con los del cociente NADH/NAD^+ . Previamente, hemos demostrado en este modelo experimental que la inhibición de la glicolisis por IAA conduce a una reducción significativa en el contenido de ATP (figura 42).

La exposición de las células a IAA produce un descenso tanto de NADH como de FADH_2 . La generación disminuida de NADH conduce a una actividad alterada del complejo I y a un aumento de la producción de ERO mitocondriales, los cuales pueden inhibir adicionalmente la actividad del complejo II. El descenso en FADH_2 también provoca una disminución de la funcionalidad del complejo II. De esta manera se disminuye el flujo de electrones a la coenzima Q, y por tanto al complejo III, reduciéndose finalmente la formación de ATP.

En las condiciones isquémicas descritas, ambos flavonoles favorecen un incremento del poder reductor mediante la reducción considerable de la coenzima NAD^+ a NADH. El marcado aumento de la forma reducida de la coenzima NADH podría deberse a una inhibición de las enzimas implicadas en su oxidación por parte del flavonol (xantino oxidasa, proteína quinasa C, ciclooxygenasa, lipoxigenasa, succinoxidasa microsomal y NADH oxidasa) (Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011).

En células intactas, no sometidas a la exposición de IAA, tratadas exclusivamente con flavonol (tanto morina como isoquercitrina) a la concentración de 30 μM , no se aprecian cambios importantes en el cociente NADH/NAD^+ respecto de las células control, pero es significativamente menor en relación al cociente que deriva de los tratamientos con las concentraciones de 10 y 20 μM , tal vez por un posible efecto pro-oxidante del flavonol. No

obstante, los niveles de ATP se mantienen elevados con respecto a las células control, posiblemente por estimulación de la actividad ATP sintasa.

Se hace evidente en nuestro estudio que las propiedades pro-oxidantes o antioxidantes de un determinado flavonoide dependen sobre todo de su concentración, y que las propiedades pro-oxidantes no siempre son causa de toxicidad, pues pueden estar asociadas a una señalización celular mediante la cual contribuyen a la coordinación de funciones celulares. En la práctica, los efectos pro-oxidantes pueden ser beneficiosos, ya que al imponer un ligero grado de estrés oxidativo, los niveles de las defensas antioxidantes y las enzimas de biotransformación pueden aumentar, lo que conduciría a la citoprotección (Chan, Galati *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha descrito que flavonoles con un grupo catecol en el anillo B son capaces de producir *orto*-semiquinonas y de oxidar la coenzima NADH, tanto citosólica como mitocondrial, en una gran variedad de células de mamífero. El origen de este fenómeno podría ser consecuencia de la interacción de estos flavonoides con enzimas celulares, como las peroxidasas, las cuales pueden generar dichas *orto*-semiquinonas a partir de flavonoides y otros polifenoles que contienen grupos catecol con reducción estequiométrica del peróxido de hidrógeno. También se ha propuesto la oxidación de ciertos flavonoles por la enzima lipoxigenasa, que es capaz de producir especies pro-oxidantes en presencia de peróxido de hidrógeno. Estas *orto*-semiquinonas pueden causar la oxidación de NADH sin consumo de oxígeno. Entre estos flavonoles, quercetina (Buss, Constantin *et al.*, 2005) y fisetina (Constantin, Constantin *et al.*, 2011) producen una disminución en el cociente mitocondrial NADH/NAD⁺ de una forma concentración dependiente, junto con una estimulación del ciclo de Krebs y un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa (Prochazkova, Bousova *et al.*, 2011). Los flavonoides son ácidos débiles de carácter hidrofóbico, por tanto, no es sorprendente que actúen de manera similar a los clásicos desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Skulachev, 1998) y provoquen un aumento de la tasa de respiración mediante un desacoplamiento mitocondrial parcial, dependiente de la concentración.

El fenómeno del desacoplamiento mitocondrial, que podría atribuirse a morina e isoquercitrina, encuentra su aplicación en los tratamientos profilácticos que permiten la neuroprotección. Aumentar los niveles de NAD⁺ es una de las formas mejor estudiada de geroprotección y, de hecho, existen muchos trabajos que muestran que el aumento de la concentración de NAD⁺ a través de la activación de su biosíntesis conduce a un aumento de la esperanza de vida de los animales de experimentación (Knorre y Severin, 2016). El NAD⁺ puede ser utilizado como sustrato por diversas enzimas (sirtuinas) cuyos productos finales

regulan el crecimiento y la muerte celular (Wu, Cao *et al.*, 2016). Así, el nivel celular de nucleótidos NADH y NAD⁺ influye significativamente en la supervivencia y diversas formas de muerte celular a través de múltiples mecanismos. La reducción de NAD⁺ a NADH tiene lugar durante reacciones catabólicas celulares (glicolisis y ciclo de Krebs), por tanto, interferir en el metabolismo celular podría ser una forma eficaz de aumentar la concentración de NAD⁺.

En la cadena mitocondrial de transporte electrónico se oxidan las coenzimas reducidas, el NADH se convierte en NAD⁺ y el FADH₂ en FAD. Al producirse esta reacción, los átomos de hidrógeno (o electrones equivalentes), son conducidos a través de la cadena respiratoria por un grupo de transportadores de electrones que experimentan sucesivas oxidaciones y reducciones; reacciones en las cuales los electrones son transferidos de un dador de electrones a un aceptor. En consecuencia, en esta etapa final de la respiración, estos electrones de alto nivel energético descienden paso a paso hasta el bajo nivel energético del oxígeno (último aceptor de la cadena), formándose agua. Cabe aclarar que los tres primeros aceptores reciben el H⁺ y el electrón conjuntamente. En cambio, a partir del cuarto aceptor, sólo se transportan electrones, y los H⁺ quedan en solución. El flujo de electrones, por tanto, está íntimamente acoplado al proceso de fosforilación, y no ocurre a menos que también pueda realizarse este último. Si el flujo de electrones no estuviera acoplado a la fosforilación, no habría formación de ATP y la energía de los electrones se degradaría en forma de calor. Sin embargo, en respuesta a las demandas ambientales, las células pueden modular su metabolismo energético y su estado redox mediante el desacoplamiento mitocondrial. Se han estudiado los posibles efectos bioenergéticos del desacoplamiento mitocondrial moderado en cultivos neuronales mediante diversos compuestos, y se ha observado que éste podría estimular el metabolismo energético a través de un mecanismo que implica respuestas de estrés metabólico leve. La captación de glucosa y el consumo de oxígeno se estimulan y la oxidación de NADH a NAD⁺ en la mitocondria se acelera en las neuronas corticales tratadas con desacoplantes, ya que la cadena de transporte de electrones es uno de los principales lugares de oxidación de NADH durante la respiración. Mediante la estimulación del metabolismo energético y la modulación de los niveles de NAD⁺, el desacoplamiento mitocondrial podría regular la actividad sirtuina-1 (SIRT1), histona desacetilasa dependiente de NAD⁺ y, por lo tanto, la ruta de señalización de sirtuina.

El papel crucial desempeñado por las sirtuinas en la regulación del metabolismo ha sido ampliamente estudiado durante la última década (Kida y Goligorsky, 2016). La capacidad de los polifenoles para activar SIRT1 y, en consecuencia, para estimular el metabolismo energético, ha abierto nuevas perspectivas terapéuticas en diversas enfermedades que implican trastornos energéticos (Borradaile y Pickering, 2009, Fusco, Maulucci *et al.*, 2012, Shuang, Rui *et al.*, 2016). Las mitocondrias pueden secuestrar hasta el 70% del contenido de NAD^+ , dependiendo del tejido considerado, y el estado redox mitocondrial podría ser un potente regulador de la sirtuina. Recientemente, se ha propuesto que los flavonoides y sus derivados inducen la biogénesis mitocondrial a través de la activación o expresión de las sirtuinas, cuya activación mejora el suministro de sustratos a la cadena respiratoria tanto por el ciclo de Krebs como por la oxidación de ácidos grasos, y por tanto conduce a un aumento en las tasas de respiración. Además, el reciclaje de NADH a NAD^+ es clave para la proliferación celular ya que muchas vías biosintéticas producen NADH como subproducto (Titov, Cracan *et al.*, 2016).

Así como se ha descrito para un polifenol ampliamente estudiado, el resveratrol (Koronowski, Dave *et al.*, 2015), nuestros resultados sugieren que tanto morina como isoquercitrina, a la concentración aproximada de 30 μM , podrían ejercer un *pre-acondicionamiento* que indujera tolerancia isquémica mediante un desacoplamiento mitocondrial moderado, con la finalidad de prevenir déficits energéticos neuronales a través de un mecanismo compensatorio. El cociente NADH/NAD^+ que se ha obtenido en las células no expuestas al IAA y tratadas exclusivamente con el flavonol podría ser consecuencia de un pre-acondicionamiento que prepara y capacita a la célula para hacer frente al impacto del insulto (IAA). Y, de hecho, el cociente NADH/NAD^+ aumenta cuando las células han sido expuestas al IAA junto con el flavonol.

2.7.3. Determinación de niveles intracelulares de NADP^+ y NADPH

El NADPH es un cofactor necesario para la biosíntesis de lípidos y nucleótidos y para muchos otros procesos celulares, que incluyen el mantenimiento del sistema antioxidante celular, la síntesis de óxido nítrico o la función de las células inmunitarias. Su forma reducida, NADPH , puede ser generada no sólo por activación de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial, sino también por rutas no mitocondriales de producción de energía (Rizzuto, Bastianutto *et al.*, 1994). Sin embargo, hemos de suponer que la mayor parte del NADPH producido en nuestro modelo de isquemia por IAA procede de la mitocondria, ya que la glicolisis se encuentra inhibida.

En el ensayo para la determinación del cociente NADPH/NADP⁺ establecimos los mismos grupos experimentales que para la determinación del cociente NADH/NAD⁺:

- Células control, sin tratamiento
- Células tratadas con morina a 10, 20 y 30 μ M, respectivamente
- Células tratadas con isoquercitrina a 10, 20 y 30 μ M, respectivamente
- Células tratadas con IAA 30 μ M
- Células tratadas con IAA 30 μ M y morina a 10, 20 y 30 μ M, respectivamente
- Células tratadas con IAA 30 μ M e isoquercitrina a 10, 20 y 30 μ M, respectivamente

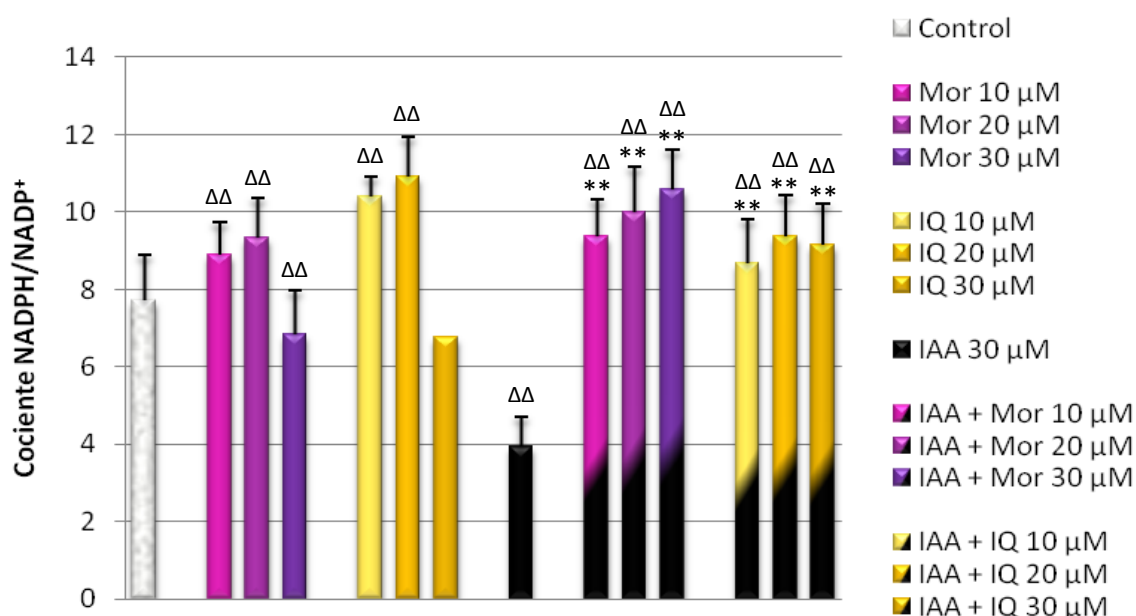


Figura 45. Modificación del cociente NADPH/NADP⁺ en el modelo de isquemia química por IAA (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. $\Delta\Delta$ p<0,001; Δ p<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

En la figura 45 se puede observar cómo el cociente NADPH/NADP⁺ sigue un patrón similar al del cociente NADH/NAD⁺. El tratamiento de las células con morina o isoquercitrina, exclusivamente, ejerce un aumento en el cociente NADPH/NADP⁺ a las concentraciones de 10 y 20 μ M respecto de las células control. Dicho efecto, que es mayor para isoquercitrina, parece depender de la concentración de flavonol, ya que a la máxima concentración ensayada (30 μ M) el cociente NADPH/NADP⁺ presenta valores ligeramente menores a los de las células control.

La inhibición de la glicolisis en las células HT22 por exposición a IAA produce un descenso significativo del cociente $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, de aproximadamente el 50% respecto a las células control. La presencia de morina o isoquercitrina, en condiciones isquémicas, desencadena un incremento en dicho cociente mayor del 50% con respecto al observado en las células expuestas a IAA. Los valores con morina o isoquercitrina en estas condiciones son significativamente más elevados que los valores de células control que no recibieron ningún tratamiento.

En nuestros ensayos, hemos obtenido valores de $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ superiores en un orden de magnitud a los del cociente NADH/NAD^+ . En la mayoría de los tipos celulares, el contenido total de NADH (forma oxidada más forma reducida) es mayor que el de NADPH. Sin embargo, como el papel principal del NADPH es de donante de electrones en las vías anabólicas y esto requiere que el contenido se mantenga en un estado significativamente reducido, la relación $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ se mantiene elevada. Por el contrario, el papel del NADH como aceptor de electrones en las vías catabólicas requiere que el *pool* se mantenga en estado oxidado. Por lo tanto, la relación NADH/NAD^+ se mantiene baja. Y así, mientras que el contenido de NAD^+ puede ser mayor que el de NADP^+ , las concentraciones intracelulares de las formas reducidas, NADH y NADPH, son de un orden similar de magnitud.

La depleción con el tiempo de NADPH por exposición de las células al IAA se ha podido producir por la liberación de la mitocondria del factor inductor de apoptosis, una flavoproteína con potente actividad reductasa, e incluso por la activación de PARP en la mitocondria, que al consumir el NAD^+ imposibilita su reciclaje por las deshidrogenasas, promoviendo la despolarización mitocondrial. El descenso en la capacidad de la mitocondria para reducir los niveles de NADP^+ y de Ca^{2+} incrementados contribuyen a la apertura de los poros de transición de la membrana mitocondrial; esto favorece la liberación del Ca^{2+} del orgánulo y desacopla la fosforilación oxidativa disminuyendo por tanto la síntesis de ATP (Parihar, Kunz *et al.*, 2008). Estos eventos que pueden acontecer durante el proceso de isquemia química en nuestro modelo celular, podrían ser prevenidos por morina o isoquercitrina mediante una supuesta inhibición o modulación de los receptores de la rianodina (RyR) o bien de la apoptosis desencadenada por el estrés del retículo endoplásmico (RE).

No habría que descartar, además, que el significativo aumento de la forma reducida NADPH puede deberse a una reducción directa de la coenzima por morina o isoquercitrina

gracias a las propiedades óxido-reductoras de ambos o a una inhibición de determinadas enzimas cuya actividad depende de NADPH, como la NADPH oxidasa (NOX) (Fraga, Galleano *et al.*, 2010), la cual es una de las principales fuentes de ERO tras un proceso isquémico (Gray y Jandeleit-Dahm, 2015, Chen, Ye *et al.*, 2016, Zhang, Wu *et al.*, 2016).

Dado que el NADPH citosólico puede ser generado por deshidrogenasas citosólicas dependientes de NADP^+ que utilizan sustratos que intervienen en el ciclo de Krebs (isocitrato y malato), la célula puede satisfacer sus requerimientos de NADPH en ausencia de glucosa, usando exclusivamente sustratos del metabolismo mitocondrial. La señalización de Ca^{2+} mitocondrial juega un papel importante en estos procesos de adaptación metabólica. La oxidación de los nucleótidos de piridina mitocondriales, seguida de su hidrólisis, promueve la liberación de Ca^{2+} de las mitocondrias, la cual ligada a la de nucleótidos de piridina a partir de las mitocondrias podría controlarse mediante sustratos respiratorios que regulen la hidrólisis intramitocondrial de nucleótidos de piridina oxidados. En nuestro estudio, morina e isoquercitrina han provocado un incremento significativo en el cociente $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$, que podría haber resultado de un aumento de la capacidad celular en la utilización de sustratos mitocondriales con la finalidad de mantener las funciones celulares y la viabilidad en las condiciones metabólicas impuestas por el tratamiento con IAA.

2.7.4. Implicación de las rutas de señalización celular

Con el fin de estudiar qué vías de señalización celular están implicadas en la protección ejercida por morina e isoquercitrina, examinamos diferentes rutas asociadas al proceso isquémico. En las composiciones 46-52 se representan los resultados obtenidos, que se pueden agrupar en dos grandes vías: la vía de las quinasas MAP (MAPK) y la vía de PI3K/Akt/mTOR.

La figura **B** representa el análisis densitométrico de los niveles de la proteína en estudio en los distintos tratamientos respecto a los niveles de la misma en las células control. Los valores se han expresado como porcentaje respecto del control, y se han calculado como se indica a continuación:

$$\% \text{ respecto control} = \frac{(PFx/PTx)/Actx}{(PFc/PTc)/Actc} \times 100$$

PFx= Proteína fosforilada del tratamiento "x"
PTx= Proteína total del tratamiento "x"
Actx= β-actina correspondiente al tratamiento "x"
PFc= Proteína fosforilada control
PTc= Proteína total control
Actc= β-actina correspondiente al control

Vía de las quinasas MAP (MAPK)

Las quinasas MAP (MAPK) constituyen una familia de serina/treonina quinasas activadas por factores de crecimiento y estrés. Estas proteínas desempeñan un papel clave en la transducción intracelular de señales, permitiendo a la célula integrar diferentes estímulos extracelulares. En respuesta a estos estímulos pueden activarse tres subfamilias de proteínas MAPK bien definidas: quinasas 1/2 reguladas por señales extracelulares (ERK-1/2), las p38 MAPK (isoformas α, β, γ y δ) y las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs 1, 2 y 3). Así, las MAPK regulan procesos como la mitosis, los cambios en los patrones de expresión génica, el movimiento, el metabolismo y la muerte celular programada, permitiendo a las células sobrevivir, proliferar, inducir apoptosis, interaccionar con múltiples tipos celulares, etc (Roux y Blenis, 2004). Cada subfamilia de MAPK está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas que se activan de forma secuencial. Así, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK) activa a la MAPK quinasa (MAPKK o MEK) por fosforilación de residuos de serina o treonina, y a su vez ésta activa a la MAPK mediante la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina (motivo Thr-X-Tyr) localizados en su *loop* de activación. Una vez activas, las MAPK fosforilan a sus sustratos en residuos de serina o treonina adyacentes a prolina. La duración e intensidad con la que se activa la ruta depende de la compartimentalización subcelular de las distintas moléculas implicadas y de la activación de fosfatasa que silencian la ruta para su regulación.

La bibliografía más reciente apoya la hipótesis de que la apoptosis neuronal y la isquemia cerebral inducen una robusta activación de las cascadas MAPK. Aunque las vías de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) promueven la supervivencia y la proliferación celular, y las vías p38 y JNK inducen la apoptosis en general, las funciones de las vías MAPK en la muerte y supervivencia neuronal parecen ser complejas y muy dependientes del tipo de células y del tipo, magnitud y momento, de insulto.

Algunos inhibidores específicos de las cascadas MAPK proporcionan una interesante información en la dilucidación de las funciones de estas quinasas en la muerte y la supervivencia neuronal, pero los resultados siguen siendo controvertidos. Por ello, la selección de dianas prometedoras involucradas en estas cascadas de señalización para el descubrimiento y desarrollo de fármacos es aún un desafío. Aun así, tal enfoque novedoso pueden conducir a la aparición de nuevas vías de intervención terapéutica en la isquemia cerebral.

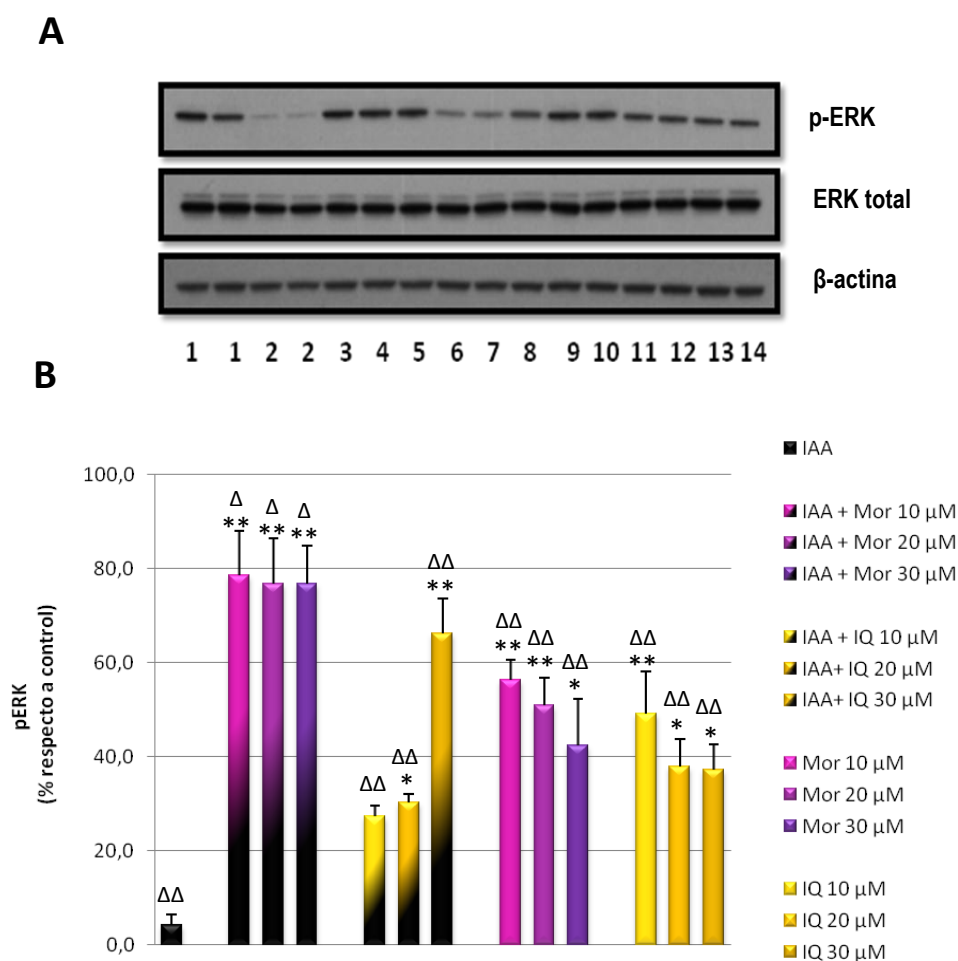


Figura 46. (A) Imagen representativa de western-blot de p-ERK, ERK total y β-actina (control de carga): **1.** Control; **2.** IAA; **3.** IAA + Mor 10 μM; **4.** IAA + Mor 20 μM; **5.** IAA + Mor 30 μM; **6.** IAA + IQ 10 μM; **7.** IAA + IQ 20 μM; **8.** IAA + IQ 30 μM; **9.** Mor 10 μM; **10.** Mor 20 μM; **11.** Mor 30 μM; **12.** IQ 10 μM; **13.** IQ 20 μM; **14.** IQ 30 μM. **(B)** Análisis densitométrico de p-ERK. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética ± error estándar medio (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. ΔΔp<0,001; Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

En la figura 46 se aprecia que el tratamiento de las células con IAA produce un descenso drástico de la defosforilación de ERK ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina experimentan un aumento muy sobresaliente de la fosforilación de ERK, próximo al 70%, respecto del tratamiento exclusivo con IAA ($p < 0,01$). El efecto de isoquercitrina en las células sometidas al IAA es de menor magnitud que el de morina, alcanzando los mayores niveles de fosforilación de ERK a la concentración de 30 μM .

El tratamiento de células HT22, no sometidas a estrés químico, con morina o isoquercitrina, produce un descenso de los niveles de p-ERK con respecto a las células control ($p < 0,001$) que llega hasta aproximadamente el 40% con la concentración mayor ensayada (30 μM).

La contribución de la vía ERK de supervivencia neuronal resulta controvertida ya que la creciente evidencia sugiere que la activación de ERK está muy presente en la neurodegeneración que se desarrolla tras la isquemia y en la EA (Harper y Wilkie, 2003). La contribución relativa de la vía ERK de neuroprotección depende del tipo de lesión celular y del tipo de célula (Mehta, Manhas *et al.*, 2007).

A la vista de los resultados que se muestran en la figura 47, se observa que el tratamiento de las células con IAA produce un incremento sobresaliente de la fosforilación de p38 de aproximadamente ocho veces el valor de las células control ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina muestran niveles similares de fosforilación de p38 respecto de las células expuestas exclusivamente a IAA. Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con isoquercitrina experimentan un descenso significativo de la fosforilación de p38 con respecto de las células expuestas exclusivamente a IAA, que es superior a un 30% para la concentración de 30 μM , si bien en ausencia de estrés químico con IAA, el tratamiento de células HT22 con morina o isoquercitrina produce ligeros incrementos de los niveles de p-p38 con respecto a las células control.

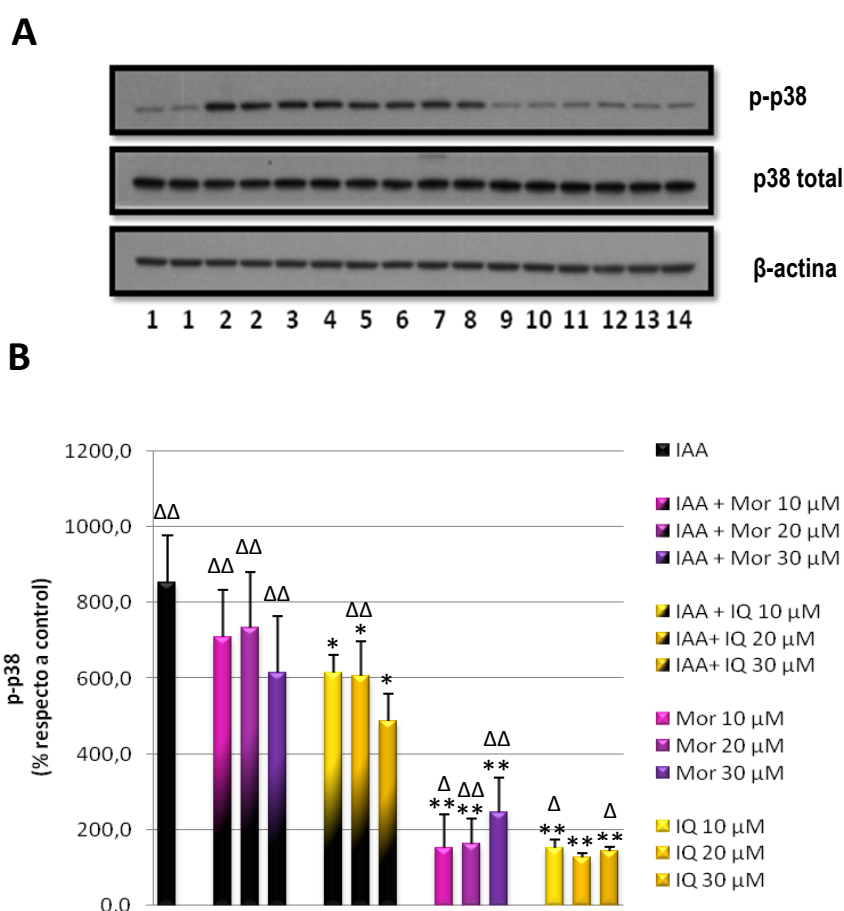


Figura 47. (A) Imagen representativa de western-blot de p-p38, p38 total y β-actina (control de carga): **1.** Control; **2.** IAA; **3.** IAA + Mor 10 μM; **4.** IAA + Mor 20 μM; **5.** IAA + Mor 30 μM; **6.** IAA + IQ 10 μM; **7.** IAA + IQ 20 μM; **8.** IAA + IQ 30 μM; **9.** Mor 10 μM; **10.** Mor 20 μM; **11.** Mor 30 μM; **12.** IQ 10 μM; **13.** IQ 20 μM; **14.** IQ 30 μM. **(B)** Análisis densitométrico de p-p38. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética ± error estándar medio (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. ΔΔp<0,001; Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

Las proteínas quinasa p38 activadas por mitógenos (p38 MAPK) se activan bajo condiciones de estrés celular. Nuestros resultados indican que la exposición de las células a IAA condujo a un aumento en la activación de p38 MAPK. Como se demuestra por la disminución de la fosforilación de p38 MAPK mediada por morina e isoquercetina, respectivamente, ejercida en las células expuestas a IAA, podemos concluir que la inactivación de p38 MAPK está involucrada en el efecto neuroprotector de estos flavonoles frente a la muerte neuronal por isquemia química. El papel neuroprotector de la inhibición de p38 se ha descrito en el accidente cerebrovascular experimental en ratas, demostrándose que la inhibición de p38 MAPK atenúa la fragmentación mitocondrial y la mitofagia tras la isquemia (Zhang, Zhang *et al.*, 2015).

Sin embargo, resulta interesante que recientemente se empieza a asociar la fosforilación de p38 MAPK con la neuroprotección inducida por el pre-acondicionamiento isquémico, basado en la translocación de Bcl-xL desde el citosol a la mitocondria, como se ha podido observar (Zhao, Liu *et al.*, 2013). Este fenómeno podría explicar nuestras observaciones en ausencia de estrés químico con IAA. Es decir, el tratamiento de células HT22 con morina o isoquercitrina produce ligeros incrementos de los niveles de p-p38 con respecto a las células control, lo que podría suponer la activación de una vía de señalización intracelular para proporcionar protección frente a la lesión isquémica propiamente.

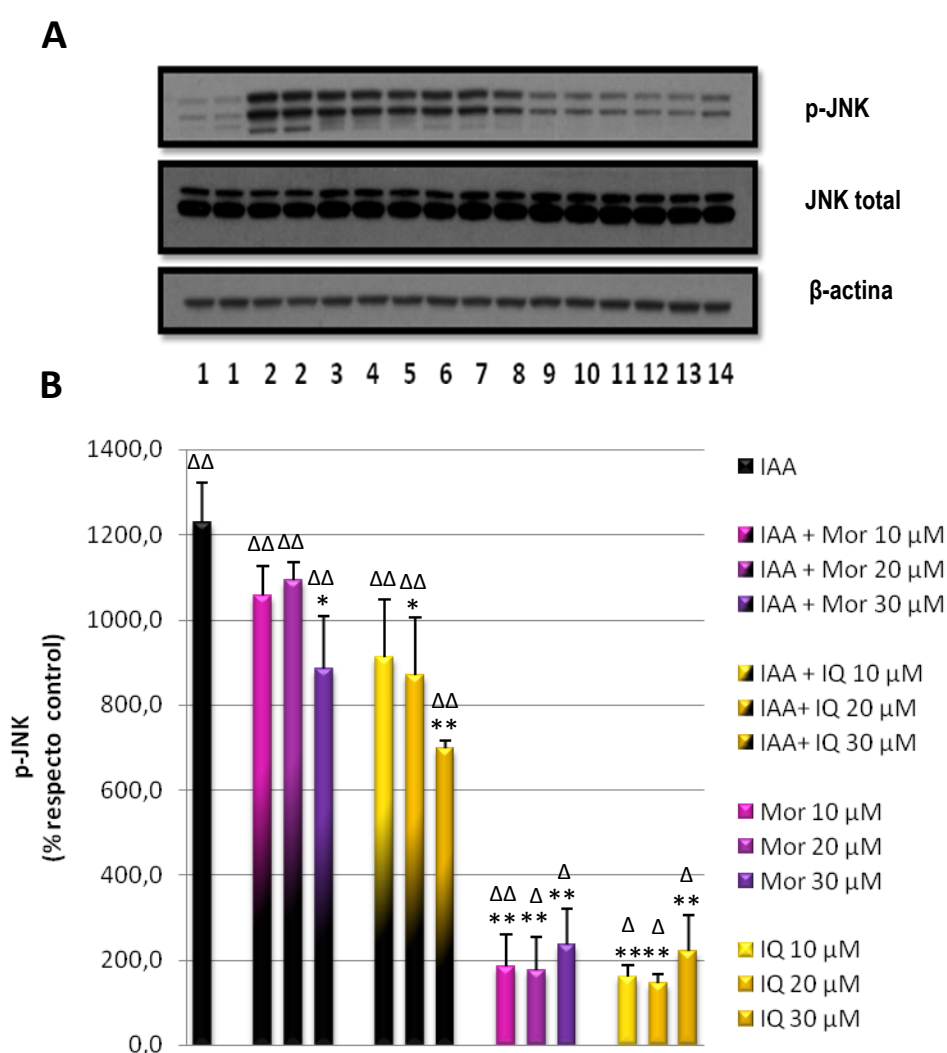


Figura 48. (A) Imagen representativa de western-blot de p-JNK, JNK total y β-actina (control de carga): 1. Control; 2. IAA; 3. IAA + Mor 10 μM; 4. IAA + Mor 20 μM; 5. IAA + Mor 30 μM; 6. IAA + IQ 10 μM; 7. IAA + IQ 20 μM; 8. IAA + IQ 30 μM; 9. Mor 10 μM; 10. Mor 20 μM; 11. Mor 30 μM; 12. IQ 10 μM; 13. IQ 20 μM; 14. IQ 30 μM. **(B)** Análisis densitométrico de p-JNK. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética ± error estándar medio (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. ΔΔp<0,001; Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

De la figura 48 se desprende que el tratamiento de las células con IAA produce un aumento muy sobresaliente de la fosforilación de JNK, de aproximadamente doce veces el valor de las células control ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina muestran niveles similares de fosforilación de JNK respecto de las células expuestas exclusivamente a IAA, aunque a la mayor concentración ensayada (30 μM) se aprecia un descenso significativo de la fosforilación ($p < 0,01$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con isoquercitrina a 30 μM experimentan un descenso significativo de la fosforilación de JNK de aproximadamente el 50%, con respecto de las células expuestas exclusivamente a IAA ($p < 0,001$), si bien en ausencia de estrés químico con IAA, el tratamiento de células HT22 con morina o isoquercitrina produce ligeros incrementos de los niveles de p-JNK con respecto a las células control. Existen numerosas experiencias en las que se han utilizado inhibidores de JNK o ratones JNK-*knockout* que han revelado un papel fundamental de JNK en la apoptosis neuronal y un beneficio de los inhibidores en modelos de accidente cerebrovascular focal (Pirianov, Brywe *et al.*, 2007, Benakis, Bonny *et al.*, 2010).

La vía de señalización c-Jun NH2-kinasa terminal (JNK) es, por tanto, un importante mecanismo en la apoptosis isquémica. Existe, además, una creciente evidencia acerca del papel crucial de JNK en las disfunciones mitocondriales, con la posterior iniciación de la apoptosis neuronal. Estos hallazgos son particularmente relevantes debido a que las disfunciones mitocondriales son centrales en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, como la EA, el Parkinson o la enfermedad de Huntington. Las JNKs pueden traslocarse a la mitocondria y mediar la liberación de citocromo c. En segundo lugar, poseen capacidad de inactivar proteínas de la familia Bcl-2 anti-apoptóticas y activar proteínas pro-apoptóticas (Bcl-xL, Bad, Bim). En tercer lugar, pueden inducir la liberación de inhibidores de proteínas anti-apoptóticas, como Smac/Diablo, de la mitocondria. Finalmente, las JNKs activan la expresión de las proteínas pro-apoptóticas (Bim), en el núcleo. La señalización JNK puede inducir la muerte neuronal tanto por inducción transcripcional de genes promotores de muerte como por modulación de las vías de la apoptosis mitocondrial, y la patología mitocondrial mediada por JNK se observa tras la neurodegeneración inducida por β -amiloide o tras la isquemia cerebral (Eminel, Klettner *et al.*, 2004)

En cuanto a isoquercitrina, en estudios en cultivo primario de neuronas corticales de rata se ha demostrado su capacidad protectora frente al daño neuronal inducido por privación de oxígeno/glucosa, modelo bastante reproducible del accidente cerebrovascular isquémico. Se encontró que isoquercitrina adicionada al medio de cultivo antes del insulto podía

prevenir la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, la liberación de LDH y la disminución de la viabilidad celular, inducidas por la hipoxia-isquemia. Los estudios mostraron que el efecto neuroprotector de isoquercitrina tenía lugar mediante la vía de señalización anti-apoptótica de desactivación de JNK y p38 e inhibición de caspasa 3 (Wang, Li *et al.*, 2013, Wang, Shi *et al.*, 2017), mecanismos de neuroprotección en consonancia con nuestras observaciones acerca de morina e isoquercitrina.

Vía de PI3K/Akt/mTOR

Fisiológicamente, la vía de PI3K-Akt-mTOR juega un papel importante en la regulación del crecimiento, la proliferación, la motilidad y la supervivencia celular, así como en la regulación de los niveles de nutrientes, la síntesis proteica, la autofagia, la transcripción y el estado redox celular. mTOR (*mammalian target of rapamycin*, diana de rapamicina) integra múltiples señales, incluyendo factores de crecimiento (como EGF y IGF-1/2) y mitógenos. mTOR destaca también por estar involucrada en el proceso de angiogénesis regulando la translación y la actividad del factor inducible por la hipoxia (HIF-1), que está relacionado con la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en situaciones de hipoxia (Chen, Xiong *et al.*, 2012).

En la figura 49 se observa que el tratamiento de las células con IAA produce la defosforilación de Akt casi completamente ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina o isoquercitrina experimentan un ligero aumento, aunque significativo, de la fosforilación de Akt respecto del tratamiento exclusivo con IAA ($p < 0,01$). El efecto del flavonol en las células sometidas al IAA no es concentración dependiente.

Además, se puede observar que el tratamiento de células HT22 intactas, no sometidas a estrés químico, con morina o isoquercitrina produce un descenso del 55-60% de los niveles de p-Akt con respecto a las células control ($p < 0,001$).

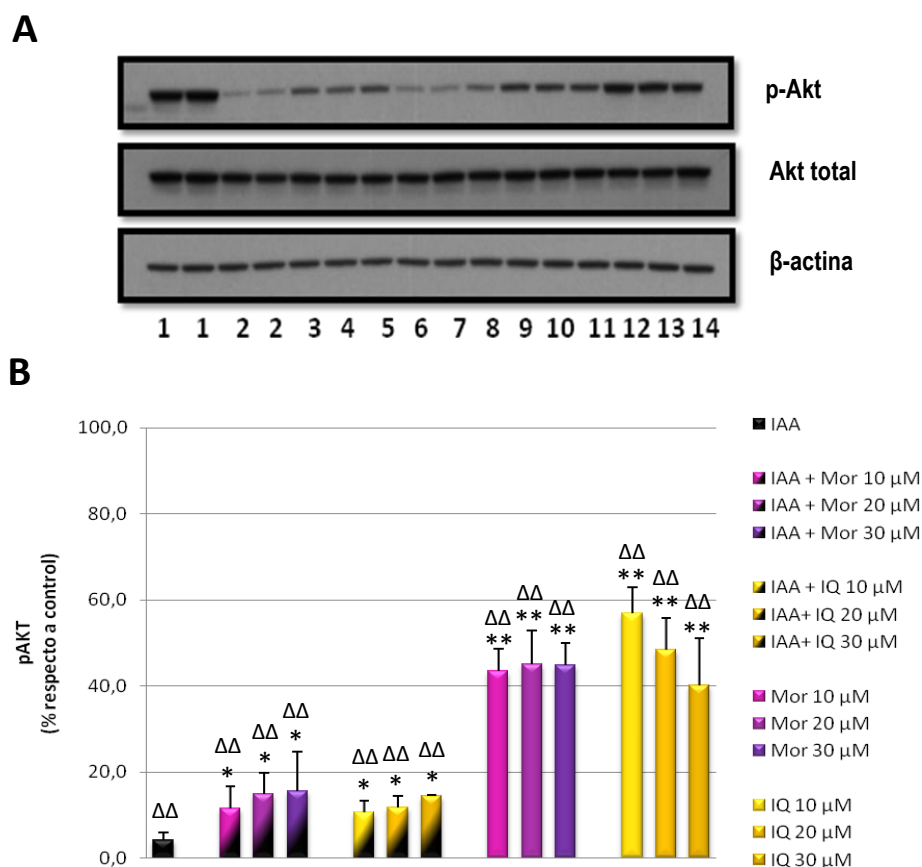


Figura 49. (A) Imagen representativa de western-blot de p-Akt, Akt total y β -actina (control de carga): **1.** Control; **2.** IAA; **3.** IAA + Mor 10 μ M; **4.** IAA + Mor 20 μ M; **5.** IAA + Mor 30 μ M; **6.** IAA + IQ 10 μ M; **7.** IAA + IQ 20 μ M; **8.** IAA + IQ 30 μ M; **9.** Mor 10 μ M; **10.** Mor 20 μ M; **11.** Mor 30 μ M; **12.** IQ 10 μ M; **13.** IQ 20 μ M; **14.** IQ 30 μ M. **(B)** Análisis densitométrico de p-AKT. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética $\pm$ error estándar medio (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA. $\Delta\Delta p < 0,001$; $\Delta p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

La isquemia cerebral representa una forma de estrés metabólico severo que tiene un fuerte impacto en las modificaciones postransduccionales de las proteínas, resultando en la activación o inhibición de ERK y Akt. La mitocondria desempeña un papel importante durante la apoptosis a través de la vía de la apoptosis mitocondrial. Akt tiene un efecto anti-apoptótico mediante la prevención de la liberación de citocromo c de la mitocondria y la supresión de la cascada de activación de caspasas, ya que inhibe la apoptosis mediante la fosforilación y la inactivación de factores pro-apoptóticos (Bad) para mantener la integridad mitocondrial (Pilchova, Klacanova *et al.*, 2015). El descenso de la fosforilación de Akt observada en nuestros experimentos tras 24 horas del insulto es levemente inhibido por morina e isoquercitrina. Aunque se ha descrito que la activación de la vía Akt media la

supervivencia de las neuronas de hipocampo vulnerables tras la isquemia cerebral, este fenómeno no se ha puesto de manifiesto en nuestros experimentos.

Por otro lado, se ha demostrado que el pre-acondicionamiento isquémico actúa a través de la señalización PI3K/Akt para bloquear la cascada neurodegenerativa inducida por la isquemia que implica la translocación mitocondrial de Bad, la interacción de Bad con Bcl-xL, la activación de caspasas y la muerte neuronal (Miyawaki, Mashiko *et al.*, 2008). En este contexto, se podría sugerir que la mayor activación de Akt en células tratadas exclusivamente con morina o isoquercitrina, en comparación con las tratadas con IAA, proporciona un pre-acondicionamiento isquémico a las células HT22 que las haría menos vulnerables a la muerte celular con el advenimiento del insulto.

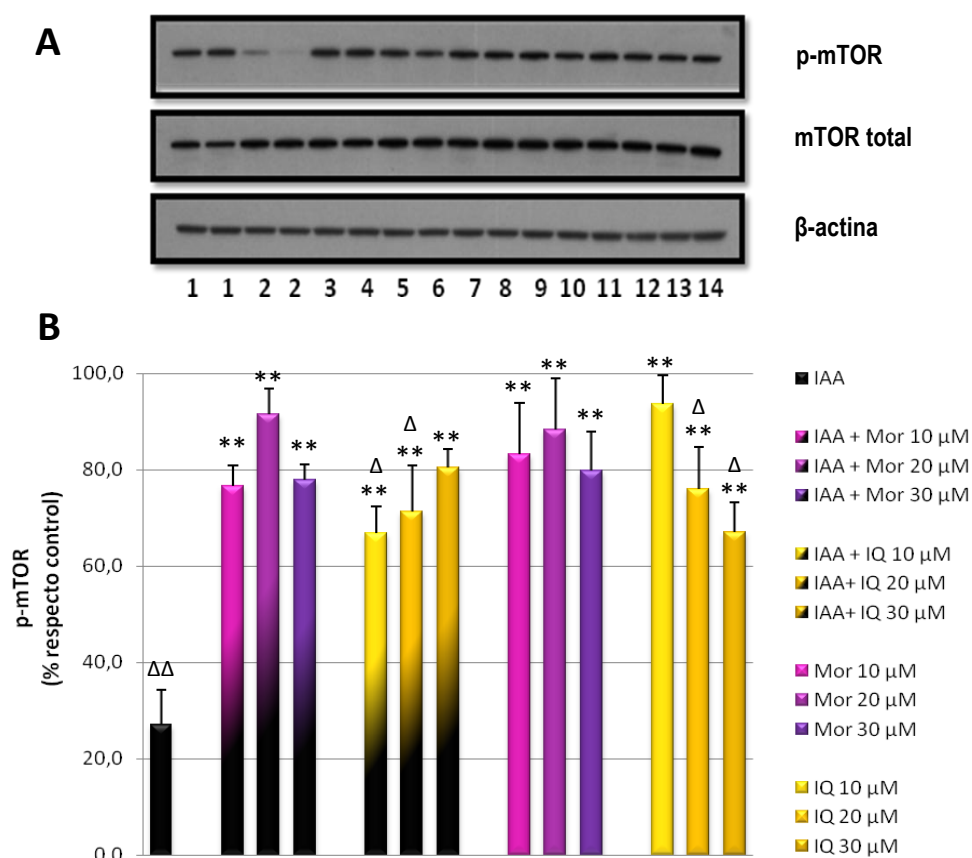


Figura 50. (A) Imagen representativa de western-blot de p-mTOR, mTOR total y β-actina (control de carga): 1. Control; 2. IAA; 3. IAA + Mor 10 μM; 4. IAA + Mor 20 μM; 5. IAA + Mor 30 μM; 6. IAA + IQ 10 μM; 7. IAA + IQ 20 μM; 8. IAA + IQ 30 μM; 9. Mor 10 μM; 10. Mor 20 μM; 11. Mor 30 μM; 12. IQ 10 μM; 13. IQ 20 μM; 14. IQ 30 μM. **(B)** Análisis densitométrico de p-mTOR. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética ± error estándar medio (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. ΔΔp<0,001; Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

En la figura 50 se observa que el tratamiento de las células con IAA produce un descenso drástico de la defosforilación de mTOR de aproximadamente el 70% ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina o isoquercitrina experimentan un aumento muy sobresaliente de la fosforilación de mTOR, entre el 40-60%, respecto del tratamiento exclusivo con IAA ($p < 0,001$).

En el tratamiento con morina de células HT22, no sometidas a estrés químico, se observa un patrón muy similar en los niveles de p-mTOR con respecto a las células expuestas a IAA en concomitancia con morina. Los descensos ligeros que se aprecian en los niveles de p-mTOR por el tratamiento con morina, en relación a las células control, no son significativos para ninguna de las concentraciones ensayadas. Sin embargo, aunque el tratamiento de células intactas con isoquercitrina no ejerce ningún cambio significativo en los niveles de p-mTOR a la menor concentración, sí se aprecia un descenso a las concentraciones de 20 y 30 μM ($p < 0,01$), respecto de las células control.

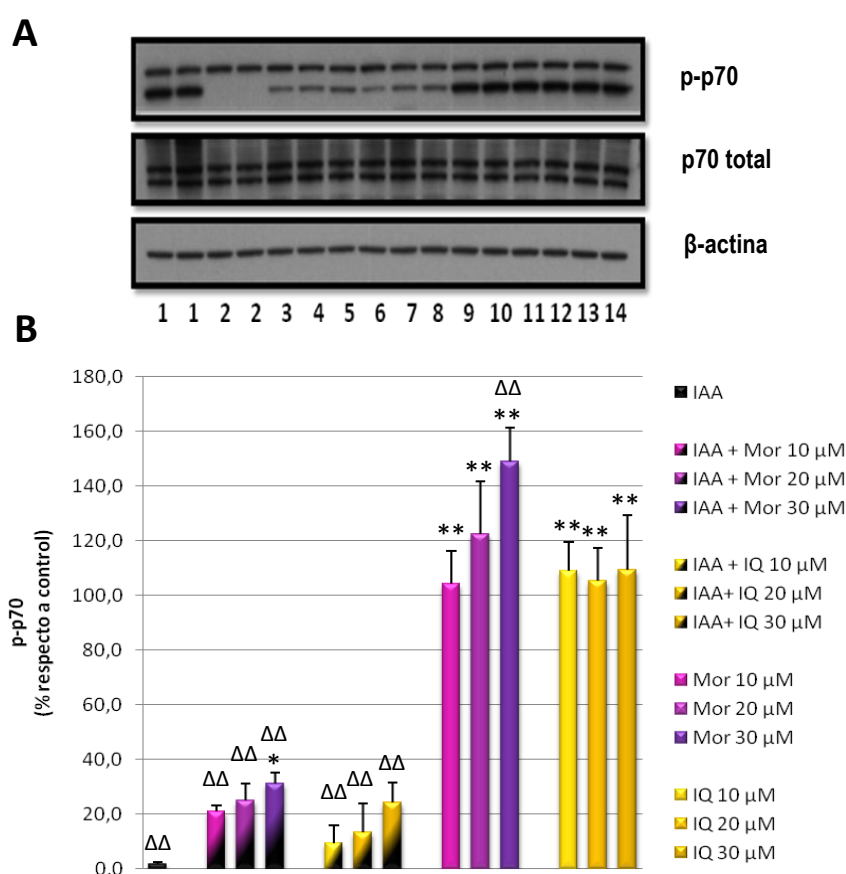


Figura 51. (A) Imagen representativa de western-blot de p-p70S4K, p70S4K total y β -actina (control de carga): 1. Control; 2. IAA; 3. IAA + Mor 10 μM ; 4. IAA + Mor 20 μM ; 5. IAA + Mor 30 μM ; 6. IAA + IQ 10 μM ; 7. IAA + IQ 20 μM ; 8. IAA + IQ 30 μM ; 9. Mor 10 μM ; 10. Mor 20 μM ; 11. Mor 30 μM ; 12. IQ 10 μM ; 13. IQ 20 μM ; 14. IQ 30 μM . **(B)** Análisis densitométrico de p-p70S4K. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética $\pm$ error estándar medio (Test de Newman-Keuls: ** $p < 0,001$; * $p < 0,01$ respecto de células tratadas con IAA. $\Delta\Delta p < 0,001$; $\Delta p < 0,01$ respecto de células control sin tratamiento).

Se puede observar en la figura 51 que el tratamiento de las células con IAA produce una defosforilación completa de p70 ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina o isoquercitrina experimentan un ligero aumento de la fosforilación de p70, que sólo es significativo para la mayor concentración de morina (30 μM), respecto del tratamiento exclusivo con IAA ($p < 0,01$).

En ausencia de estrés químico con IAA, el tratamiento de células HT22 con morina produce un incremento significativo de los niveles de p-p70 superior al 40% con respecto a las células control ($p < 0,001$), a la concentración superior ensayada. El tratamiento con isoquercitrina, sin embargo, no produce cambios significativos en la fosforilación de p70 con respecto a las células control.

Paradójicamente, aunque la autofagia constituye principalmente un proceso protector para la célula, también puede jugar un papel en la muerte celular. La muerte celular autofágica se ha denominado muerte celular tipo II, y es uno de los principales tipos de muerte celular junto con la muerte celular apoptótica (tipo I) y la muerte celular necrótica (tipo III). La activación de la señalización autofágica se ha observado en el cerebro isquémico mediando la muerte neuronal isquémica, y la disfunción autofágica se asocia con neurodegeneración y envejecimiento, entre otros procesos. En particular, el eje PI3K/Akt/mTOR juega un papel importante en la inhibición de la autofagia, y la inhibición de mTOR es una forma de activarla (Wang, Li *et al.*, 2016). Para investigar el efecto de morina e isoquercitrina en la vía de señalización autofágica, se determinaron los niveles de fosfo-mTOR (p-mTOR) y fosfo-p70S4K (p-p70S4K). La isquemia por IAA inhibió los niveles fosforilados de mTOR, pero esta inhibición fue revertida por morina e isoquercitrina. Del mismo modo, las reducciones en los niveles de p-p70S4K en las células isquémicas también fueron revertidas por ambos flavonoles, aunque muy levemente. En conjunto, estos hallazgos apoyan el papel modulador de morina e isoquercitrina en la autofagia en células isquémicas. En definitiva, la vía mTOR fue significativamente influenciada por la isquemia e invertida por morina e isoquercitrina.

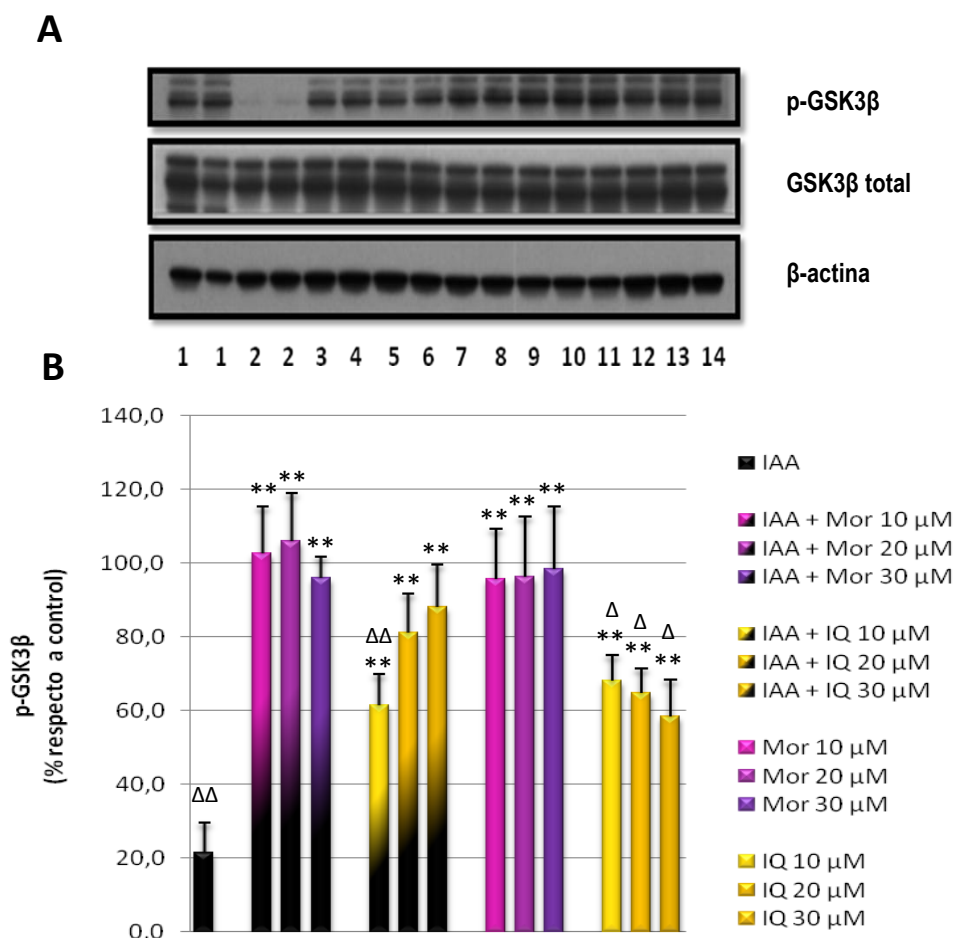


Figura 52. (A) Imagen representativa de western-blot de p-GSK3β, GSK3β total y β-actina (control de carga): **1.** Control; **2.** IAA; **3.** IAA + Mor 10 μM; **4.** IAA + Mor 20 μM; **5.** IAA + Mor 30 μM; **6.** IAA + IQ 10 μM; **7.** IAA + IQ 20 μM; **8.** IAA + IQ 30 μM; **9.** Mor 10 μM; **10.** Mor 20 μM; **11.** Mor 30 μM; **12.** IQ 10 μM; **13.** IQ 20 μM; **14.** IQ 30 μM. **(B)** Análisis densitométrico de p-GSK3β. Los resultados de densitometría se expresan como la media aritmética ± error estándar medio (Test de Newman-Keuls: **p<0,001; *p<0,01 respecto de células tratadas con IAA. ΔΔp<0,001; Δp<0,01 respecto de células control sin tratamiento).

De acuerdo con la figura 52, se observa que el tratamiento de las células con IAA produce un descenso de la fosforilación de GSK3β de aproximadamente el 80% respecto de las células control ($p < 0,001$). Las células sometidas a isquemia química con IAA y tratadas con morina evitan la defosforilación de GSK3β alcanzando niveles de pGSK3β similares a los de las células control. Aunque en menor magnitud, el tratamiento con isoquercitrina también previene la defosforilación de GSK3β, sobre todo a las concentraciones de 20 y 30 μM, mostrando unos niveles de pGSK3β próximos a los de las células control.

En ausencia de estrés químico con IAA, el tratamiento de células HT22 con morina no produce modificaciones significativas de los niveles de pGSK3 β con respecto a las células control, y leves en el caso de isoquercitrina.

GSK-3 β es un regulador negativo multifactorial del ciclo celular que también desempeña un papel en la señalización de la muerte/supervivencia celular, así como en el control de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) en situaciones de depleción energética celular. La investigación ha sugerido que los inhibidores de GSK-3 β pueden ejercer protección celular frente a la apoptosis asociada al estrés del retículo endoplásmico (RE). Sin embargo, el mecanismo subyacente por el que GSK-3 β promueve la apoptosis celular a través del estrés del RE no está totalmente esclarecido. Los posibles mecanismos que se han propuesto en la protección de los inhibidores de GSK-3 β incluyen la inhibición de la activación de Bax o una disminución en los niveles de Ca²⁺ intracelular. De cualquier forma, el aumento de las evidencias sugiere que la vía de señalización de Akt/GSK-3 β juega un papel importante en la patogénesis de la lesión cerebral isquémica. Y así, la activación de Akt puede conducir a la fosforilación del efector GSK-3 β , que se considera un factor clave en la regulación de la señalización mitocondrial y la apoptosis celular durante la isquemia cerebral. Valerio y colaboradores (Valerio, Bertolotti *et al.*, 2011) demostraron que el inhibidor SB216763 de GSK-3 reducía el daño cerebral isquémico, restaurando la biogénesis mitocondrial dañada y previniendo la producción de ERO en el accidente cerebrovascular isquémico.

Finalmente, resulta interesante añadir que la vía del factor de transcripción Nrf2, que se encuentra involucrada en la protección frente al estrés oxidativo en la isquemia cerebral, es regulada a la baja por la quinasa GSK-3 (Chen, Liu *et al.*, 2016, Li, Zhu *et al.*, 2016).

Por tanto, es probable que la inactivación de GSK-3 β por morina e isoquercitrina favorezca el proceso de fosforilación oxidativa, impulsado por Nrf2 como ya se explicó anteriormente, y eleve el umbral para la apoptosis inducida por IAA en nuestro modelo experimental.

Las rutas de señalización analizadas fueron principalmente la vía de las quinasas MAP (MAPK) y la vía de PI3K/Akt/mTOR por su estrecha asociación con la supervivencia post-isquémica (Zhao, Sapolsky *et al.*, 2006, Mehta, Manhas *et al.*, 2007, Liu, Wu *et al.*, 2010).

Tanto ERK como Akt (Ser473) sufren una severa defosforilación cuando las células son expuestas al IAA, la cual se evita parcialmente mediante el tratamiento con morina o isoquercitrina (figuras 46 y 49). La capacidad de moléculas con estructura flavonoide, incluidas morina e isoquercitrina, para prevenir la inactivación de Akt y ERK frente a distintos agentes tóxicos ya ha sido descrita con anterioridad (Spencer, 2008, Campos-Esparza, Sanchez-Gomez *et al.*, 2009, Zhu, Li *et al.*, 2016), pero no se había demostrado hasta ahora dicha actividad con morina e isoquercitrina en un modelo de isquemia *in vitro*. El efecto *in vitro* que hemos observado se corresponde con el de otros compuestos que han mostrado ser efectivos en la prevención *in vivo* de daños post-isquémicos (Lapchak, Schubert *et al.*, 2011, Geng, Li *et al.*, 2016).

Por otro lado, en los tratamientos exclusivamente con flavonol se aprecia una modulación de la fosforilación, tanto de Akt como de ERK. Dado que los componentes de la cascada de activación dependiente de MAPK (como es ERK) y de la cascada PI3K-Akt son importantes reguladores de la supervivencia neuronal, la modulación ejercida por morina e isoquercitrina, al igual que la de otros flavonoides (Schroeter, Spencer *et al.*, 2001), podría tener implicaciones en la homeostasia, la plasticidad neuronal o la potenciación de la memoria (Kong, Yu *et al.*, 2000, Spencer, 2008), procesos mucho más allá de los explorados en este estudio.

A partir de nuestras observaciones podemos interpretar que ambos flavonoles mantienen la fosforilación de mTOR, así como al menos parcialmente la de sus sustratos p70S6K y GSK3 β (figuras 50, 51 y 52). Evitar la inactivación de mTOR o fomentar su actividad podría ser muy efectivo frente a procesos isquémicos dada su participación en la regulación del crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular (Hwang y Kim, 2011, Maiese, 2014). Y así, estudios previos indican que la actividad mTOR previene el daño celular y favorece la supervivencia celular (Chong, Yao *et al.*, 2013, Weiner y Ducruet, 2015). Asimismo, la fosforilación (activación) de p70S6K promueve la síntesis proteica y el crecimiento celular, y protege frente a procesos apoptóticos incrementando el cociente Bcl-2/Bcl-xl, (Althausen, Mengesdorf *et al.*, 2001, Maiese, 2014). Por otro lado, mantener la fosforilación de GSK3, y por tanto su inhibición, también se ha relacionado con la neuroprotección en procesos isquémicos (Chuang, Wang *et al.*, 2011). En patologías neurodegenerativas, como la propia

EA, se ha observado que la actividad GSK3 β favorece la actividad γ -secretasa y la acumulación de péptido β A (Rezai-Zadeh, Douglas Shytle *et al.*, 2009).

Hemos puesto así de manifiesto que el tratamiento con morina o isoquercitrina incrementa la forma fosforilada de GSK-3 β , p-GSK-3 β (Ser9), y de una forma concentración dependiente con isoquercitrina. GSK-3 β se activa por defosforilación en Tyr216, y sufre inactivación por fosforilación en Ser9 (Wen, Huang *et al.*, 2015). Estos datos indican que morina e isoquercetina podrían regular negativamente la actividad de GSK-3 β mediante la fosforilación de la proteína. Puesto que la fosforilación de PSEN1 mediada por GSK-3 β modula su actividad, es posible que la inhibición ejercida por el flavonol sobre GSK-3 β reduzca la actividad de γ -secretasa.

La fosforilación de p38 y JNK está relacionada con la inducción de enzimas y la activación de factores de transcripción y citoquinas que están directamente implicados en la respuesta inflamatoria y en la apoptosis, como puede ser c-jun, Bcl-2 o Bak (Mehta, Manhas *et al.*, 2007, Nakka, Gusain *et al.*, 2008). Por tanto, la fosforilación de p38 y JNK es decisiva en rutas de estrés y muerte celular asociadas no sólo a procesos isquémicos sino también a patologías neurodegenerativas como la EA o la enfermedad de Huntington (Bozyczko-Coyne, Saporito *et al.*, 2002). En nuestros ensayos, tanto morina como isoquercitrina disminuyen la fosforilación de ambos marcadores desencadenada por el tratamiento con IAA (figuras 47 y 48). La inhibición o prevención de la activación de p38 y JNK podría proporcionar un efecto neuroprotector y favorecer la supervivencia en modelos de isquemia (Barone, Irving *et al.*, 2001, Borsello, Clarke *et al.*, 2003, Cao, Viholainen *et al.*, 2005, Kuan y Burke, 2005).

En definitiva, en este modelo de isquemia química por IAA en la línea celular hipocampal HT22, proponemos que morina e isoquercitrina pueden modular vías de señalización que estimulan la biogénesis mitocondrial y promueven la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico, dando lugar a una mejora en el rendimiento respiratorio que proporcionaría una profunda resistencia a la lesión cerebral isquémica. Estas conclusiones se fundamentan en las observaciones realizadas en nuestro estudio y en las aportaciones de otros autores en investigación de isquemia cerebral:

- La capacidad de activación del factor de transcripción Nrf2 por morina e isoquercitrina incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa y, por tanto, la síntesis de ATP, en la lesión isquémica neuronal por IAA.
- Tanto morina como isoquercitrina, en ausencia de IAA, podrían ejercer un pre-acondicionamiento celular que indujera tolerancia isquémica mediante un desacoplamiento mitocondrial moderado, con la finalidad de prevenir déficits energéticos neuronales.
- La inhibición de la vía de señalización de p38 MAP por morina e isoquercitrina atenúa la autofagia mitocondrial en la lesión isquémica neuronal por IAA para mantener la integridad mitocondrial.
- La inhibición de la vía de señalización de JNK por morina e isoquercitrina evita la muerte neuronal tanto por inhibición de la inducción transcripcional de genes promotores de muerte como por modulación de las vías de la apoptosis mitocondrial.
- La vía mTOR, significativamente abolida por la isquemia inducida con IAA, es recuperada por morina e isoquercitrina, modulando así la función de autofagia de las células HT22 isquémicas.
- La inactivación de GSK-3 β por morina e isoquercitrina evita la regulación a la baja del factor de transcripción Nrf2, favoreciendo así el proceso de fosforilación oxidativa en la lesión isquémica neuronal por IAA.

CONCLUSIONES

1. A partir de la evaluación de la actividad antiamiloidogénica *in vitro* de los cuatro flavonoides en estudio podemos concluir que, especialmente, los flavonoles morina e isoquercitrina mostraron:

1.1 Actividad inhibitoria de β -secretasa concentración-dependiente.

1.2 Actividad inhibitoria de γ -secretasa concentración-dependiente.

1.3 Un reseñable efecto inhibitorio de la agregación del péptido β -amiloide, así como un marcado efecto desagregante de las fibrillas preformadas de dicho péptido.

2. A partir del análisis del efecto neuroprotector de los flavonoides en diferentes modelos celulares de neurotoxicidad podemos concluir que:

2.1. Los cuatro flavonoides en estudio protegen frente a la muerte celular inducida por incremento intracelular de oligómeros de β -amiloide en la línea de neuroblastoma MC65, aunque la magnitud de la protección es mayor con morina e isoquercitrina.

2.2. Los cuatro flavonoides en estudio protegen frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y que sobreexpresa la APPswe humana, aunque en mayor grado en el caso de morina e isoquercitrina. La magnitud de la protección neuronal se hizo evidente por la disminución de la generación intracelular de radicales libres, la modulación de la actividad proteasomal y la atenuación de la activación de caspasa 3 y caspasa 9.

2.3. Los flavonoles morina e isoquercitrina poseen capacidad de protección frente a la apoptosis celular inducida por glutamato.

2.4. Morina e isoquercitrina poseen capacidad de protección frente a la isquemia neuronal inducida por ácido yodoacético, probablemente dependiente de la activación de vías de señalización que estimulan la biogénesis mitocondrial y promueven la actividad de los complejos de la cadena de transporte electrónico. Esta actividad parece depender de: a) la capacidad de activación del factor de transcripción Nrf2; b) la capacidad de ejercer un desacoplamiento mitocondrial moderado; c) la inhibición de la vía de señalización de p38 MAP; d) la inhibición de la vía de señalización de JNK; e) la activación de la vía mTOR; y f) la inactivación de GSK-3 β .

Como conclusión final, se puede señalar que los flavonoles morina e isoquercitrina han demostrado propiedades antiamiloidogénicas, antioxidantes, antiapoptóticas y reguladoras de la función mitocondrial, en diferentes paradigmas experimentales que reproducen algún rasgo fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abd El Mohsen, M. M., Kuhnle, G., Rechner, A. R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P. y Rice-Evans, C. A. (2002). "Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion." Free Radic Biol Med 33(12): 1693-1702.
- Abraha, A., Ghoshal, N., Gamblin, T. C., Cryns, V., Berry, R. W., Kuret, J. y Binder, L. I. (2000). "C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease." J Cell Sci 113 Pt 21: 3737-3745.
- Agrawal, P. y Schneider, H.-J. (1983). "Protonation induced ¹³C NMR shifts in phenols and flavonoids." Tetrahedron Lett 24: 177-180.
- Akama, K. T., Albanese, C., Pestell, R. G. y Van Eldik, L. J. (1998). "Amyloid beta-peptide stimulates nitric oxide production in astrocytes through an NFkappaB-dependent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A 95(10): 5795-5800.
- Akhter, R., Sanphui, P., Das, H., Saha, P. y Biswas, S. C. (2015). "The regulation of p53 up-regulated modulator of apoptosis by JNK/c-Jun pathway in beta-amyloid-induced neuron death." J Neurochem 134(6): 1091-1103.
- Aksenov, M. Y., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., Geddes, J. W. y Markesbery, W. R. (2001). "Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease." Neuroscience 103(2): 373-383.
- Alessandrini, A., Namura, S., Moskowitz, M. A. y Bonventre, J. V. (1999). "MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia." Proc Natl Acad Sci U S A 96(22): 12866-12869.
- Ali, F. E., Separovic, F., Barrow, C. J., Cherny, R. A., Fraser, F., Bush, A. I., Masters, C. L. y Barnham, K. J. (2005). "Methionine regulates copper/hydrogen peroxide oxidation products of Abeta." J Pept Sci 11(6): 353-360.
- Alonso Vilatela, M. E., Lopez-Lopez, M. y Yescas-Gomez, P. (2012). "Genetics of Alzheimer's disease." Arch Med Res 43(8): 622-631.
- Althausen, S., Mengesdorf, T., Mies, G., Olah, L., Nairn, A. C., Proud, C. G. y Paschen, W. (2001). "Changes in the phosphorylation of initiation factor eIF-2alpha, elongation factor eEF-2 and p70 S6 kinase after transient focal cerebral ischaemia in mice." J Neurochem 78(4): 779-787.

- Altunoglu, E., Guntas, G., Erdenen, F., Akkaya, E., Topac, I., Irmak, H., Derici, H., Yavuzer, H., Gelisgen, R. y Uzun, H. (2015). "Ischemia-modified albumin and advanced oxidation protein products as potential biomarkers of protein oxidation in Alzheimer's disease." Geriatr Gerontol Int 15(7): 872-880.
- Alzheimer's-Association (2016). "2016 Alzheimer's Disease Facts and Figures." Alzheimer's & Dementia 12(4).
- Amit, T., Avramovich-Tirosh, Y., Youdim, M. B. y Mandel, S. (2008). "Targeting multiple Alzheimer's disease etiologies with multimodal neuroprotective and neurorestorative iron chelators." FASEB J 22(5): 1296-1305.
- Andres-Lacueva, C., Shukitt-Hale, B., Galli, R. L., Jauregui, O., Lamuela-Raventos, R. M. y Joseph, J. A. (2005). "Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory." Nutr Neurosci 8(2): 111-120.
- Ansari, M. A., Abdul, H. M., Joshi, G., Opii, W. O. y Butterfield, D. A. (2009). "Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease." J Nutr Biochem 20(4): 269-275.
- Arbor, S. C., LaFontaine, M. y Cumbay, M. (2016). "Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores." Yale J Biol Med 89(1): 5-21.
- Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. A., Blasina, F., Antunez, K., Jones, D. P., Go, Y. M., Liang, Y. L. y Dajas, F. (2010). "After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult." Free Radic Biol Med 49(5): 738-747.
- Arun, S., Liu, L. y Donmez, G. (2016). "Mitochondrial Biology and Neurological Diseases." Curr Neuropharmacol 14(2): 143-154.
- Awasthi, M., Singh, S., Pandey, V. P. y Dwivedi, U. N. (2016). "Alzheimer's disease: An overview of amyloid beta dependent pathogenesis and its therapeutic implications along with in silico approaches emphasizing the role of natural products." J Neurol Sci 361: 256-271.

B

- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D. y Jones, E. (2011). "Alzheimer's disease." The Lancet 377(9770): 1019-1031.
- Barberger-Gateau, P., Raffaitin, C., Letenneur, L., Berr, C., Tzourio, C., Dartigues, J. F. y Alperovitch, A. (2007). "Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study." Neurology 69(20): 1921-1930.
- Barone, F. C., Irving, E. A., Ray, A. M., Lee, J. C., Kassis, S., Kumar, S., Badger, A. M., Legos, J. J., Erhardt, J. A., Ohlstein, E. H., Hunter, A. J., Harrison, D. C., Philpott, K., Smith, B. R., Adams, J. L. y Parsons, A. A. (2001). "Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia." Med Res Rev 21(2): 129-145.
- Bartzokis, G. y Tishler, T. A. (2000). "MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 46(4): 821-833.
- Ben Halima, S., Mishra, S., Raja, K. M., Willem, M., Baici, A., Simons, K., Brustle, O., Koch, P., Haass, C., Caflisch, A. y Rajendran, L. (2016). "Specific Inhibition of beta-Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein." Cell Rep 14(9): 2127-2141.
- Benakis, C., Bonny, C. y Hirt, L. (2010). "JNK inhibition and inflammation after cerebral ischemia." Brain Behav Immun 24(5): 800-811.
- Bhakta-Guha, D. y Efferth, T. (2015). "Hormesis: Decoding Two Sides of the Same Coin." Pharmaceuticals (Basel) 8(4): 865-883.
- Bhullar, K. S. y Rupasinghe, H. P. (2015). "Antioxidant and cytoprotective properties of partridgeberry polyphenols." Food Chem 168: 595-605.
- Bolognesi, M. L., Bartolini, M., Tarozzi, A., Morroni, F., Lizzi, F., Milelli, A., Minarini, A., Rosini, M., Hrelia, P., Andrisano, V. y Melchiorre, C. (2011). "Multitargeted drugs discovery: balancing anti-amyloid and anticholinesterase capacity in a single chemical entity." Bioorg Med Chem Lett 21(9): 2655-2658.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. y Edelstein, S. J. (1996). Protein methods. New York, Wiley-Liss.

- Bonda, D. J., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A. y Zhu, X. (2010). "Mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease: opportunities for future treatment strategies." Drugs Aging 27(3): 181-192.
- Bonet-Costa, V., Pomatto, L. C. y Davies, K. J. (2016). "The Proteasome and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease." Antioxid Redox Signal.
- Borradaile, N. M. y Pickering, J. G. (2009). "NAD(+), sirtuins, and cardiovascular disease." Curr Pharm Des 15(1): 110-117.
- Borsello, T., Clarke, P. G., Hirt, L., Vercelli, A., Repici, M., Schorderet, D. F., Bogousslavsky, J. y Bonny, C. (2003). "A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia." Nat Med 9(9): 1180-1186.
- Bozner, P., Grishko, V., LeDoux, S. P., Wilson, G. L., Chyan, Y. C. y Pappolla, M. A. (1997). "The amyloid beta protein induces oxidative damage of mitochondrial DNA." J Neuropathol Exp Neurol 56(12): 1356-1362.
- Bozyczko-Coyne, D., Saporito, M. S. y Hudkins, R. L. (2002). "Targeting the JNK pathway for therapeutic benefit in CNS disease." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 1(1): 31-49.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.
- Bush, K. T., Goldberg, A. L. y Nigam, S. K. (1997). "Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance." J Biol Chem 272(14): 9086-9092.
- Buss, G. D., Constantin, J., de Lima, L. C., Teodoro, G. R., Comar, J. F., Ishii-Iwamoto, E. L. y Bracht, A. (2005). "The action of quercetin on the mitochondrial NADH to NAD(+) ratio in the isolated perfused rat liver." Planta Med 71(12): 1118-1122.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M. y Drake, J. (2002). "Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death." Neurobiol Aging 23(5): 655-664.
- Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C. y Castegna, A. (2001). "Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide." Trends Mol Med 7(12): 548-554.

- Butterfield, D. A., Perluigi, M. y Sultana, R. (2006). "Oxidative stress in Alzheimer's disease brain: new insights from redox proteomics." Eur J Pharmacol 545(1): 39-50.
- Butterfield, D. A., Swomley, A. M. y Sultana, R. (2013). "Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression." Antioxid Redox Signal 19(8): 823-835.
- Byun, H. O., Kim, H. Y., Lim, J. J., Seo, Y. H. y Yoon, G. (2008). "Mitochondrial dysfunction by complex II inhibition delays overall cell cycle progression via reactive oxygen species production." J Cell Biochem 104(5): 1747-1759.

C

- Cacace, R., Slegers, K. y Van Broeckhoven, C. (2016). "Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited." Alzheimers Dement 12(6): 733-748.
- Cafe, C., Torri, C., Bertorelli, L., Angeretti, N., Lucca, E., Forloni, G. y Marzatico, F. (1996). "Oxidative stress after acute and chronic application of beta-amyloid fragment 25-35 in cortical cultures." Neurosci Lett 203(1): 61-65.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L. y Wong, P. C. (2001). "BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons." Nat Neurosci 4(3): 233-234.
- Campos-Esparza, M. R., Sanchez-Gomez, M. V. y Matute, C. (2009). "Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols." Cell Calcium 45(4): 358-368.
- Cao, J., Viholainen, J. I., Dart, C., Warwick, H. K., Leyland, M. L. y Courtney, M. J. (2005). "The PSD95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death." J Cell Biol 168(1): 117-126.
- Carney, J. M., Smith, C. D., Carney, A. M. y Butterfield, D. A. (1994). "Aging- and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior." Ann N Y Acad Sci 738: 44-53.
- Carrasco-Pozo, C., Mizgier, M. L., Speisky, H. y Gotteland, M. (2012). "Differential protective effects of quercetin, resveratrol, rutin and epigallocatechin gallate against mitochondrial dysfunction induced by indomethacin in Caco-2 cells." Chem Biol Interact 195(3): 199-205.

- Casley, C. S., Land, J. M., Sharpe, M. A., Clark, J. B., Duchen, M. R. y Canevari, L. (2002). "Beta-amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons." Neurobiol Dis 10(3): 258-267.
- Castellani, R. J., Rolston, R. K. y Smith, M. A. (2010). "Alzheimer disease." Dis Mon 56(9): 484-546.
- Castellano-Gonzalez, G., Pichaud, N., Ballard, J. W., Bessede, A., Marcal, H. y Guillemin, G. J. (2016). "Epigallocatechin-3-gallate induces oxidative phosphorylation by activating cytochrome c oxidase in human cultured neurons and astrocytes." Oncotarget 7(7): 7426-7440.
- Cekarini, V., Bonfili, L., Cuccioloni, M., Mozzicafreddo, M., Rossi, G., Keller, J. N., Angeletti, M. y Eleuteri, A. M. (2014). "Wild type and mutant amyloid precursor proteins influence downstream effects of proteasome and autophagy inhibition." Biochim Biophys Acta 1842(2): 127-134.
- Citron, M. (2010). "Alzheimer's disease: strategies for disease modification." Nat Rev Drug Discov 9(5): 387-398.
- Clark, R. A. (2008). "Oxidative stress and "senescent" fibroblasts in non-healing wounds as potential therapeutic targets." J Invest Dermatol 128(10): 2361-2364.
- Clark, T. A., Lee, H. P., Rolston, R. K., Zhu, X., Marlatt, M. W., Castellani, R. J., Nunomura, A., Casadesus, G., Smith, M. A., Lee, H. G. y Perry, G. (2010). "Oxidative Stress and its Implications for Future Treatments and Management of Alzheimer Disease." Int J Biomed Sci 6(3): 225-227.
- Commenges, D., Scotet, V., Renaud, S., Jacqmin-Gadda, H., Barberger-Gateau, P. y Dartigues, J. F. (2000). "Intake of flavonoids and risk of dementia." Eur J Epidemiol 16(4): 357-363.
- Connor, J. R., Tucker, P., Johnson, M. y Snyder, B. (1993). "Ceruloplasmin levels in the human superior temporal gyrus in aging and Alzheimer's disease." Neurosci Lett 159(1-2): 88-90.
- Constantin, R. P., Constantin, J., Pagadigorria, C. L., Ishii-Iwamoto, E. L., Bracht, A., de Castro, C. V. y Yamamoto, N. S. (2011). "Prooxidant activity of fisetin: effects on energy metabolism in the rat liver." J Biochem Mol Toxicol 25(2): 117-126.

-
- Copanaki, E., Chang, S., Vlachos, A., Tschape, J. A., Muller, U. C., Kogel, D. y Deller, T. (2010). "sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress." Mol Cell Neurosci 44(4): 386-393.
 - Corbett, G. T., Gonzalez, F. J. y Pahan, K. (2015). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha stimulates ADAM10-mediated proteolysis of APP." Proc Natl Acad Sci U S A 112(27): 8445-8450.
 - Coric, V., Salloway, S., van Dyck, C. H., Dubois, B., Andreasen, N., Brody, M., Curtis, C., Soininen, H., Thein, S., Shiovitz, T., Pilcher, G., Ferris, S., Colby, S., Kerselaers, W., Dockens, R., Soares, H., Kaplita, S., Luo, F., Pachai, C., Bracoud, L., Mintun, M., Grill, J. D., Marek, K., Seibyl, J., Cedarbaum, J. M., Albright, C., Feldman, H. H. y Berman, R. M. (2015). "Targeting Prodromal Alzheimer Disease With Avagacestat: A Randomized Clinical Trial." JAMA Neurol 72(11): 1324-1333.
 - Cornett, C. R., Markesbery, W. R. y Ehmann, W. D. (1998). "Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain." Neurotoxicology 19(3): 339-345.
 - Coskun, P. E., Beal, M. F. y Wallace, D. C. (2004). "Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication." Proc Natl Acad Sci U S A 101(29): 10726-10731.
 - Cotman, C. W., Poon, W. W., Rissman, R. A. y Blurton-Jones, M. (2005). "The role of caspase cleavage of tau in Alzheimer disease neuropathology." J Neuropathol Exp Neurol 64(2): 104-112.
 - Croteau, D. L. y Bohr, V. A. (1997). "Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells." J Biol Chem 272(41): 25409-25412.
 - Currais, A., Chiruta, C., Goujon-Svrzic, M., Costa, G., Santos, T., Batista, M. T., Paiva, J., do Ceu Madureira, M. y Maher, P. (2014). "Screening and identification of neuroprotective compounds relevant to Alzheimers disease from medicinal plants of S. Tome e Principe." J Ethnopharmacol 155(1): 830-840.
 - Chan, T. S., Galati, G., Pannala, A. S., Rice-Evans, C. y O'Brien, P. J. (2003). "Simultaneous detection of the antioxidant and pro-oxidant activity of dietary polyphenolics in a peroxidase system." Free Radic Res 37(7): 787-794.
 - Chen, G., Ye, X., Zhang, J., Tang, T., Li, L., Lu, P., Wu, Q., Yu, B. y Kou, J. (2016). "Limb Remote Ischemic Postconditioning Reduces Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting

NADPH Oxidase Activation and MyD88-TRAF6-P38MAP-Kinase Pathway of Neutrophils." Int J Mol Sci 17(12).

- Chen, H., Xiong, T., Qu, Y., Zhao, F., Ferriero, D. y Mu, D. (2012). "mTOR activates hypoxia-inducible factor-1alpha and inhibits neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia." Neurosci Lett 507(2): 118-123.
- Chen, X., Liu, Y., Zhu, J., Lei, S., Dong, Y., Li, L., Jiang, B., Tan, L., Wu, J., Yu, S. y Zhao, Y. (2016). "GSK-3beta downregulates Nrf2 in cultured cortical neurons and in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion." Sci Rep 6: 20196.
- Cheng, A., Hou, Y. y Mattson, M. P. (2010). "Mitochondria and neuroplasticity." ASN Neuro 2(5): e00045.
- Cheng, B., Anand, P., Kuang, A., Akhtar, F. y Scofield, V. L. (2016). "N-Acetylcysteine in Combination with IGF-1 Enhances Neuroprotection against Proteasome Dysfunction-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells." Parkinsons Dis 2016: 6564212.
- Chojnacki, J. E., Liu, K., Saathoff, J. M. y Zhang, S. (2015). "Bivalent ligands incorporating curcumin and diosgenin as multifunctional compounds against Alzheimer's disease." Bioorg Med Chem 23(22): 7324-7331.
- Chondrogianni, N., Voutetakis, K., Kapetanou, M., Delitsikou, V., Papaevgeniou, N., Sakellari, M., Lefaki, M., Filippopoulou, K. y Gonos, E. S. (2015). "Proteasome activation: An innovative promising approach for delaying aging and retarding age-related diseases." Ageing Res Rev 23(Pt A): 37-55.
- Chong, Z. Z., Yao, Q. y Li, H. H. (2013). "The rationale of targeting mammalian target of rapamycin for ischemic stroke." Cell Signal 25(7): 1598-1607.
- Chou, A. P., Li, S., Fitzmaurice, A. G. y Bronstein, J. M. (2010). "Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition." Neurotoxicology 31(4): 367-372.
- Chouraki, V. y Seshadri, S. (2014). "Genetics of Alzheimer's disease." Adv Genet 87: 245-294.
- Chuang, D. M., Wang, Z. y Chiu, C. T. (2011). "GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke." Front Mol Neurosci 4: 15.

D

- Chung, C. W., Song, Y. H., Kim, I. K., Yoon, W. J., Ryu, B. R., Jo, D. G., Woo, H. N., Kwon, Y. K., Kim, H. H., Gwag, B. J., Mook-Jung, I. H. y Jung, Y. K. (2001). "Proapoptotic effects of tau cleavage product generated by caspase-3." Neurobiol Dis 8(1): 162-172.
- D'Onofrio, G., Panza, F., Frisardi, V., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Paroni, G., Cascavilla, L., Seripa, D. y Pilotto, A. (2012). "Advances in the identification of gamma-secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease." Expert Opin Drug Discov 7(1): 19-37.
- Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C. y Larson, E. B. (2006). "Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame Project." Am J Med 119(9): 751-759.
- Dajas, F., Rivera-Megret, F., Blasina, F., Arredondo, F., Abin-Carriquiry, J. A., Costa, G., Echeverry, C., Lafon, L., Heizen, H., Ferreira, M. y Morquio, A. (2003). "Neuroprotection by flavonoids." Braz J Med Biol Res 36(12): 1613-1620.
- Dantuma, N. P. y Bott, L. C. (2014). "The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution." Front Mol Neurosci 7: 70.
- Datla, K. P., Christidou, M., Widmer, W. W., Rooprai, H. K. y Dexter, D. T. (2001). "Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease." Neuroreport 12(17): 3871-3875.
- Davis, J. B. y Maher, P. (1994). "Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line." Brain Res 652(1): 169-173.
- de Oliveira, M. R., Nabavi, S. M., Braidy, N., Setzer, W. N., Ahmed, T. y Nabavi, S. F. (2016). "Quercetin and the mitochondria: A mechanistic view." Biotechnol Adv 34(5): 532-549.
- Deardorff, W. J., Shobassy, A. y Grossberg, G. T. (2015). "Safety and clinical effects of EVP-6124 in subjects with Alzheimer's disease currently or previously receiving an acetylcholinesterase inhibitor medication." Expert Rev Neurother 15(1): 7-17.
- Dei, R., Takeda, A., Niwa, H., Li, M., Nakagomi, Y., Watanabe, M., Inagaki, T., Washimi, Y., Yasuda, Y., Horie, K., Miyata, T. y Sobue, G. (2002). "Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol 104(2): 113-122.

- Deibel, M. A., Ehmann, W. D. y Markesbery, W. R. (1996). "Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress." J Neurol Sci 143(1-2): 137-142.
- Delabio, R., Rasmussen, L., Mizumoto, I., Viani, G. A., Chen, E., Villares, J., Costa, I. B., Turecki, G., Linde, S. A., Smith, M. C. y Payao, S. L. (2014). "PSEN1 and PSEN2 gene expression in Alzheimer's disease brain: a new approach." J Alzheimers Dis 42(3): 757-760.
- DeMartino, G. N. (2005). "Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome." Methods Enzymol 398: 295-306.
- Dennissen, F. J., Kholod, N. y van Leeuwen, F. W. (2012). "The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: culprit, accomplice or victim?" Prog Neurobiol 96(2): 190-207.
- Devi, L. y Ohno, M. (2012). "Mitochondrial dysfunction and accumulation of the beta-secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice." Neurobiol Dis 45(1): 417-424.
- Deyts, C., Thinakaran, G. y Parent, A. T. (2016). "APP Receptor? To Be or Not To Be." Trends Pharmacol Sci 37(5): 390-411.
- DiCiero Miranda, M., de Bruin, V. M., Vale, M. R. y Viana, G. S. (2000). "Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer's disease." Gerontology 46(4): 179-184.
- Dinamarca, M. C., Sagal, J. P., Quintanilla, R. A., Godoy, J. A., Arrazola, M. S. y Inestrosa, N. C. (2010). "Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the Abeta peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease." Mol Neurodegener 5: 4.
- Ding, Q. y Keller, J. N. (2001). "Proteasome inhibition in oxidative stress neurotoxicity: implications for heat shock proteins." J Neurochem 77(4): 1010-1017.
- Dingwall, C. (2001). "Spotlight on BACE: the secretases as targets for treatment in Alzheimer disease." J Clin Invest 108(9): 1243-1246.
- Dinkova-Kostova, A. T. y Abramov, A. Y. (2015). "The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function." Free Radic Biol Med 88(Pt B): 179-188.

- Drake, J., Link, C. D. y Butterfield, D. A. (2003). "Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model." Neurobiol Aging 24(3): 415-420.

E

- Eckert, A., Steiner, B., Marques, C., Leutz, S., Romig, H., Haass, C. y Muller, W. E. (2001). "Elevated vulnerability to oxidative stress-induced cell death and activation of caspase-3 by the Swedish amyloid precursor protein mutation." J Neurosci Res 64(2): 183-192.
- Edkins, A. L. (2015). "CHIP: a co-chaperone for degradation by the proteasome." Subcell Biochem 78: 219-242.
- Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A. y Wanker, E. E. (2008). "EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers." Nat Struct Mol Biol 15(6): 558-566.
- Eleftheriadis, T. (2012). "The existence of two types of proteasome, the constitutive proteasome and the immunoproteasome, may serve as another layer of protection against autoimmunity." Med Hypotheses 78(1): 138-141.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. y Feather-Stone, R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity." Biochem Pharmacol 7: 88-95.
- Eminel, S., Klettner, A., Roemer, L., Herdegen, T. y Waetzig, V. (2004). "JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine." J Biol Chem 279(53): 55385-55392.
- Ermolieff, J., Loy, J. A., Koelsch, G. y Tang, J. (2000). "Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates." Biochemistry 39(40): 12450-12456.

F

- Fan, L. Y. y Chiu, M. J. (2010). "Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies." Acta Neurol Taiwan 19(4): 228-245.
- Fanutza, T., Del Prete, D., Ford, M. J., Castillo, P. E. y D'Adamio, L. (2015). "APP and APLP2 interact with the synaptic release machinery and facilitate transmitter release at hippocampal synapses." Elife 4: e09743.
- Faria, A., Meireles, M., Fernandes, I., Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Duenas, M., de Freitas, V., Mateus, N. y Calhau, C. (2014). "Flavonoid metabolites transport across a human BBB model." Food Chem 149: 190-196.
- Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., Azevedo, J., De Freitas, V., Mateus, N. y Calhau, C. (2010). "Flavonoid transport across RBE4 cells: A blood-brain barrier model." Cell Mol Biol Lett 15(2): 234-241.
- Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Pursglove, S. E., Bergman, A., Winblad, B. y Naslund, J. (2003). "Partial purification and characterization of gamma-secretase from post-mortem human brain." J Biol Chem 278(27): 24277-24284.
- Fiorani, M., Guidarelli, A., Blasa, M., Azzolini, C., Candiracci, M., Piatti, E. y Cantoni, O. (2010). "Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid." J Nutr Biochem 21(5): 397-404.
- Folch, J., Petrov, D., Ettcheto, M., Abad, S., Sanchez-Lopez, E., Garcia, M. L., Olloquequi, J., Beas-Zarate, C., Auladell, C. y Camins, A. (2016). "Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment." Neural Plast 2016: 8501693.
- Fonseca, A. C., Ferreira, E., Oliveira, C. R., Cardoso, S. M. y Pereira, C. F. (2013). "Activation of the endoplasmic reticulum stress response by the amyloid-beta 1-40 peptide in brain endothelial cells." Biochim Biophys Acta 1832(12): 2191-2203.
- Fraga, C. G., Galleano, M., Verstraeten, S. V. y Oteiza, P. I. (2010). "Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols." Mol Aspects Med 31(6): 435-445.
- Fraga, C. G. y Oteiza, P. I. (2011). "Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling." Free Radic Biol Med 51(4): 813-823.
- Fuentealba, R. A., Farias, G., Scheu, J., Bronfman, M., Marzolo, M. P. y Inestrosa, N. C. (2004). "Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease." Brain Res Brain Res Rev 47(1-3): 275-289.

- Fujii, H., Takahashi, T., Mukai, T., Tanaka, S., Hosomi, N., Maruyama, H., Sakai, N. y Matsumoto, M. (2016). "Modifications of tau protein after cerebral ischemia and reperfusion in rats are similar to those occurring in Alzheimer's disease - Hyperphosphorylation and cleavage of 4- and 3-repeat tau." J Cereb Blood Flow Metab.
- Fusco, S., Maulucci, G. y Pani, G. (2012). "Sirt1: def-eating senescence?" Cell Cycle 11(22): 4135-4146.

G

- Gahtan, E. y Overmier, J. B. (1999). "Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequeli." Neurosci Biobehav Rev 23(5): 615-633.
- Galasko, D. y Montine, T. J. (2010). "Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease." Biomark Med 4(1): 27-36.
- Galimberti, D. y Scarpini, E. (2012). "Progress in Alzheimer's disease." J Neurol 259(2): 201-211.
- Gamblin, T. C., Chen, F., Zambrano, A., Abraha, A., Lagalwar, S., Guillozet, A. L., Lu, M., Fu, Y., Garcia-Sierra, F., LaPointe, N., Miller, R., Berry, R. W., Binder, L. I. y Cryns, V. L. (2003). "Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 100(17): 10032-10037.
- Garcia-Ayllon, M. S., Silveyra, M. X. y Saez-Valero, J. (2008). "Association between acetylcholinesterase and beta-amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid." Chem Biol Interact 175(1-3): 209-215.
- Geng, X., Li, F., Yip, J., Peng, C., Elmadhoun, O., Shen, J., Ji, X. y Ding, Y. (2016). "Neuroprotection by Chlorpromazine and Promethazine in Severe Transient and Permanent Ischemic Stroke." Mol Neurobiol.
- Getchell, M. L., Shah, D. S., Buch, S. K., Davis, D. G. y Getchell, T. V. (2003). "3-Nitrotyrosine immunoreactivity in olfactory receptor neurons of patients with Alzheimer's disease: implications for impaired odor sensitivity." Neurobiol Aging 24(5): 663-673.
- Gohil, V. M., Sheth, S. A., Nilsson, R., Wojtovich, A. P., Lee, J. H., Perocchi, F., Chen, W., Clish, C. B., Ayata, C., Brookes, P. S. y Mootha, V. K. (2010). "Discovery and therapeutic potential of drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis." Nature biotechnology 28(3): 249-255.

- Golde, T. E., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Osborne, B. A. y Miele, L. (2013). "gamma-Secretase inhibitors and modulators." Biochim Biophys Acta 1828(12): 2898-2907.
- Goni-Oliver, P., Avila, J. y Hernandez, F. (2009). "Memantine inhibits calpain-mediated truncation of GSK-3 induced by NMDA: implications in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis 18(4): 843-848.
- González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I. y Elguero, J. (2015). "Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties." An Real Acad Farm 81(4): 278-310.
- Good, P. F., Perl, D. P., Bierer, L. M. y Schmeidler, J. (1992). "Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study." Ann Neurol 31(3): 286-292.
- Good, P. F., Werner, P., Hsu, A., Olanow, C. W. y Perl, D. P. (1996). "Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease." Am J Pathol 149(1): 21-28.
- Gotz, J., Eckert, A., Matamalas, M., Ittner, L. M. y Liu, X. (2011). "Modes of Abeta toxicity in Alzheimer's disease." Cell Mol Life Sci 68(20): 3359-3375.
- Gray, S. P. y Jandeleit-Dahm, K. A. (2015). "The role of NADPH oxidase in vascular disease--hypertension, atherosclerosis & stroke." Curr Pharm Des 21(41): 5933-5944.
- Gu, Y., Nieves, J. W., Stern, Y., Luchsinger, J. A. y Scarmeas, N. (2010). "Food combination and Alzheimer disease risk: a protective diet." Arch Neurol 67(6): 699-706.
- Guo, A. J., Xie, H. Q., Choi, R. C., Zheng, K. Y., Bi, C. W., Xu, S. L., Dong, T. T. y Tsim, K. W. (2010). "Galangin, a flavonol derived from Rhizoma Alpiniae Officinarum, inhibits acetylcholinesterase activity in vitro." Chem Biol Interact 187(1-3): 246-248.

H

- Haass, C., Lemere, C. A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L. y Selkoe, D. J. (1995). "The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway." Nat Med 1(12): 1291-1296.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M. (1984). "Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy." Lancet 1(8391): 1396-1397.
- Han, M. e Im, D. S. (2008). "Effects of mitochondrial inhibitors on cell viability in U937 monocytes under glucose deprivation." Arch Pharm Res 31(6): 749-757.

- Hanaki, M., Murakami, K., Akagi, K. y Irie, K. (2016). "Structural insights into mechanisms for inhibiting amyloid beta42 aggregation by non-catechol-type flavonoids." Bioorg Med Chem 24(2): 304-313.
- Hardy, J., Pittman, A., Myers, A., Fung, H. C., de Silva, R. y Duckworth, J. (2006). "Tangle diseases and the tau haplotypes." Alzheimer Dis Assoc Disord 20(1): 60-62.
- Harper, S. J. y Wilkie, N. (2003). "MAPKs: new targets for neurodegeneration." Expert Opin Ther Targets 7(2): 187-200.
- Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." Pharmacol Ther 96(2-3): 67-202.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. y Bobilya, D. J. (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships." J Nutr Biochem 13(10): 572-584.
- Ho, S. L., Poon, C. Y., Lin, C., Yan, T., Kwong, D. W., Yung, K. K., Wong, M. S., Bian, Z. y Li, H. W. (2015). "Inhibition of beta-amyloid Aggregation By Albiflorin, Aloeemodin And Neohesperidin And Their Neuroprotective Effect On Primary Hippocampal Cells Against beta-amyloid Induced Toxicity." Curr Alzheimer Res 12(5): 424-433.
- Holmstrom, K. M., Baird, L., Zhang, Y., Hargreaves, I., Chalasani, A., Land, J. M., Stanyer, L., Yamamoto, M., Dinkova-Kostova, A. T. y Abramov, A. Y. (2013). "Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration." Biol Open 2(8): 761-770.
- Holtzman, D. M., Morris, J. C. y Goate, A. M. (2011). "Alzheimer's disease: the challenge of the second century." Sci Transl Med 3(77): 77sr71.
- Hong, H. S., Maezawa, I., Yao, N., Xu, B., Diaz-Avalos, R., Rana, S., Hua, D. H., Cheng, R. H., Lam, K. S. y Jin, L. W. (2007). "Combining the rapid MTT formazan exocytosis assay and the MC65 protection assay led to the discovery of carbazole analogs as small molecule inhibitors of Abeta oligomer-induced cytotoxicity." Brain Res 1130(1): 223-234.
- Hong, S. y Pedersen, P. L. (2008). "ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas." Microbiol Mol Biol Rev 72(4): 590-641, Table of Contents.
- Hsu, G. W., Ober, M., Carell, T. y Beese, L. S. (2004). "Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase." Nature 431(7005): 217-221.

- Huang, X., Cuajungco, M. P., Atwood, C. S., Hartshorn, M. A., Tyndall, J. D., Hanson, G. R., Stokes, K. C., Leopold, M., Multhaup, G., Goldstein, L. E., Scarpa, R. C., Saunders, A. J., Lim, J., Moir, R. D., Glabe, C., Bowden, E. F., Masters, C. L., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E. y Bush, A. I. (1999). "Cu(II) potentiation of alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction." J Biol Chem 274(52): 37111-37116.
- Hwang, S. K. y Kim, H. H. (2011). "The functions of mTOR in ischemic diseases." BMB Rep 44(8): 506-511.
- Hwang, S. L., Shih, P. H. y Yen, G. C. (2012). "Neuroprotective effects of citrus flavonoids." J Agric Food Chem 60(4): 877-885.
- Hwang, S. L. y Yen, G. C. (2008). "Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells." J Agric Food Chem 56(3): 859-864.

I

- Ibarretxe, G., Sanchez-Gomez, M. V., Campos-Esparza, M. R., Alberdi, E. y Matute, C. (2006). "Differential oxidative stress in oligodendrocytes and neurons after excitotoxic insults and protection by natural polyphenols." Glia 53(2): 201-211.
- Ihara, Y., Morishima-Kawashima, M. y Nixon, R. (2012). "The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med 2(8).
- Iida, T., Furuta, A., Nishioka, K., Nakabeppu, Y. y Iwaki, T. (2002). "Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain." Acta Neuropathol 103(1): 20-25.
- Imbimbo, B. P. y Giardina, G. A. (2011). "gamma-secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes." Curr Top Med Chem 11(12): 1555-1570.
- Ishige, K., Schubert, D. y Sagara, Y. (2001). "Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms." Free Radic Biol Med 30(4): 433-446.

J

- Jellinger, K., Paulus, W., Grundke-Iqbal, I., Riederer, P. y Youdim, M. B. (1990). "Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer's diseases." J Neural Transm Park Dis Dement Sect 2(4): 327-340.

- Jeong, E. J., Hwang, L., Lee, M., Lee, K. Y., Ahn, M. J. y Sung, S. H. (2014). "Neuroprotective biflavonoids of *Chamaecyparis obtusa* leaves against glutamate-induced oxidative stress in HT22 hippocampal cells." Food Chem Toxicol 64: 397-402.
- Jimenez-Aliaga, K., Bermejo-Bescos, P., Benedi, J. y Martin-Aragon, S. (2011). "Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APPswe cells." Life Sci 89(25-26): 939-945.
- Joseph, J. A., Denisova, N. A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B. y Morgan, D. (2003). "Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model." Nutr Neurosci 6(3): 153-162.
- Jung, H. J., Kim, S. J., Song, Y. S., Park, E. H. y Lim, C. J. (2010). "Evaluation of the antiangiogenic, anti-inflammatory, and antinociceptive activities of morin." Planta Med 76(3): 273-275.
- Jung, S. H., Kim, B. J., Lee, E. H. y Osborne, N. N. (2010). "Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant *Thuja orientalis* and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells)." Neurochem Int 57(7): 713-721.
- Jung, T., Catalgol, B. y Grune, T. (2009). "The proteasomal system." Mol Aspects Med 30(4): 191-296.
- Jung, T., Engels, M., Kaiser, B., Poppek, D. y Grune, T. (2006). "Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress." Free Radic Biol Med 40(8): 1303-1312.
- Kandalepas, P. C. y Vassar, R. (2012). "Identification and biology of beta-secretase." J Neurochem 120 Suppl 1: 55-61.
- Karran, E., Mercken, M. y De Strooper, B. (2011). "The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics." Nat Rev Drug Discov 10(9): 698-712.
- Karuppagounder, S. S., Madathil, S. K., Pandey, M., Haobam, R., Rajamma, U. y Mohanakumar, K. P. (2013). "Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats." Neuroscience 236: 136-148.

K

- Katalinic, M., Rusak, G., Domacinovic Barovic, J., Sinko, G., Jelic, D., Antolovic, R. y Kovarik, Z. (2010). "Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase." Eur J Med Chem 45(1): 186-192.
- Kay, C. D., Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B. y Cassidy, A. (2012). "Relative impact of flavonoid composition, dose and structure on vascular function: a systematic review of randomised controlled trials of flavonoid-rich food products." Mol Nutr Food Res 56(11): 1605-1616.
- Keil, U., Bonert, A., Marques, C. A., Strosznajder, J. B., Muller-Spahn, F., Muller, W. E. y Eckert, A. (2004). "Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure." Pol J Pharmacol 56(5): 631-634.
- Keller, J. N., Hanni, K. B. y Markesbery, W. R. (2000). "Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress." Mech Ageing Dev 113(1): 61-70.
- Khan, M. T., Orhan, I., Senol, F. S., Kartal, M., Sener, B., Dvorska, M., Smejkal, K. y Slapetova, T. (2009). "Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies." Chem Biol Interact 181(3): 383-389.
- Khanam, H., Ali, A., Asif, M. y Shamsuzzaman (2016). "Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review." Eur J Med Chem.
- Kida, Y. y Goligorsky, M. S. (2016). "Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging." Can J Cardiol 32(5): 634-641.
- Kim, A., Nam, Y. J., Lee, M. S., Shin, Y. K., Sohn, D. S. y Lee, C. S. (2016). "Apigenin Reduces Proteasome Inhibition-Induced Neuronal Apoptosis by Suppressing the Cell Death Process." Neurochem Res 41(11): 2969-2980.
- Kim, H. S., Sul, D., Lim, J. Y., Lee, D., Joo, S. S., Hwang, K. W. y Park, S. Y. (2009). "Delphinidin ameliorates beta-amyloid-induced neurotoxicity by inhibiting calcium influx and tau hyperphosphorylation." Biosci Biotechnol Biochem 73(7): 1685-1689.
- Kim, S. W., Kim, C. E. y Kim, M. H. (2011). "Flavonoids inhibit high glucose-induced up-regulation of ICAM-1 via the p38 MAPK pathway in human vein endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun 415(4): 602-607.

- Knorre, D. A. y Severin, F. F. (2016). "Uncouplers of Oxidation and Phosphorylation as Antiaging Compounds." Biochemistry (Mosc) 81(12): 1438-1444.
- Kong, A. N., Yu, R., Chen, C., Mandlekar, S. y Primiano, T. (2000). "Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis." Arch Pharm Res 23(1): 1-16.
- Korolainen, M. A., Goldsteins, G., Alafuzoff, I., Koistinaho, J. y Pirttilä, T. (2002). "Proteomic analysis of protein oxidation in Alzheimer's disease brain." Electrophoresis 23(19): 3428-3433.
- Koronowski, K. B., Dave, K. R., Saul, I., Camarena, V., Thompson, J. W., Neumann, J. T., Young, J. I. y Perez-Pinzon, M. A. (2015). "Resveratrol Preconditioning Induces a Novel Extended Window of Ischemic Tolerance in the Mouse Brain." Stroke 46(8): 2293-2298.
- Kuan, C. Y. y Burke, R. E. (2005). "Targeting the JNK signaling pathway for stroke and Parkinson's diseases therapy." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 4(1): 63-67.
- Kumar, P., Ambasta, R. K., Veereshwarayya, V., Rosen, K. M., Kosik, K. S., Band, H., Mestril, R., Patterson, C. y Querfurth, H. W. (2007). "CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism." Hum Mol Genet 16(7): 848-864.
- Kwak, M. K., Cho, J. M., Huang, B., Shin, S. y Kensler, T. W. (2007). "Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells." Free Radic Biol Med 43(5): 809-817.
- Kwon, S. H., Hong, S. I., Ma, S. X., Lee, S. Y. y Jang, C. G. (2015). "3',4',7-Trihydroxyflavone prevents apoptotic cell death in neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress." Food Chem Toxicol 80: 41-51.
- L'Episcopo, F., Drouin-Ouellet, J., Tirolo, C., Pulvirenti, A., Giugno, R., Testa, N., Caniglia, S., Serapide, M. F., Cisbani, G., Barker, R. A., Cicchetti, F. y Marchetti, B. (2016). "GSK-3beta-induced Tau pathology drives hippocampal neuronal cell death in Huntington's disease: involvement of astrocyte-neuron interactions." Cell Death Dis 7: e2206.

- LaFontaine, M. A., Mattson, M. P. y Butterfield, D. A. (2002). "Oxidative stress in synaptosomal proteins from mutant presenilin-1 knock-in mice: implications for familial Alzheimer's disease." Neurochem Res 27(5): 417-421.
- Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V. y Gutierrez-Merino, C. (2011). "Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria." Biochim Biophys Acta 1807(12): 1562-1572.
- Lalkovicova, M. y Danielisova, V. (2016). "Neuroprotection and antioxidants." Neural Regen Res 11(6): 865-874.
- Lanning, N. J., Looyenga, B. D., Kauffman, A. L., Niemi, N. M., Sudderth, J., DeBerardinis, R. J. y MacKeigan, J. P. (2014). "A mitochondrial RNAi screen defines cellular bioenergetic determinants and identifies an adenylate kinase as a key regulator of ATP levels." Cell Rep 7(3): 907-917.
- Lapchak, P. A., Schubert, D. R. y Maher, P. A. (2011). "Delayed treatment with a novel neurotrophic compound reduces behavioral deficits in rabbit ischemic stroke." J Neurochem 116(1): 122-131.
- LeBel, C. P., Ischiropoulos, H. y Bondy, S. C. (1992). "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." Chem Res Toxicol 5(2): 227-231.
- Lee, M. H., Han, M. H., Lee, D. S., Park, C., Hong, S. H., Kim, G. Y., Hong, S. H., Song, K. S., Choi, I. W., Cha, H. J. y Choi, Y. H. (2017). "Morin exerts cytoprotective effects against oxidative stress in C2C12 myoblasts via the upregulation of Nrf2-dependent HO-1 expression and the activation of the ERK pathway." Int J Mol Med 39(2): 399-406.
- Lee, S., Park, H. S., Notsu, Y., Ban, H. S., Kim, Y. P., Ishihara, K., Hirasawa, N., Jung, S. H., Lee, Y. S., Lim, S. S., Park, E. H., Shin, K. H., Seyama, T., Hong, J. y Ohuchi, K. (2008). "Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages." Phytother Res 22(11): 1552-1556.
- Lee, S. Y., Ha, T. Y., Son, D. J., Kim, S. R. y Hong, J. T. (2005). "Effect of sesaminol glucosides on beta-amyloid-induced PC12 cell death through antioxidant mechanisms." Neurosci Res 52(4): 330-341.

- Lemkul, J. A. y Bevan, D. R. (2010). "Destabilizing Alzheimer's Abeta(42) protofibrils with morin: mechanistic insights from molecular dynamics simulations." Biochemistry 49(18): 3935-3946.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Le Gouge, A., Dartigues, J. F. y Barberger-Gateau, P. (2007). "Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period." Am J Epidemiol 165(12): 1364-1371.
- Li, L., Tsai, H. J., Li, L. y Wang, X. M. (2010). "Icariin inhibits the increased inward calcium currents induced by amyloid-beta(25-35) peptide in CA1 pyramidal neurons of neonatal rat hippocampal slice." Am J Chin Med 38(1): 113-125.
- Li, L., Zhang, X. H., Liu, G. R., Liu, C. y Dong, Y. M. (2016). "Isoquercitrin suppresses the expression of histamine and pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappaB in human KU812 cells." Chin J Nat Med 14(6): 407-412.
- Li, Q., Zhao, H. F., Zhang, Z. F., Liu, Z. G., Pei, X. R., Wang, J. B. y Li, Y. (2009). "Long-term green tea catechin administration prevents spatial learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone-8 mice by decreasing Abeta1-42 oligomers and upregulating synaptic plasticity-related proteins in the hippocampus." Neuroscience 163(3): 741-749.
- Li, Y., Zhu, J., Liu, Y., Chen, X., Lei, S., Li, L., Jiang, B., Tan, L., Yu, S. y Zhao, Y. (2016). "Glycogen Synthase Kinase 3beta Influences Injury Following Cerebral Ischemia/Reperfusion in Rats." Int J Biol Sci 12(5): 518-531.
- Lichtenthaler, S. F. (2011). "alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential." J Neurochem 116(1): 10-21.
- Liu, C., Wu, J., Xu, K., Cai, F., Gu, J., Ma, L. y Chen, J. (2010). "Neuroprotection by baicalein in ischemic brain injury involves PTEN/AKT pathway." J Neurochem 112(6): 1500-1512.
- Liu, C. S., Ruthirakuhan, M., Chau, S. A., Herrmann, N., Carvalho, A. F. y Lanctot, K. L. (2016). "Pharmacological management of agitation and aggression in Alzheimer's Disease: a review of current and novel treatments." Curr Alzheimer Res.
- Liu, J., Li, L. y Suo, W. Z. (2009). "HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties." Life Sci 84(9-10): 267-271.

- Liu, S., Guo, C., Guo, Y., Yu, H., Greenaway, F. y Sun, M. Z. (2014). "Comparative binding affinities of flavonoid phytochemicals with bovine serum albumin." Iran J Pharm Res 13(3): 1019-1028.
 - Liu, Y., Dargusch, R., Maher, P. y Schubert, D. (2008). "A broadly neuroprotective derivative of curcumin." J Neurochem 105(4): 1336-1345.
 - Loeffler, D. A., DeMaggio, A. J., Juneau, P. L., Brickman, C. M., Mashour, G. A., Finkelman, J. H., Pomara, N. y LeWitt, P. A. (1994). "Ceruloplasmin is increased in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease but not Parkinson's disease." Alzheimer Dis Assoc Disord 8(3): 190-197.
 - Loeffler, D. A., LeWitt, P. A., Juneau, P. L., Sima, A. A., Nguyen, H. U., DeMaggio, A. J., Brickman, C. M., Brewer, G. J., Dick, R. D., Troyer, M. D. y Kanaley, L. (1996). "Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders." Brain Res 738(2): 265-274.
 - Luk'ianova, L. D., Germanova, E. L. y Lysko, A. I. (2007). "[Energotropic, antihypoxic, and antioxidative effects of flavonoids]." Vestn Ross Akad Med Nauk(2): 55-62.
 - Luo, Y. y DeFranco, D. B. (2006). "Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress." J Biol Chem 281(24): 16436-16442.
 - Luth, H. J., Munch, G. y Arendt, T. (2002). "Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation." Brain Res 953(1-2): 135-143.
 - Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P. y Halliwell, B. (1997). "An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease." J Neurochem 68(5): 2061-2069.
- M**
- Maezawa, I., Hong, H. S., Wu, H. C., Battina, S. K., Rana, S., Iwamoto, T., Radke, G. A., Pettersson, E., Martin, G. M., Hua, D. H. y Jin, L. W. (2006). "A novel tricyclic pyrone compound ameliorates cell death associated with intracellular amyloid-beta oligomeric complexes." J Neurochem 98(1): 57-67.
 - Magen, I., Ostrowsky, R., Richter, F., Zhu, C., Fleming, S. M., Lemesre, V., Stewart, A. J., Morimoto, B. H., Gozes, I. y Chesselet, M. F. (2014). "Intranasal NAP (davunetide)

decreases tau hyperphosphorylation and moderately improves behavioral deficits in mice overexpressing alpha-synuclein." Pharmacol Res Perspect 2(5): e00065.

- Maharjan, S., Oku, M., Tsuda, M., Hoseki, J. y Sakai, Y. (2014). "Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition." Sci Rep 4: 5896.
- Maher, P. (2008). "The flavonoid fisetin promotes nerve cell survival from trophic factor withdrawal by enhancement of proteasome activity." Arch Biochem Biophys 476(2): 139-144.
- Maher, P., Salgado, K. F., Zivin, J. A. y Lapchak, P. A. (2007). "A novel approach to screening for new neuroprotective compounds for the treatment of stroke." Brain Res 1173: 117-125.
- Maiese, K. (2014). "Cutting through the complexities of mTOR for the treatment of stroke." Curr Neurovasc Res 11(2): 177-186.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. y Jimenez, L. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr 79(5): 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. y Remesy, C. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies." Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 230S-242S.
- Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J. y Reddy, P. H. (2006). "Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression." Hum Mol Genet 15(9): 1437-1449.
- Manczak, M., Mao, P., Calkins, M. J., Cornea, A., Reddy, A. P., Murphy, M. P., Szeto, H. H., Park, B. y Reddy, P. H. (2010). "Mitochondria-targeted antioxidants protect against amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease neurons." J Alzheimers Dis 20 Suppl 2: S609-631.
- Mandel, S. A., Amit, T., Kalfon, L., Reznichenko, L., Weinreb, O. y Youdim, M. B. (2008). "Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG)." J Alzheimers Dis 15(2): 211-222.

- Marques, C. A., Keil, U., Bonert, A., Steiner, B., Haass, C., Muller, W. E. y Eckert, A. (2003). "Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway." J Biol Chem 278(30): 28294-28302.
- Martin-Aragon, S., Jimenez-Aliaga, K. L., Benedi, J. y Bermejo-Bescos, P. (2016). "Neurohormetic responses of quercetin and rutin in a cell line over-expressing the amyloid precursor protein (APP^{swe} cells)." Phytomedicine 23(12): 1285-1294.
- Martin, P., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G., Wu, Y. y Prina, M. (2015). World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London, Alzheimer's Disease International: 87.
- Martorana, A., Esposito, Z. y Koch, G. (2010). "Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease?" CNS Neurosci Ther 16(4): 235-245.
- Maruszak, A. y Zekanowski, C. (2011). "Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(2): 320-330.
- Mathur, A., Rizvi, F. y Kakkar, P. (2016). "PHLPP2 down regulation influences nuclear Nrf2 stability via Akt-1/Gsk3beta/Fyn kinase axis in acetaminophen induced oxidative renal toxicity: Protection accorded by morin." Food Chem Toxicol 89: 19-31.
- Matsuoka, Y., Picciano, M., La Francois, J. y Duff, K. (2001). "Fibrillar beta-amyloid evokes oxidative damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Neuroscience 104(3): 609-613.
- Mattson, M. P. (2004). "Pathways towards and away from Alzheimer's disease." Nature 430(7000): 631-639.
- Mattson, M. P. (2008). "Awareness of hormesis will enhance future research in basic and applied neuroscience." Crit Rev Toxicol 38(7): 633-639.
- McIlwain, D. R., Berger, T. y Mak, T. W. (2013). "Caspase functions in cell death and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol 5(4): a008656.
- Mecocci, P., Beal, M. F., Cecchetti, R., Polidori, M. C., Cherubini, A., Chionne, F., Avellini, L., Romano, G. y Senin, U. (1997). "Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and AD human brain." Mol Chem Neuropathol 31(1): 53-64.

- Mecocci, P., Cherubini, A., Beal, M. F., Cecchetti, R., Chionne, F., Polidori, M. C., Romano, G. y Senin, U. (1996). "Altered mitochondrial membrane fluidity in AD brain." Neurosci Lett 207(2): 129-132.
- Mehta, S. L., Manhas, N. y Raghubir, R. (2007). "Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics." Brain Res Rev 54(1): 34-66.
- Mendiola-Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K. y Garcia-Alcocer, G. (2016). "Therapies for Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease." Biomed Res Int 2016: 2589276.
- Misonou, H., Morishima-Kawashima, M. y Ihara, Y. (2000). "Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (Abeta) in human neuroblastoma cells." Biochemistry 39(23): 6951-6959.
- Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M. y Motohashi, H. (2012). "Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming." Cancer Cell 22(1): 66-79.
- Miyawaki, T., Mashiko, T., Ofengeim, D., Flannery, R. J., Noh, K. M., Fujisawa, S., Bonanni, L., Bennett, M. V., Zukin, R. S. y Jonas, E. A. (2008). "Ischemic preconditioning blocks BAD translocation, Bcl-xL cleavage, and large channel activity in mitochondria of postischemic hippocampal neurons." Proc Natl Acad Sci U S A 105(12): 4892-4897.
- Montine, T. J., Huang, D. Y., Valentine, W. M., Amarnath, V., Saunders, A., Weisgraber, K. H., Graham, D. G. y Strittmatter, W. J. (1996). "Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation." J Neuropathol Exp Neurol 55(2): 202-210.
- Morelli, S., Piscioneri, A., Salerno, S., Al-Fageeh, M. B., Drioli, E. y De Bartolo, L. (2014). "Neuroprotective effect of didymin on hydrogen peroxide-induced injury in the neuronal membrane system." Cells Tissues Organs 199(2-3): 184-200.
- Moslehi, M., Meshkini, A. y Yazdanparast, R. (2012). "Flavonoid baicalein modulates H₂O₂-induced mitogen-activated protein kinases activation and cell death in SK-N-MC cells." Cell Mol Neurobiol 32(4): 549-560.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods 65(1-2): 55-63.
- Mueller-Steiner, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L. y Gan, L. (2006). "Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease." Neuron 51(6): 703-714.

- Muresan, Z. y Muresan, V. (2005). "c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-3 facilitates phosphorylation and controls localization of amyloid-beta precursor protein." J Neurosci 25(15): 3741-3751.
- Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L. y Coyle, J. T. (1989). "Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress." Neuron 2(6): 1547-1558.
- Murray, B., Alessandrini, A., Cole, A. J., Yee, A. G. y Furshpan, E. J. (1998). "Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity." Proc Natl Acad Sci U S A 95(20): 11975-11980.
- N
- Nakka, V. P., Gusain, A., Mehta, S. L. y Raghubir, R. (2008). "Molecular mechanisms of apoptosis in cerebral ischemia: multiple neuroprotective opportunities." Mol Neurobiol 37(1): 7-38.
- Nalivaeva, N. N. y Turner, A. J. (2016). "Role of ageing and oxidative stress in regulation of amyloid-degrading enzymes and development of neurodegeneration." Curr Aging Sci.
- Nalivaeva, N. N., Fisk, L., Kochkina, E. G., Plesneva, S. A., Zhuravin, I. A., Babusikova, E., Dobrota, D. y Turner, A. J. (2004). "Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes." Ann N Y Acad Sci 1035: 21-33.
- Newman, J., Rissman, R. A., Sarsoza, F., Kim, R. C., Dick, M., Bennett, D. A., Cotman, C. W., Rohn, T. T. y Head, E. (2005). "Caspase-cleaved tau accumulation in neurodegenerative diseases associated with tau and alpha-synuclein pathology." Acta Neuropathol 110(2): 135-144.
- Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D. y Tessier-Lavigne, M. (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." Nature 457(7232): 981-989.
- Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B. y Smith, M. A. (2001). "Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol 60(8): 759-767.

- ➔ Nygaard, H. B. (2013). "Current and emerging therapies for Alzheimer's disease." Clin Ther 35(10): 1480-1489.

O

- ➔ Obregon, D. F., Rezai-Zadeh, K., Bai, Y., Sun, N., Hou, H., Ehrhart, J., Zeng, J., Mori, T., Arendash, G. W., Shytle, D., Town, T. y Tan, J. (2006). "ADAM10 activation is required for green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein." J Biol Chem 281(24): 16419-16427.
- ➔ Obulesu, M., Venu, R. y Somashekhar, R. (2011). "Tau mediated neurodegeneration: an insight into Alzheimer's disease pathology." Neurochem Res 36(8): 1329-1335.
- ➔ Oka, S., Hsu, C. P. y Sadoshima, J. (2012). "Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides." Circ Res 111(5): 611-627.
- ➔ Ono, K., Hamaguchi, T., Naiki, H. y Yamada, M. (2006). "Anti-amyloidogenic effects of antioxidants: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta 1762(6): 575-586.
- ➔ Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H. y Yamada, M. (2003). "Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease." J Neurochem 87(1): 172-181.
- ➔ Onuki, R., Nagasaki, A., Kawasaki, H., Baba, T., Uyeda, T. Q. y Taira, K. (2002). "Confirmation by FRET in individual living cells of the absence of significant amyloid beta - mediated caspase 8 activation." Proc Natl Acad Sci U S A 99(23): 14716-14721.

P

- ➔ Palop, J. J. y Mucke, L. (2010). "Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks." Nat Neurosci 13(7): 812-818.
- ➔ Pallauf, K., Duckstein, N. y Rimbach, G. (2016). "A literature review of flavonoids and lifespan in model organisms." Proc Nutr Soc: 1-18.
- ➔ Panza, F., Frisardi, V., Solfrizzi, V., Imbimbo, B. P., Logroscino, G., Santamato, A., Greco, A., Seripa, D. y Pilotto, A. (2011). "Interacting with gamma-secretase for treating Alzheimer's disease: from inhibition to modulation." Curr Med Chem 18(35): 5430-5447.

- Panza, F., Solfrizzi, V., Seripa, D., Imbimbo, B. P., Santamato, A., Lozupone, M., Prete, C., Greco, A., Pilotto, A. y Logroscino, G. (2015). "Progresses in treating agitation: a major clinical challenge in Alzheimer's disease." Expert Opin Pharmacother 16(17): 2581-2588.
- Parihar, M. S., Kunz, E. A. y Brewer, G. J. (2008). "Age-related decreases in NAD(P)H and glutathione cause redox declines before ATP loss during glutamate treatment of hippocampal neurons." J Neurosci Res 86(10): 2339-2352.
- Paris, D. y Mullan, M. (2004). Anti-angiogenic and anti-tumoral properties of beta and gamma secretase inhibitors, Google Patents.
- Park, S. A., Shaked, G. M., Bredesen, D. E. y Koo, E. H. (2009). "Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein." Biochem Biophys Res Commun 388(2): 450-455.
- Phiel, C. J., Wilson, C. A., Lee, V. M. y Klein, P. S. (2003). "GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides." Nature 423(6938): 435-439.
- Picone, P., Carrotta, R., Montana, G., Nobile, M. R., San Biagio, P. L. y Di Carlo, M. (2009). "Abeta oligomers and fibrillar aggregates induce different apoptotic pathways in LAN5 neuroblastoma cell cultures." Biophys J 96(10): 4200-4211.
- Pietsch, K., Saul, N., Chakrabarti, S., Sturzenbaum, S. R., Menzel, R. y Steinberg, C. E. (2011). "Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*." Biogerontology 12(4): 329-347.
- Pilchova, I., Klacanova, K., Chomova, M., Tatarkova, Z., Dobrota, D. y Racay, P. (2015). "Possible contribution of proteins of Bcl-2 family in neuronal death following transient global brain ischemia." Cell Mol Neurobiol 35(1): 23-31.
- Pirianov, G., Brywe, K. G., Mallard, C., Edwards, A. D., Flavell, R. A., Hagberg, H. y Mehmet, H. (2007). "Deletion of the c-Jun N-terminal kinase 3 gene protects neonatal mice against cerebral hypoxic-ischaemic injury." J Cereb Blood Flow Metab 27(5): 1022-1032.
- Plummer, S., Van den Heuvel, C., Thornton, E., Corrigan, F. y Cappai, R. (2016). "The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury." Aging Dis 7(2): 163-179.
- Pluta, R., Furmaga-Jablonska, W., Maciejewski, R., Ulamek-Kozioł, M. y Jablonski, M. (2013). "Brain ischemia activates beta- and gamma-secretase cleavage of amyloid

precursor protein: significance in sporadic Alzheimer's disease." Mol Neurobiol 47(1): 425-434.

- Pratico, D., Clark, C. M., Liun, F., Rokach, J., Lee, V. Y. y Trojanowski, J. Q. (2002). "Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: a possible predictor of Alzheimer disease." Arch Neurol 59(6): 972-976.
- Prior, M., Chiruta, C., Currais, A., Goldberg, J., Ramsey, J., Dargusch, R., Maher, P. A. y Schubert, D. (2014). "Back to the future with phenotypic screening." ACS Chem Neurosci 5(7): 503-513.
- Pritchard, S. M., Dolan, P. J., Vitkus, A. y Johnson, G. V. (2011). "The toxicity of tau in Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics." J Cell Mol Med 15(8): 1621-1635.
- Prochazkova, D., Bousova, I. y Wilhelmova, N. (2011). "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids." Fitoterapia 82(4): 513-523.
- Prvulovic, D. y Hampel, H. (2011). "Amyloid beta (Abeta) and phospho-tau (p-tau) as diagnostic biomarkers in Alzheimer's disease." Clin Chem Lab Med 49(3): 367-374.

Q

- Qian, S. B., McDonough, H., Boellmann, F., Cyr, D. M. y Patterson, C. (2006). "CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70." Nature 440(7083): 551-555.
- Qian, Y., Cao, L., Guan, T., Chen, L., Xin, H., Li, Y., Zheng, R. y Yu, D. (2015). "Protection by genistein on cortical neurons against oxidative stress injury via inhibition of NF-kappaB, JNK and ERK signaling pathway." Pharm Biol 53(8): 1124-1132.
- Qu, M., Zhou, Z., Chen, C., Li, M., Pei, L., Yang, J., Wang, Y., Li, L., Liu, C., Zhang, G., Yu, Z. y Wang, D. (2012). "Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening is involved in the protective effects of mortalin overexpression against beta-amyloid-induced apoptosis in SH-SY5Y cells." Neurosci Res 72(1): 94-102.

R

- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P. y Ferreira, A. (2002). "Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A 99(9): 6364-6369.

- Readnower, R. D., Sauerbeck, A. D. y Sullivan, P. G. (2011). "Mitochondria, Amyloid beta, and Alzheimer's Disease." Int J Alzheimers Dis 2011: 104545.
- Regitz, C., Dussling, L. M. y Wenzel, U. (2014). "Amyloid-beta (Abeta(1-)(4)(2))-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways." Mol Nutr Food Res 58(10): 1931-1940.
- Reiter, R. J. (1995). "Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain." FASEB J 9(7): 526-533.
- Reitz, C. y Mayeux, R. (2014). "Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers." Biochem Pharmacol 88(4): 640-651.
- Rezai-Zadeh, K., Arendash, G. W., Hou, H., Fernandez, F., Jensen, M., Runfeldt, M., Shytle, R. D. y Tan, J. (2008). "Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice." Brain Res 1214: 177-187.
- Rezai-Zadeh, K., Douglas Shytle, R., Bai, Y., Tian, J., Hou, H., Mori, T., Zeng, J., Obregon, D., Town, T. y Tan, J. (2009). "Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease beta-amyloid production." J Cell Mol Med 13(3): 574-588.
- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid antioxidants." Curr Med Chem 8(7): 797-807.
- Rizvi, F., Mathur, A. y Kakkar, P. (2015). "Morin mitigates acetaminophen-induced liver injury by potentiating Nrf2 regulated survival mechanism through molecular intervention in PHLPP2-Akt-Gsk3beta axis." Apoptosis 20(10): 1296-1306.
- Rizvi, F., Mathur, A., Krishna, S., Siddiqi, M. I. y Kakkar, P. (2015). "Suppression in PHLPP2 induction by morin promotes Nrf2-regulated cellular defenses against oxidative injury to primary rat hepatocytes." Redox Biol 6: 587-598.
- Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M. y Pozzan, T. (1994). "Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells." J Cell Biol 126(5): 1183-1194.
- Rogerio, A. P., Kanashiro, A., Fontanari, C., da Silva, E. V., Lucisano-Valim, Y. M., Soares, E. G. y Faccioli, L. H. (2007). "Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma." Inflamm Res 56(10): 402-408.
- Roux, P. P. y Blenis, J. (2004). "ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions." Microbiol Mol Biol Rev 68(2): 320-344.

- Rudnitskaya, E. A., Muraleva, N. A., Maksimova, K. Y., Kiseleva, E., Kolosova, N. G. y Stefanova, N. A. (2015). "Melatonin Attenuates Memory Impairment, Amyloid-beta Accumulation, and Neurodegeneration in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis 47(1): 103-116.

S

- Saftig, P. y Lichtenthaler, S. F. (2015). "The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain." Prog Neurobiol 135: 1-20.
- Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. y Maher, P. (1998). "Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress." Free Radic Biol Med 24(9): 1375-1389.
- Sagara, Y. y Schubert, D. (1998). "The activation of metabotropic glutamate receptors protects nerve cells from oxidative stress." J Neurosci 18(17): 6662-6671.
- Sambamurti, K., Greig, N. H., Utsuki, T., Barnwell, E. L., Sharma, E., Mazell, C., Bhat, N. R., Kindy, M. S., Lahiri, D. K. y Pappolla, M. A. (2011). "Targets for AD treatment: conflicting messages from gamma-secretase inhibitors." J Neurochem 117(3): 359-374.
- Sandoval-Acuna, C., Ferreira, J. y Speisky, H. (2014). "Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions." Arch Biochem Biophys 559: 75-90.
- Sandoval-Acuna, C., Lopez-Alarcon, C., Aliaga, M. E. y Speisky, H. (2012). "Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action." Chem Biol Interact 199(1): 18-28.
- Sato, K., Yamanaka, Y., Asakura, Y. y Nedachi, T. (2016). "Glutamate levels control HT22 murine hippocampal cell death by regulating biphasic patterns of Erk1/2 activation: role of metabolic glutamate receptor 5." Biosci Biotechnol Biochem 80(4): 712-718.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S. y Van der Flier, W. M. (2016). "Alzheimer's disease." The Lancet.
- Schroeter, H., Spencer, J. P., Rice-Evans, C. y Williams, R. J. (2001). "Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3." Biochem J 358(Pt 3): 547-557.
- Schubert, D., Kimura, H. y Maher, P. (1992). "Growth factors and vitamin E modify neuronal glutamate toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A 89(17): 8264-8267.

- Sebastia, J., Pertusa, M., Vilchez, D., Planas, A. M., Verbeek, R., Rodriguez-Farre, E., Cristofol, R. y Sanfeliu, C. (2006). "Carboxyl-terminal fragment of amyloid precursor protein and hydrogen peroxide induce neuronal cell death through different pathways." J Neural Transm (Vienna) 113(12): 1837-1845.
- Shahani, N., Subramaniam, S., Wolf, T., Tackenberg, C. y Brandt, R. (2006). "Tau aggregation and progressive neuronal degeneration in the absence of changes in spine density and morphology after targeted expression of Alzheimer's disease-relevant tau constructs in organotypic hippocampal slices." J Neurosci 26(22): 6103-6114.
- Shang, F. y Taylor, A. (2011). "Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress." Free Radic Biol Med 51(1): 5-16.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T. y Sugimoto, H. (2008). "Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure-activity relationship in cell-free, cell-based and in silico studies reveal novel pharmacophore features." Biochim Biophys Acta 1780(5): 819-825.
- Shuang, R., Rui, X. y Wenfang, L. (2016). "Phytosterols and Dementia." Plant Foods Hum Nutr 71(4): 347-354.
- Siklos, M., BenAissa, M. y Thatcher, G. R. (2015). "Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors." Acta Pharm Sin B 5(6): 506-519.
- Silveyra, M. X., Evin, G., Montenegro, M. F., Vidal, C. J., Martinez, S., Culvenor, J. G. y Saez-Valero, J. (2008). "Presenilin 1 interacts with acetylcholinesterase and alters its enzymatic activity and glycosylation." Mol Cell Biol 28(9): 2908-2919.
- Singh, M., Kaur, M., Kukreja, H., Chugh, R., Silakari, O. y Singh, D. (2013). "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection." European Journal of Medicinal Chemistry 70: 165-188.
- Siopi, E., Llufríu-Daben, G., Cho, A. H., Vidal-Lletjos, S., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. y Jafarian-Tehrani, M. (2013). "Etazolate, an alpha-secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice." Neuropharmacology 67: 183-192.
- Siow, R. C. y Mann, G. E. (2010). "Dietary isoflavones and vascular protection: activation of cellular antioxidant defenses by SERMs or hormesis?" Mol Aspects Med 31(6): 468-477.

- Skemieniė, K., Liobikas, J. y Borutaite, V. (2015). "Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex I - protective effect against heart ischemic injury." Febs j 282(5): 963-971.
- Skulachev, V. P. (1998). "Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics." Biochim Biophys Acta 1363(2): 100-124.
- Smith, M. A., Vasak, M., Knipp, M., Castellani, R. J. y Perry, G. (1998). "Dimethylargininase, a nitric oxide regulatory protein, in Alzheimer disease." Free Radic Biol Med 25(8): 898-902.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical Biochemistry 150(1): 76-85.
- Sopher, B. L., Fukuchi, K., Kavanagh, T. J., Furlong, C. E. y Martin, G. M. (1996). "Neurodegenerative mechanisms in Alzheimer disease. A role for oxidative damage in amyloid beta protein precursor-mediated cell death." Mol Chem Neuropathol 29(2-3): 153-168.
- Spencer, J. P. (2007). "The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways." Genes Nutr 2(3): 257-273.
- Spencer, J. P. (2008). "Flavonoids: modulators of brain function?" Br J Nutr 99 E Suppl 1: ES60-77.
- Spencer, J. P. (2010 (a)). "Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain." Proc Nutr Soc 69(2): 244-260.
- Spencer, J. P. (2010 (b)). "The impact of fruit flavonoids on memory and cognition." Br J Nutr 104 Suppl 3: S40-47.
- Sperling, O., Bromberg, Y., Oelsner, H. y Zoref-Shani, E. (2003). "Reactive oxygen species play an important role in iodoacetate-induced neurotoxicity in primary rat neuronal cultures and in differentiated PC12 cells." Neurosci Lett 351(3): 137-140.
- Sugiyama, M., Sahashi, H., Kurimoto, E., Takata, S., Yagi, H., Kanai, K., Sakata, E., Minami, Y., Tanaka, K. y Kato, K. (2013). "Spatial arrangement and functional role of alpha subunits of proteasome activator PA28 in hetero-oligomeric form." Biochem Biophys Res Commun 432(1): 141-145.

T

- Tai, H. C., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Frosch, M. P., Spires-Jones, T. L. y Hyman, B. T. (2012). "The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system." Am J Pathol 181(4): 1426-1435.
- Talaga, P. (2004). "Inhibitors of beta-amyloid aggregation: still an issue of structure and function?" Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies 1(1): 7-12.
- Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M. y Danni, O. (2003). "Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis." Free Radic Biol Med 35(1): 45-58.
- Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M. y Danni, O. (2003). "H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid beta-induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38MAPK." Exp Neurol 180(2): 144-155.
- Tamilselvam, K., Braid, N., Manivasagam, T., Essa, M. M., Prasad, N. R., Karthikeyan, S., Thenmozhi, A. J., Selvaraju, S. y Guillemin, G. J. (2013). "Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease." Oxid Med Cell Longev 2013: 102741.
- Tan, S., Sagara, Y., Liu, Y., Maher, P. y Schubert, D. (1998). "The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death." J Cell Biol 141(6): 1423-1432.
- Tan, S., Schubert, D. y Maher, P. (2001). "Oxytosis: A novel form of programmed cell death." Curr Top Med Chem 1(6): 497-506.
- Titov, D. V., Cracan, V., Goodman, R. P., Peng, J., Grabarek, Z. y Mootha, V. K. (2016). "Complementation of mitochondrial electron transport chain by manipulation of the NAD⁺/NADH ratio." Science 352(6282): 231-235.
- Tripoli, E., Guardia, M. L., Giammanco, S., Majo, D. D. y Giammanco, M. (2007). "Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review." Food Chemistry 104(2): 466-479.

U

- Ulamek-Kozioł, M., Pluta, R., Bogucka-Kocka, A., Januszewski, S., Kocki, J. y Czuczwar, S. J. (2016). "Brain ischemia with Alzheimer phenotype dysregulates Alzheimer's disease-related proteins." Pharmacol Rep 68(3): 582-591.
- Ulamek-Kozioł, M., Pluta, R., Januszewski, S., Kocki, J., Bogucka-Kocka, A. y Czuczwar, S. J. (2016). "Expression of Alzheimer's disease risk genes in ischemic brain degeneration." Pharmacol Rep 68(6): 1345-1349.
- Uriarte-Pueyo, I. y Calvo, M. I. (2011). "Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors." Curr Med Chem 18(34): 5289-5302.

V

- Vafai, S. B. y Mootha, V. K. (2012). "Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle." Nature 491(7424): 374-383.
- Valera, E., Dargusch, R., Maher, P. A. y Schubert, D. (2013). "Modulation of 5-lipoxygenase in proteotoxicity and Alzheimer's disease." J Neurosci 33(25): 10512-10525.
- Valerio, A., Bertolotti, P., Delbarba, A., Perego, C., Dossena, M., Ragni, M., Spano, P., Carruba, M. O., De Simoni, M. G. y Nisoli, E. (2011). "Glycogen synthase kinase-3 inhibition reduces ischemic cerebral damage, restores impaired mitochondrial biogenesis and prevents ROS production." J Neurochem 116(6): 1148-1159.
- van Praag, H., Lucero, M. J., Yeo, G. W., Stecker, K., Heivand, N., Zhao, C., Yip, E., Afanador, M., Schroeter, H., Hammerstone, J. y Gage, F. H. (2007). "Plant-derived flavanol (-)epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice." J Neurosci 27(22): 5869-5878.
- Vargas, A. J. y Burd, R. (2010). "Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management." Nutr Rev 68(7): 418-428.
- Vassallo, N. y Scerri, C. (2013). "Mediterranean diet and dementia of the Alzheimer type." Curr Aging Sci 6(2): 150-162.
- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R. y Wong, P. C. (2009). "The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential." J Neurosci 29(41): 12787-12794.
- Velez-Pardo, C., Ospina, G. G. y Jimenez del Rio, M. (2002). "Abeta[25-35] peptide and iron promote apoptosis in lymphocytes by an oxidative stress mechanism: involvement of H₂O₂, caspase-3, NF-kappaB, p53 and c-Jun." Neurotoxicology 23(3): 351-365.

- Vingtdeux, V. y Marambaud, P. (2012). "Identification and biology of alpha-secretase." J Neurochem 120 Suppl 1: 34-45.
- Vitek, M. P., Snell, J., Dawson, H. y Colton, C. A. (1997). "Modulation of nitric oxide production in human macrophages by apolipoprotein-E and amyloid-beta peptide." Biochem Biophys Res Commun 240(2): 391-394.
- W
- Wang, C. y Youle, R. J. (2009). "The role of mitochondria in apoptosis*." Annu Rev Genet 43: 95-118.
- Wang, C. P., Li, J. L., Zhang, L. Z., Zhang, X. C., Yu, S., Liang, X. M., Ding, F. y Wang, Z. W. (2013). "Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via suppression of TLR4-NF-small ka, CyrillicB signal pathway." Neurochem Int 63(8): 741-749.
- Wang, C. P., Shi, Y. W., Tang, M., Zhang, X. C., Gu, Y., Liang, X. M., Wang, Z. W. y Ding, F. (2017). "Isoquercetin Ameliorates Cerebral Impairment in Focal Ischemia Through Anti-Oxidative, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Effects in Primary Culture of Rat Hippocampal Neurons and Hippocampal CA1 Region of Rats." Mol Neurobiol 54(3): 2126-2142.
- Wang, H., Li, R. y Shen, Y. (2013). "beta-Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases." Trends Pharmacol Sci 34(4): 215-225.
- Wang, J., Guo, C., Wei, Z., He, X., Kou, J., Zhou, E., Yang, Z. y Fu, Y. (2016). "Morin suppresses inflammatory cytokine expression by downregulation of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated primary bovine mammary epithelial cells." J Dairy Sci 99(4): 3016-3022.
- Wang, M., Li, Y. J., Ding, Y., Zhang, H. N., Sun, T., Zhang, K., Yang, L., Guo, Y. Y., Liu, S. B., Zhao, M. G. y Wu, Y. M. (2016). "Silibinin Prevents Autophagic Cell Death upon Oxidative Stress in Cortical Neurons and Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury." Mol Neurobiol 53(2): 932-943.
- Wang, Y. J., Ren, Q. G., Gong, W. G., Wu, D., Tang, X., Li, X. L., Wu, F. F., Bai, F., Xu, L. y Zhang, Z. J. (2016). "Escitalopram attenuates beta-amyloid-induced tau hyperphosphorylation in primary hippocampal neurons through the 5-HT1A receptor mediated Akt/GSK-3beta pathway." Oncotarget 7(12): 13328-13339.

- Watabe, M. y Nakaki, T. (2007). "ATP depletion does not account for apoptosis induced by inhibition of mitochondrial electron transport chain in human dopaminergic cells." Neuropharmacology 52(2): 536-541.
- Watt, F. (1996). "Nuclear microscope analysis in Alzheimer's and Parkinson's disease: A review." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 42(1): 17-26.
- Weiner, G. M. y Ducruet, A. F. (2015). "Mammalian target of rapamycin (mTOR) activity promotes neuronal survival in stroke with or without ischemic postconditioning." Neurosurgery 76(2): N19-20.
- Wen, X., Huang, A., Hu, J., Zhong, Z., Liu, Y., Li, Z., Pan, X. y Liu, Z. (2015). "Neuroprotective effect of astaxanthin against glutamate-induced cytotoxicity in HT22 cells: Involvement of the Akt/GSK-3beta pathway." Neuroscience 303: 558-568.
- Williams, R. J. y Spencer, J. P. (2012). "Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease." Free Radic Biol Med 52(1): 35-45.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. E. y Rice-Evans, C. (2004). "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?" Free Radical Biology and Medicine 36(7): 838-849.
- Williamson, G. y Manach, C. (2005). "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies." Am J Clin Nutr 81(1 Suppl): 243S-255S.
- Williamson, K. S., Gabbita, S. P., Mou, S., West, M., Pye, Q. N., Markesbery, W. R., Cooney, R. V., Grammas, P., Reimann-Philipp, U., Floyd, R. A. y Hensley, K. (2002). "The nitration product 5-nitro-gamma-tocopherol is increased in the Alzheimer brain." Nitric Oxide 6(2): 221-227.
- Woltjer, R. L., Maezawa, I., Ou, J. J., Montine, K. S. y Montine, T. J. (2003). "Advanced glycation endproduct precursor alters intracellular amyloid-beta/A beta PP carboxy-terminal fragment aggregation and cytotoxicity." J Alzheimers Dis 5(6): 467-476.
- Wong, A., Luth, H. J., Deuther-Conrad, W., Dukic-Stefanovic, S., Gasic-Milenkovic, J., Arendt, T. y Munch, G. (2001). "Advanced glycation endproducts co-localize with inducible nitric oxide synthase in Alzheimer's disease." Brain Res 920(1-2): 32-40.
- Wu, X., Cao, N., Fenech, M. y Wang, X. (2016). "Role of Sirtuins in Maintenance of Genomic Stability: Relevance to Cancer and Healthy Aging." DNA Cell Biol 35(10): 542-575.

X

- Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Zhao, J. y Wei, X. (2009). "Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein." J Agric Food Chem 57(15): 6642-6648.
- Xie, Y., Yang, W., Chen, X. y Xiao, J. (2014). "Inhibition of flavonoids on acetylcholine esterase: binding and structure-activity relationship." Food Funct 5(10): 2582-2589.

Y

- Yamada, K., Tanaka, T., Han, D., Senzaki, K., Kameyama, T. y Nabeshima, T. (1999). "Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo." Eur J Neurosci 11(1): 83-90.
- Yang, E. J., Kim, G. S., Kim, J. A. y Song, K. S. (2013). "Protective effects of onion-derived quercetin on glutamate-mediated hippocampal neuronal cell death." Pharmacogn Mag 9(36): 302-308.
- Yang, E. J., Park, G. H. y Song, K. S. (2013). "Neuroprotective effects of liquiritigenin isolated from licorice roots on glutamate-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells." Neurotoxicology 39: 114-123.
- Yang, L. B., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X. L., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R. y Shen, Y. (2003). "Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease." Nat Med 9(1): 3-4.
- Yang, Z., Liu, Y., Deng, W., Dai, J., Li, F., Yuan, Y., Wu, Q., Zhou, H., Bian, Z. y Tang, Q. (2014). "Hesperetin attenuates mitochondria-dependent apoptosis in lipopolysaccharide-induced H9C2 cardiomyocytes." Mol Med Rep 9(5): 1941-1946.
- Yao, J. y Brinton, R. D. (2011). "Targeting mitochondrial bioenergetics for Alzheimer's prevention and treatment." Curr Pharm Des 17(31): 3474-3479.
- Ye, J., Meng, X., Yan, C. y Wang, C. (2010). "Effect of purple sweet potato anthocyanins on beta-amyloid-mediated PC-12 cells death by inhibition of oxidative stress." Neurochem Res 35(3): 357-365.
- Yen, S. S. (2011). "Proteasome degradation of brain cytosolic tau in Alzheimer's disease." Int J Clin Exp Pathol 4(4): 385-402.

- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N. J. y Rice-Evans, C. (2003). "Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies." J Neurochem 85(1): 180-192.
- Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A. y Abbott, N. J. (2004). "Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier." Free Radic Biol Med 36(5): 592-604.
- Youdim, K. A., Shukitt-Hale, B. y Joseph, J. A. (2004). "Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system." Free Radical Biology and Medicine 37(11): 1683-1693.
- Youdim, M. B. (1988). "Iron in the brain: implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases." Mt Sinai J Med 55(1): 97-101.

Z

- Zhang, J. G., Tirmenstein, M. A., Nicholls-Grzemeski, F. A. y Fariss, M. W. (2001). "Mitochondrial electron transport inhibitors cause lipid peroxidation-dependent and -independent cell death: protective role of antioxidants." Arch Biochem Biophys 393(1): 87-96.
- Zhang, L., Wu, J., Duan, X., Tian, X., Shen, H., Sun, Q. y Chen, G. (2016). "NADPH Oxidase: A Potential Target for Treatment of Stroke." Oxid Med Cell Longev 2016: 5026984.
- Zhang, R., Kang, K. A., Kang, S. S., Park, J. W. y Hyun, J. W. (2011). "Morin (2',3,4',5,7-pentahydroxyflavone) protected cells against gamma-radiation-induced oxidative stress." Basic Clin Pharmacol Toxicol 108(1): 63-72.
- Zhang, R., Kang, K. A., Piao, M. J., Maeng, Y. H., Lee, K. H., Chang, W. Y., You, H. J., Kim, J. S., Kang, S. S. y Hyun, J. W. (2009). "Cellular protection of morin against the oxidative stress induced by hydrogen peroxide." Chem Biol Interact 177(1): 21-27.
- Zhang, S. Q., Obregon, D., Ehrhart, J., Deng, J., Tian, J., Hou, H., Giunta, B., Sawmiller, D. y Tan, J. (2013). "Baicalein reduces beta-amyloid and promotes nonamyloidogenic amyloid precursor protein processing in an Alzheimer's disease transgenic mouse model." J Neurosci Res 91(9): 1239-1246.
- Zhang, X., Li, Y., Xu, H. y Zhang, Y. W. (2014). "The gamma-secretase complex: from structure to function." Front Cell Neurosci 8: 427.

- Zhang, X. M., Zhang, L., Wang, G., Niu, W., He, Z., Ding, L. y Jia, J. (2015). "Suppression of mitochondrial fission in experimental cerebral ischemia: The potential neuroprotective target of p38 MAPK inhibition." Neurochem Int 90: 1-8.
- Zhao, H., Sapolsky, R. M. y Steinberg, G. K. (2006). "Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke." Mol Neurobiol 34(3): 249-270.
- Zhao, L., Liu, X., Liang, J., Han, S., Wang, Y., Yin, Y., Luo, Y. y Li, J. (2013). "Phosphorylation of p38 MAPK mediates hypoxic preconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemic injury via mitochondria translocation of Bcl-xL in mice." Brain Res 1503: 78-88.
- Zhao, Y. y Zhao, B. (2013). "Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease." Oxid Med Cell Longev 2013: 316523.
- Zheng, H. y Koo, E. H. (2011). "Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein." Mol Neurodegener 6(1): 27.
- Zhou, Z. D., Chan, C. H., Ma, Q. H., Xu, X. H., Xiao, Z. C. y Tan, E. K. (2011). "The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease." Cell Adh Migr 5(4): 280-292.
- Zhu, M., Li, J., Wang, K., Hao, X., Ge, R. y Li, Q. (2016). "Isoquercitrin Inhibits Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis of EA.hy926 Cells via the PI3K/Akt/GSK3beta Signaling Pathway." Molecules 21(3): 356.