



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“Efecto neuroprotector de quercetina e hidroxitirosol y su uso como potencial nutracéutico en la prevención de la enfermedad de Alzheimer”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Antonia Carolina González Madrid

Director de Seminario de Título
Dr. Ricardo Maccioni Baraona

Codirectora de Seminario de Título
Dra. Camila Calfío Painemal

Marzo 2023
Santiago – Chile



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

ANTONIA CAROLINA GONZÁLEZ MADRID

“Efecto neuroprotector de quercetina e hidroxitirosol y su uso como potencial nutracéutico en la prevención de la enfermedad de Alzheimer”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Ricardo Maccioni
Director Seminario de Título

Dra. Camila Calfío
Co-directora de Seminario de Título

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dr. Elías Utreras
Presidente

Dra. Alexia Núñez
Evaluadora

Santiago de Chile, Marzo 2023

AGRADECIMIENTOS

En primero lugar, quiero agradecer al equipo del Laboratorio de Neurociencias y Medicina Funcional. A mi tutor de tesis Dr. Ricardo Maccioni, por confiar en mis capacidades y por alentarme a ser mejor científica. A mi co-tutora Camila, por ser paciente y entregarme su apoyo en cada momento, por ser una científica y mujer bacán, una gran referente para mi futuro. A mis compañeros de laboratorio, Andrea y Cristian por ayudarme y motivarme día a día. Una mención honrosa y especial a mi compañera del laboratorio Valentina, que entramos juntas y nos apoyamos al 100% desde ese momento, gracias por apañarme tanto y escuchar conmigo esas playlist de música 2010 para motivarnos en un día cargado, por estar en las alegrías y en las frustraciones. Gracias infinitas.

También agradecer cordialmente a mi comisión evaluadora, Dr. Elías Utreras y Dra. Alexia Núñez, por las sugerencias y consejos para lograr la mejor versión de mi trabajo.

Agradecer a mi familia, ustedes son lo más lindo que tengo en este mundo. En especial quiero agradecer a mis papás, Francia y Rodrigo, les agradezco por todo su amor y sacrificio. Por permitirme volar y apoyar mis sueños. Gracias infinitas por entregarme y ensañarme los valores más lindos que me hacen ser la mujer que soy. Nunca podré agradecerles lo suficiente por todo lo que han hecho por mí. A mis hermanas, Sofía y Josefa. Por ser el motor de mi vida, por ser las mejores compañeras de risas, apañes, secretos y mucho más...les agradezco por darme la motivación y por estar ahí sin importar que. A mi mejor amiga, Rocío. Gracias por acompañarme en estos 5 años de

Universidark. Gracias por escucharme siempre, alentarme y apoyarme sin juzgar. Tu amistad es lo más lindo que me dejó la U. Y a mi pareja, Aníbal, por amarme y estar siempre. Gracias por ser mi pilar fundamental en los altos y bajos de esta etapa (y muchas otras), por ser mi compañero de vida y mi mejor amigo. Gracias por mantenerte siempre a mi lado, por verme cumplir metas y por compartir sueños conmigo. ¡Los amo hasta el infinito y con toooooodo mi corazón!

Finalmente agradecer al proyecto FIC BIP n° 40.036.329-0 y al Centro Internacional de Biomedicina (ICC) por financiar el desarrollo y término de este seminario de título.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	1
ÍNDICE DE CONTENIDO	3
ÍNDICE DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 La enfermedad de Alzheimer	12
1.2 La proteína tau y su rol patológico en la EA	14
1.2.1 Sitios de fosforilación patológicos de tau	16
1.3 Terapias y tratamientos contra la EA.....	18
1.3.1 Terapias monotarget.....	20
1.3.2 Terapias multitarget	20
1.4 Rol de los nutraceuticos en el Alzheimer	21
1.4.1 QUERCETINA	23
1.4.2 HIDROXITIRO SOL	26
1.5 Hipótesis	30
1.6 Objetivos	30
1.6.1 Objetivo general.....	30

1.6.2	Objetivos específicos (OE)	30
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1	Expresión y purificación de rhtau-40	31
2.2	Agregación de rhtau-40 <i>in vitro</i> libre de células.....	32
2.3	Inhibición de la agregación de rhtau-40 por Q más HT	33
2.4	Estandarización y establecimiento de un modelo de daño celular inducido por rhtau-40 fosforilada en la línea celular SH-SY5Y	34
2.5	Evaluación del efecto de la combinación Q más HT en la viabilidad celular de SH-SY5Y	36
2.6	Evaluación del efecto neuroprotector de la combinación Q más HT en el modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40	37
2.7	Análisis Estadístico	39
3.	RESULTADOS.....	40
3.1	Las combinaciones de Q más HT inhiben en su mayoría la agregación de rhtau-40 en un modelo <i>in vitro</i> libre de células	40
3.2	Establecimiento de un nuevo modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y	42
3.3	Efecto neuroprotector de la combinación de Q más HT en células SH-SY5Y tratadas con la proteína rhtau-40	46
4.	DISCUSIÓN.....	53
5.	CONCLUSIONES.....	61
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	62

7. ANEXOS 68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronología de los principales acontecimientos fisiopatológicos de la EA en relación con la evolución clínica.

Figura 2. Esquema de la agregación patológica de tau en la EA.

Figura 3. Sitios de fosforilación patológicos reportados en la secuencia de tau.

Figura 4. Terapias monotarget vs Terapias multitarget contra la Enfermedad de Alzheimer.

Figura 5. Mecanismo de acción de Q en el contexto de la EA.

Figura 6. Mecanismo de acción de HT en el contexto de la EA.

Figura 7. Determinación del efecto de Q y HT en la agregación de rhtau-40 *in vitro* libre de células.

Figura 8. Evaluación de la fluorescencia neta de ThS a diferentes concentraciones de rhtau-40 en un ensayo *in vitro* libre de células.

Figura 9. Evaluación del efecto de rhtau-40 en la viabilidad celular de SH-SY5Y.

Figura 10. Reconocimiento de la proteína rhtau-40 fosforilada por el anticuerpo ptau181.

Figura 11. Determinación de la viabilidad celular en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas solo con Q más HT.

Figura 12. Evaluación del efecto de las distintas combinaciones de Q más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con la proteína rhtau-40 fosforilada.

Figura 13. Evaluación del efecto de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en el daño celular inducido por rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y.

Figura 14. Imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 en presencia o ausencia de Q (1 μ M) más HT (1 μ M).

Figura 15. Cuantificación del número de células viables luego del tratamiento con rhtau-40 en presencia o ausencia de Q (1 μ M) más HT (1 μ M).

Figura 16. Modelo propuesto del efecto neuroprotector de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40.

Anexo Figura suplementaria 1. Determinación de la capacidad antioxidante de Q y HT.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AD** Enfermedad de Alzheimer
- AKT** Proteína quinasa B
- APOE** apolipoproteína E
- APP** Proteína precursora de amiloide
- ARE** Elemento de respuesta antioxidante
- A β** Beta amiloide
- BACE-1** Enzima 1 que escinde APP en el sitio β
- BSA** Albumina de suero bovino
- Cdk5** Quinasa dependiente de ciclina 5
- DAPI** 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMSO** Dimetil Sulfóxido
- DO** Densidad óptica
- DPPH** 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
- EA** Enfermedad de Alzheimer
- ERK1/2** Quinasa regulada por señales extracelulares
- FBS** Suero fetal bovino
- Gsk-3 β** Glicógeno Sintasa quinasa 3-beta
- HPLC** Cromatografía líquida de alta presión
- HT** Hidroxitirosol
- IPTG** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- JNK** Quinasa c-Jun N-terminal
- LB** Medio Luria-Bertoni
- LDH** Lactato deshidrogenasa

MAPs Proteínas Asociadas a Microtúbulos

MEM Medio esencial mínimo

mTOR Diana mamífera de la rapamicina

MTT Bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio

NFTs Filamentos neurofibrilares

NF- κ B Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NMDA Ácido N-metil-D-aspártico

Nrf2 Factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2

PBS Tampón Fosfato Salino

PFA Paraformaldehído

PHFs Filamentos Helicoidales Pareados

PMSF Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PP1A Proteína Fosfatasa 1A

PP2A Proteína Fosfatasa 2A

Q Quercetina

rhtau-40 Proteína tau recombinante humana

RIPA Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación

ROS Especies reactivas de oxígeno

SDS Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

SIRT1 Sirutina 1

SQTM1/ p62 Sequestosoma 1

TBS Solución salina tamponada con Tris

ThS Tioflavina S

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una patología neurodegenerativa caracterizada principalmente por el deterioro progresivo de la cognición y cambios en la conducta del paciente. La EA afecta principalmente a la población mayor de 60 años que en los últimos años ha tenido un importante crecimiento, por ende, la incidencia es cada vez mayor. Por esta razón, hoy en día diferentes investigaciones apuntan a la necesidad de generar protocolos clínicos validados con un enfoque preventivo para controlar la EA. Entre las acciones preventivas se ha reportado el uso de nutracéuticos debido a las propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antiagregantes de proteínas patológicas que poseen las moléculas bioactivas que estos presentan y los efectos neuroprotectores en el contexto de la EA. Las moléculas bioactivas sobre las cuales se enfocó este Seminario de Título son la quercetina (Q) y el hidroxitirosol (HT). Bajo este escenario, se propuso que la acción de Q y HT en combinación, tiene un efecto neuroprotector actuando sobre la proteína tau recombinante humana (rhtau-40), siendo esta combinación un fuerte candidato nutracéutico ante la búsqueda de compuestos preventivos para la EA. Para comprobar lo anterior, se utilizó un nuevo modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada en células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y. Se demostró que la combinación Q (1 μ M) y HT (1 μ M) revierte el daño celular (10,8%) y la citotoxicidad (7,8%) inducida por rhtau-40 fosforilada. Además, inhibe la agregación de rhtau-40 en un 19,3% en un modelo *in vitro* libre de células, posee actividad antioxidante y es segura en la línea celular SH-SY5Y, comprobando entonces su efecto neuroprotector. La combinación Q más HT se propone como un fuerte candidato nutracéutico potencialmente comercial que apunta al tratamiento y prevención de la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative pathology characterized by progressive deterioration of cognition and changes in the patient's behavior. AD affects the population over 60 years of age, which in recent years has had a significant growth, therefore, the incidence is increasing. For this reason, nowadays different investigations point to the need to generate validated clinical protocols with a preventive approach to control AD. Among the preventive actions, the use of nutraceuticals has been reported due to the anti-inflammatory, antioxidant and antiaggregating properties of the bioactive molecules they present and their neuroprotective effects in the context of AD. The bioactive molecules on which this Title Seminar focused are quercetin (Q) and hydroxytyrosol (HT). Under this scenario, it was proposed that the action of Q and HT in combination, has a neuroprotective effect acting on the human recombinant tau protein (rhtau-40), being this combination a strong nutraceutical candidate in the search for preventive compounds for AD. To evaluate the above, a new model of cell damage induced by phosphorylated rhtau-40 protein in human neuroblastoma cells, SH-SY5Y, was used. The combination Q (1 μ M) and HT (1 μ M) was shown to reverse the cell damage (10.8%) and cytotoxicity (7.8%) induced by phosphorylated rhtau-40. Moreover, it inhibits rhtau-40 aggregation by 19.3% in a cell-free *in vitro* model, possesses antioxidant activity and is safe in the SH-SY5Y cell line, thus proving its neuroprotective effect. The combination Q plus HT is proposed as a strong potentially commercial nutraceutical candidate targeting the treatment and prevention of AD.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La enfermedad de Alzheimer

La población de adultos mayores en el mundo actual ha incrementado en los últimos 50 años como consecuencia de los importantes avances tecnológicos y científicos que permiten a las personas prolongar su esperanza de vida. Según datos de la ONU del 2022, se calcula que en el año 2050 la población de más edad alcance los 1600 millones en 2050 (ONU, 2022). La prolongación de la vida ha contribuido a la aparición de enfermedades relacionadas con la vejez y para las que actualmente no existe cura, entre ellas la enfermedad de Alzheimer (EA) (Solomon y col., 2014; Guzman-Martinez y col., 2021a).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta principalmente a los adultos mayores y se caracteriza por la pérdida de memoria y las funciones cognitivas. Actualmente representa un gran desafío para la salud pública («2021 Alzheimer's disease facts and figures», 2021).

La etiología de la EA es multifactorial y aún no se conoce completamente. La acumulación de agregados de A β y ovillos neurofibrilares (NFTs) en las neuronas son la causa principal de la enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado que la inflamación crónica, el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial contribuyen al desarrollo y la progresión de la EA (Maccioni y col., 2009; Huang & Mucke, 2012). Factores genéticos, como la presencia del alelo APOE ϵ 4 también han sido implicados en la patogénesis de

la enfermedad, contribuyendo a un porcentaje minoritario (~1%) dentro de las causas de la EA (Bertram & Tanzi, 2005; Yamazaki y col., 2019). Algunos de los acontecimientos fisiopatológicos claves de la EA se representan en la Fig. 1.

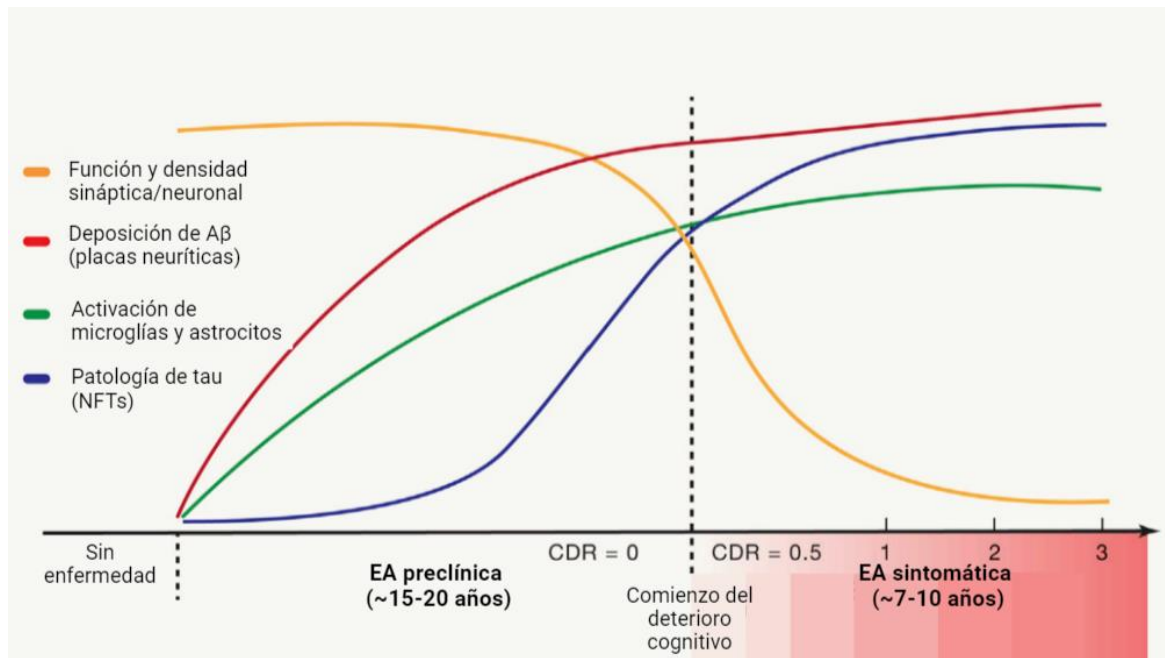


Figura 1. Cronología de los principales acontecimientos fisiopatológicos de la EA en relación con la evolución clínica. La fase preclínica prolongada de la EA se caracteriza por el inicio temprano del depósito de A β . Al mismo tiempo, se producen cambios neuroinflamatorios tempranos (como la activación de la microglía). A esto le sigue la propagación de la patología tau de ovillos neurofibrilares (NFTs). La disfunción sináptica, la pérdida de sinapsis y la neurodegeneración se acumulan con la propagación patológica de los agregados tau. El inicio y la progresión del deterioro cognitivo se correlacionan con la acumulación de tau y la pérdida de volumen del hipocampo, pero no con la deposición de amiloide. El inicio y la gravedad de los síntomas clínicos de la EA pueden estadificarse mediante el uso de la escala Clinical Dementia Rating (CDR),

en la que una puntuación de 0 indica una cognición normal y puntuaciones de 0,5, 1, 2 y 3 indican una demencia dudosa, leve, moderada y grave, respectivamente. (Long & Holtzman, 2019).

Se ha propuesto que las hiperfosforilaciones de la proteína tau son una vía común en la patogénesis de la EA, en la que se combinan una serie de mecanismos de señalización de factores internos y externos que activan señales de daño a través de una retroalimentación positiva, como se propone en la teoría de la neuroinmunomodulación. Este fenómeno conlleva a la degeneración neuronal generalizada característica de la EA (Maccioni y col., 2009; Maccioni y col., 2018).

1.2 La proteína tau y su rol patológico en la EA

La proteína tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs). Tau es una proteína intracelular altamente soluble que se encuentra en el sistema nervioso central. En condiciones fisiológicas, la tau se une y estabiliza a los microtúbulos, permitiendo que las células nerviosas mantengan su estructura y comunicación nerviosa adecuada (Weingarten y col., 1975; Arendt y col., 2016).

La proteína tau se compone de una región amino-terminal (N-terminal) y una región carboxilo-terminal (C-terminal), que están unidas por un dominio central que contiene múltiples motivos repetitivos de unión a microtúbulos (Morris y col., 2011). Además, es una proteína altamente polimórfica debido a los numerosos eventos de corte y empalme alternativo que dan lugar a la generación de múltiples isoformas. En humanos, se han identificado al menos seis isoformas de tau, que varían en tamaño y estructura debido a

la presencia o ausencia de diferentes regiones en el extremo amino-terminal y en el dominio de unión a microtúbulos (Goedert y col., 1989). La isoforma más común de tau en el cerebro humano es la isoforma 4R, compuesta de cuatro repeticiones de dominios de unión a microtúbulos. Sin embargo, también existen otras isoformas de tau, como la isoforma de 3R, que carece de una repetición de dominios de unión a microtúbulos (Gao y col., 2018).

En los últimos años, se ha avanzado significativamente en la comprensión de la función de la proteína tau y su papel en la EA. Se ha demostrado que la acumulación anormal de tau en las neuronas está estrechamente relacionada con la pérdida de la función cognitiva y la progresión de la enfermedad (Maeda y col., 2006).

En cuanto a la acumulación anormal de la proteína tau en la EA, corresponde a un proceso complejo que involucra una serie de eventos postraduccionales, incluyendo fosforilaciones, glicosilaciones y proteólisis. La proteína tau fosforilada en sitios específicos es necesaria para su función normal, pero en la EA, se produce una fosforilación excesiva que altera su estructura proteica y promueve su agregación en filamentos helicoidales pareados (PHFs) que finalmente se convierten en NFTs (Fig. 2). Estos se acumulan principalmente alrededor del soma y en dendritas de las neuronas, afectando la integridad estructural de los microtúbulos y la función celular (Goedert, 1993) llevando a una degeneración de la neurona.

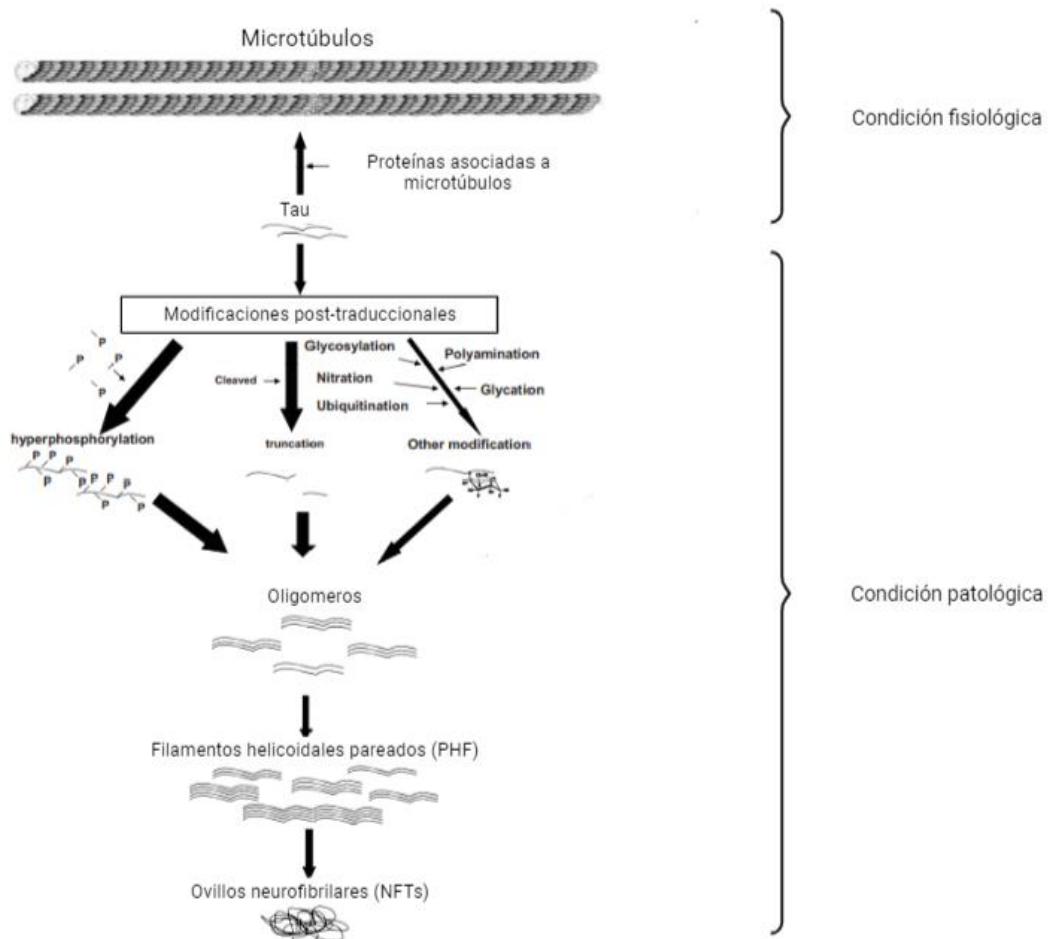


Figura 2. Esquema de la agregación patológica de tau en la EA. Imagen representativa de la diferencia entre condiciones fisiológicas vs patológicas del estado de tau. Las condiciones patológicas están dadas por eventos postraduccionales anteriormente descritos (Farias y col., 2011).

1.2.1 Sitios de fosforilación patológicos de tau

Distintas modificaciones postraduccionales anómalas han sido encontradas en pacientes con EA, estas corresponden principalmente a fosforilaciones excesivas

distribuidas heterogéneamente en la secuencia de la proteína tau. Se han predicho más de 50 sitios de fosforilación modificados en la secuencia de aminoácidos de tau, que incluyen Serina (Ser), Treonina (Thr) y Tirosina (Tyr) (Drepper y col., 2020; Wegmann y col., 2021), los que se representan en la Fig. 3A. Las causas de estas hiperfosforilaciones aún no se conocen con claridad, pero se presume que se deben a una alteración en el balance de la actividad de quinasas como Gsk-3 β y Cdk5 y fosfatasas como PP1A y PP2A (Baptista y col., 2014).

Se ha demostrado una relación causal hipotética entre la fosforilación de tau y la agregación patológica de tau en el cerebro (Köpke y col., 1993). Por ende, la búsqueda de un patrón de fosforilación de tau en la EA y la agregación misma de la proteína a nivel neuronal puede explorarse con el fin de generar nuevos blancos terapéuticos y apuntar a la búsqueda de nuevos biomarcadores de la enfermedad (Wegmann y col., 2021).

Nuestro laboratorio se ha enfocado en la búsqueda constante de nuevas estrategias terapéuticas y diagnósticas en el contexto de la EA. Bajo este escenario, se utiliza la proteína tau recombinante humana (rhtau-40) como modelo de estudio. Durante el año 2022, investigadores del laboratorio identificaron 18 sitios de fosforilación en la proteína rhtau-40 mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS Cuadrupolo TOF) y el programa PEAKS Studio X+ para análisis de las fosforilaciones, hallazgo que se encuentra en proceso de publicación. Algunos de estos sitios son representados en la Fig. 3B.

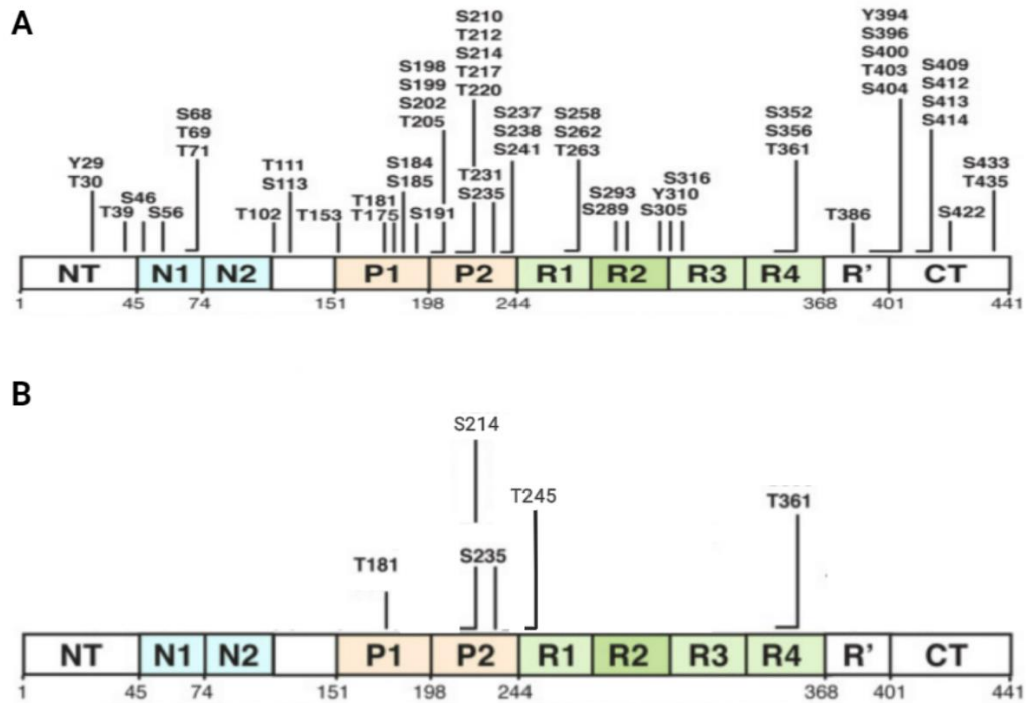


Figura 3. Sitios de fosforilación patológicos reportados en la secuencia de tau. (A)

Sitios de fosforilación de tau reportados en cerebros de pacientes con EA postmortem (Wegmann y col., 2021). **(B)** Sitios de fosforilación identificados en rhtau-40 (Data no publicada).

Ilustración propia modificada de Wegmann y col. (2021). Se representa la

secuencia de la isoforma de tau más extensa (2N4R) de 441 aminoácidos, en donde los residuos fosforilados se simbolizan con la letra S (Serina), T (Treonina) e Y (Tirosina).

La isoforma 2N4R contiene dos insertos N-terminales representados en color celeste (N1 y N2), dos regiones ricas en prolina representadas en color naranja (P1 y P2) y

cuatro repeticiones de unión a microtúbulos representadas en color verde (R1, R2, R3 y R4). También se identifica el segmento de repetición R' en el extremo C.

NT y CT corresponden al extremo N-Terminal y C-Terminal de la secuencia respectivamente.

1.3 Terapias y tratamientos contra la EA

Actualmente existen dos tipos de terapias para tratar la EA: (i) Las terapias monotarget, que se basan en tratamientos farmacológicos apuntados a una única diana molecular donde su eficacia y duración varían entre pacientes (Maccioni y col., 2022). (ii) Las terapias multitarget, enfocadas en múltiples objetivos biológicos de la enfermedad, ofreciendo así mejoras en la prevención y tratamiento de la EA (Fig. 4).

Por otra parte, se ha demostrado que las intervenciones no farmacológicas, como el ejercicio físico, la dieta saludable, el entrenamiento cognitivo y la estimulación cerebral no invasiva, pueden mejorar la calidad de vida de los pacientes con EA. Estos enfoques pueden ayudar a retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la capacidad funcional de los pacientes (Guzman-Martinez y col., 2021a).

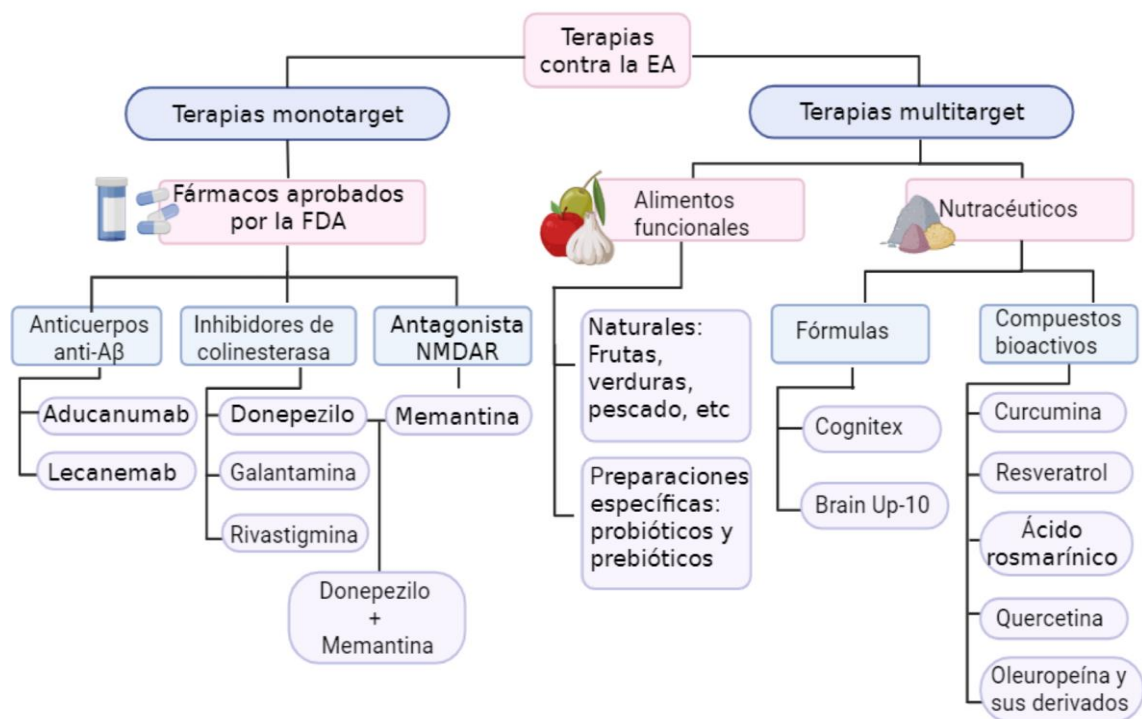


Figura 4. Terapias monotarget vs Terapias multitarget contra la Enfermedad de Alzheimer. Diagrama comparativo de las terapias utilizadas actualmente en la EA. *Ilustración propia modificada de Maccioni y col. (2022).*

1.3.1 Terapias monotarget

Hoy en día existen 6 fármacos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) que controlan la pérdida de memoria y cognición característica de la EA. Entre ellos están los anticuerpos monoclonales IgG1 anti-A β (Aducanumab y Lecanemab) (Sevigny y col., 2016; Van Dyck y col., 2023); los inhibidores de colinesterasa dirigidos únicamente a mejorar los síntomas cognitivos a través de la potenciación colinérgica (Donepezilo, Galantamina y Rivastigmina) (Anand & Singh, 2013); y el antagonista del receptor NMDA (Memantina) (Winblad y col., 2007) que actúa sobre la inhibición de la excitotoxicidad mediada por la hiperactivación de este receptor. En los casos de EA de moderada a grave, se ha utilizado la combinación de Donepezilo y Memantina para mejorar la capacidad cognitiva y funcional (Howard y col., 2012).

1.3.2 Terapias multitarget

Como ya se ha discutido anteriormente, la EA posee una naturaleza compleja y multifactorial, por ende, hoy en día las investigaciones y la industria farmacéutica se han enfocado en la búsqueda de nuevas terapias contra la enfermedad que actúen no en una única diana molecular, sino que en múltiples objetivos biológicos característicos de

la EA. Las terapias multitarget se han orientado en vías moleculares relacionadas con: proteínas mal plegadas ($A\beta$ y tau), la integridad sináptica, trastornos cognitivos, autofagia y disfunciones mitocondriales, así como las respuestas pro y antiinflamatorias (Van Bulck y col., 2019; Guzman-Martinez y col., 2021a). En este contexto, los alimentos funcionales y los nutraceuticos han tomado importancia en cuanto a la prevención y tratamiento. Los alimentos funcionales se consideran beneficiosos para la salud y estos pueden ser naturales, como el pescado, las frutas o las verduras, o bien pueden ser preparaciones específicas, como los prebióticos, que pueden ayudar a proteger el cuerpo contra enfermedades crónicas y trastornos patológicos (Maccioni y col., 2022). Por otra parte, los nutraceuticos provenientes de la dieta que se han propuesto como una opción de tratamiento no farmacológico para la enfermedad de Alzheimer debido a sus propiedades antioxidantes, antiagregantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras (Calfío y col., 2020).

1.4 Rol de los nutraceuticos en el Alzheimer

Los nutraceuticos se definen como compuestos bioactivos que provienen de la dieta, que se presentan en un formato como polvo, cápsula, jarabe, etc., y están en una concentración superior a la de un alimento (Maccioni y col., 2022). Se caracterizan por sus efectos beneficiosos en el organismo debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras (Calfío y col., 2020). En el contexto del tratamiento y la prevención de la EA los nutraceuticos se han propuesto como una terapia multitarget debido a sus diferentes mecanismos en la salud neuronal debido a propiedades antiagregantes de proteínas mal plegadas ($A\beta$ y tau) y neuroprotectoras.

Las fórmulas nutracéuticas más investigadas a través de estudios clínicos en la EA son Cognitex®, el cual ha demostrado mejoras en la memoria y una mejora en el rendimiento cognitivo (Prickaerts y col., 2017). Entre sus compuestos bioactivos encontramos L- α -glicerofosfocolina (GPC), fosfatidilserina (PS) con ácidos grasos omega 3 unidos a su espina dorsal (PS-omega 3), vinpocetina, uridina-5'-monofosfato (UMP), pregnenolona, entre otros; y la fórmula nutracéutica BrainUp-10®, la cual ha demostrado tener efectos neuroprotectores y antiagregantes de la proteína tau (Cornejo y col., 2011; Calfío y col., 2020), además de mejorar el malestar neuropsiquiátrico en pacientes con EA (Guzman-Martinez y col., 2021b). Este nutracéutico contiene vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico y Shilajit andino en su formulación.

Son considerados nutracéuticos también, aquellos productos que se enfocan en aprovechar las propiedades de uno o más compuestos bioactivos presentes en los alimentos. Algunos de los compuestos bioactivos que han demostrado eficacia en el contexto de la EA son la curcumina, la cual gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias ha demostrado que reduce la acumulación de la proteína beta-amiloide en el cerebro en modelos animales de la EA (Hamaguchi y col., 2010); el resveratrol, una fitoalexina que actúa en el retraso del deterioro cognitivo en pacientes con EA (Tosatti y col., 2022); el ácido rosmarínico que reduce la agregación de A β relacionado con la progresión de la EA (Hase y col., 2019); la quercetina, un flavonol que con sus acciones antioxidantes protege a las neuronas del daño oxidativo (Calfío y col., 2020; Maccioni y col., 2022); la oleuropeína y sus derivados como el hidroxitirosol, que promueven la autofagia y la eliminación de agregados involucrados en la EA (Cordero y col., 2018), entre otros.

1.4.1 QUERCETINA

La quercetina (Q) es un flavonol presente en alimentos como la cebolla, la manzana, el perejil, las bayas, entre otros. Corresponde a uno de los compuestos bioactivos más consumidos en la dieta diaria y se destaca por ser un fuerte antioxidante otorgando múltiples beneficios en el organismo. La estructura química de Q consta de tres anillos: A, B y C. Este último posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo (OH) en posición 3. Se cree que este flavonol puede atravesar la barrera hematoencefálica dada a su naturaleza lipofílica (Deepika & Maurya, 2022), lo cual es clave en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas.

La Q juega un papel crucial en diferentes vías implicadas en la patogénesis de la EA gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes y neuroprotectoras. Diversos estudios han demostrado los beneficios de Q en un contexto de terapia multitarget contra la EA. A continuación, se proporciona un breve resumen de la acción de Q en distintas vías implicadas en la EA (Fig. 5).

Q y el estrés oxidativo en la EA

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa antioxidante del sistema biológico (Betteridge, 2000). Debido a la alta actividad antioxidante de Q atribuida por el grupo catecol y el grupo OH que presenta, estudios han demostrado que esta molécula modula vías de señalización y expresiones génicas involucradas en el balance del estrés

oxidativo como ERK1/2, PI3K/Akt, JNK (Zhang y col., 2020).

Otra vía en la que se ha demostrado el efecto antioxidante de Q es en la vía Nrf2-ARE. El factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) corresponde a un importante regulador de la defensa celular contra el estrés oxidativo causado en la EA, en condiciones fisiológicas, Nrf2 se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) promoviendo la transcripción de una amplia gama de genes involucrados en la respuesta antioxidante (Gan & Johnson, 2014). Investigaciones, han demostrado que la administración de Q (25 μ M) activa la vía Nrf2-ARE disminuyendo así el estrés oxidativo (Arredondo y col., 2010; Costa y col., 2016).

Q y los agregados A β en la EA

Investigaciones han demostrado que flavonoles, como el compuesto Q, regulan la expresión de la enzima β -secretasa-1 (BACE-1) al interactuar con el factor de transcripción NF- κ B inhibiendo la formación de oligómeros de A β en células SH-SY5Y (Paris y col., 2011; Khan y col., 2019). En la EA, la subunidad p65 de NF- κ B se une a los elementos κ B en el promotor de BACE-1 induciendo la expresión de esta enzima (Chen y col., 2012). BACE-1, junto con la enzima γ -secretasa, desempeña un papel clave en la escisión de la proteína precursora amiloide (APP) a través de la vía amiloidogénica, lo que conduce a la formación y liberación de péptidos A β al medio extracelular (Hampel y col., 2021).

Q y agregados de tau en la EA

En cuanto a la relación de la Q y la hiperfosforilación de tau, un estudio demostró que el pretratamiento con Q en una línea celular de neuronas hipocampales de ratón, HT22, inhibe la hiperfosforilación de tau posiblemente por la inhibición de la actividad de Cdk5, quinasa que fosforila tau (Shen y col., 2018; Calfío y col., 2020).

La Q es un nutracéutico que ha mostrado efectos prometedores en la prevención y el tratamiento de la EA tanto en estudios en animales como en células humanas cultivadas en el laboratorio catalogándolo como opción terapéutica complementaria a los tratamientos convencionales.

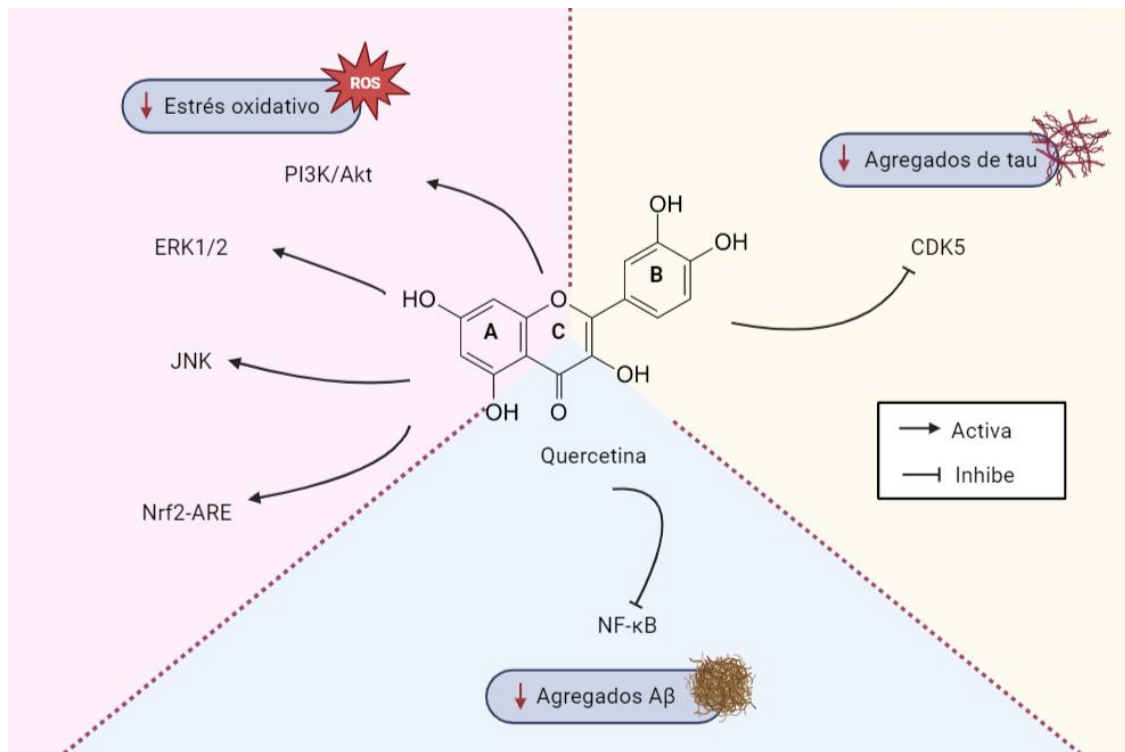


Figura 5. Mecanismo de acción de Q en el contexto de la EA. Vías relacionadas con la enfermedad de Alzheimer en las cuales participa la Q. PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa;

AKT: proteína quinasa B; ERK1/2: quinasa regulada por señales extracelulares; JNK: quinasa c-Jun N-terminal; Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2; ARE: elemento de respuesta antioxidante; NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; Cdk5: Quinasa dependiente de ciclina 5. *Ilustración propia modificada de Maccioni y col. (2022).*

1.4.2 HIDROXITIRO SOL

El hidroxitiro sol (HT) es un polifenol presente en la fracción soluble del aceite de oliva extra virgen y en las hojas de olivo. Su estructura química consta de un grupo catecol que cuenta con dos grupos hidroxilos adyacentes en posición orto y se caracteriza por ser uno de los antioxidantes naturales más potentes (Pérez-Bonilla y col., 2014). Al igual que la Q, las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del HT sitúan a este compuesto como un fuerte candidato en la terapia de la EA, su papel se ha estudiado en diferentes vías relacionadas con la patogénesis de la enfermedad. A continuación, se presenta un breve resumen de la participación de HT en distintas vías que se relacionan con los eventos patológicos característicos de la EA (Fig. 6).

HT y el estrés oxidativo en la EA

Un estudio demostró que el HT activa la vía de señalización Nrf-ARE que conlleva a la producción de glutatión (GSH), principal antioxidante biológico en el organismo (Zou y col., 2012). Lo anterior podría relacionarse a la acción del HT como regulador del estrés oxidativo en la EA, pese a que no hay una relación directa entre este compuesto y su rol

antioxidante en la enfermedad.

HT y la autofagia en la EA

Se ha demostrado que el HT participa indirectamente en el aumento de la transcripción del Sequestoma 1 (SQTM1/p62) induciendo la activación de la autofagia en condrocitos (C-28/I2) bajo estrés oxidativo (Cetrullo y col., 2016). La autofagia se define como el proceso que mantiene la homeostasis celular a través de la eliminación y el reciclaje de macromoléculas mediante autofagosomas (Komatsu & Ichimura, 2010). SQTM1/p62 corresponde a una proteína de andamio que ancla las proteínas ubiquitinadas a la membrana del autofagosoma promoviendo la degradación de moléculas no deseadas (Ma y col., 2019) como agregados A β y NFTs. De acuerdo con lo anterior, el HT podría participar en procesos de autofagia relacionados con la patogénesis de la EA.

HT y los agregados A β en la EA

La administración de HT (100 mM) disminuye la toxicidad causada por agregados A β en células SH-SY5Y (Leri y col., 2019). En este mismo contexto, se ha demostrado que la administración de HT (50 μ M) en líneas celulares de neuroblastoma de ratón N2a disminuye la muerte celular provocada por agregados de A β mediante una disminución de la expresión de NF- κ B (St-Laurent-Thibault y col., 2011).

HT y la disfunción mitocondrial en la EA

El déficit energético mitocondrial es una disfunción intracelular compartida por muchos

trastornos neurodegenerativos, entre ellos la EA. Se ha demostrado que el HT aumenta la formación de nuevas mitocondrias (biogénesis mitocondrial) seguido de una mayor fusión mitocondrial y, además, aumenta la concentración de ATP en un modelo celular de disfunción mitocondrial en células 7PA2 (Visioli y col., 2020). Esta evidencia sugiere que el HT podría revertir el desbalance energético en la disfunción mitocondrial relacionada con la EA.

HT y agregados de tau en la EA

El HT y su precursor oleuropeína han demostrado un efecto inhibitor en la agregación de la proteína tau en un modelo *in vitro* libre de células (Daccache y col., 2011). Además, un extracto acuoso de oliva enriquecido en 40-50% de HT (HidroX®), disminuye la expresión phospho-tau en hipocampo de ratas (Cordaro y col., 2021).

Por otra parte, un ensayo clínico en curso (NCT:04440020) con 100 pacientes entre 55 a 85 años se evalúan los efectos de la administración de HT en pacientes con alteración cognitiva diagnosticada, incluyendo pérdida de memoria y demencia. Este estudio incluye análisis cognitivos, de neuroimagen y medición de varios marcadores de neurodegeneración para determinar el rol neuroprotector del HT (Silva y col., 2021).

De acuerdo con todo lo anterior, se evidencia que este compuesto bioactivo ha sido objeto de estudio a nivel general en el contexto de EA, pero no se ha especificado mayormente las vías de señalización y mecanismos involucrados.

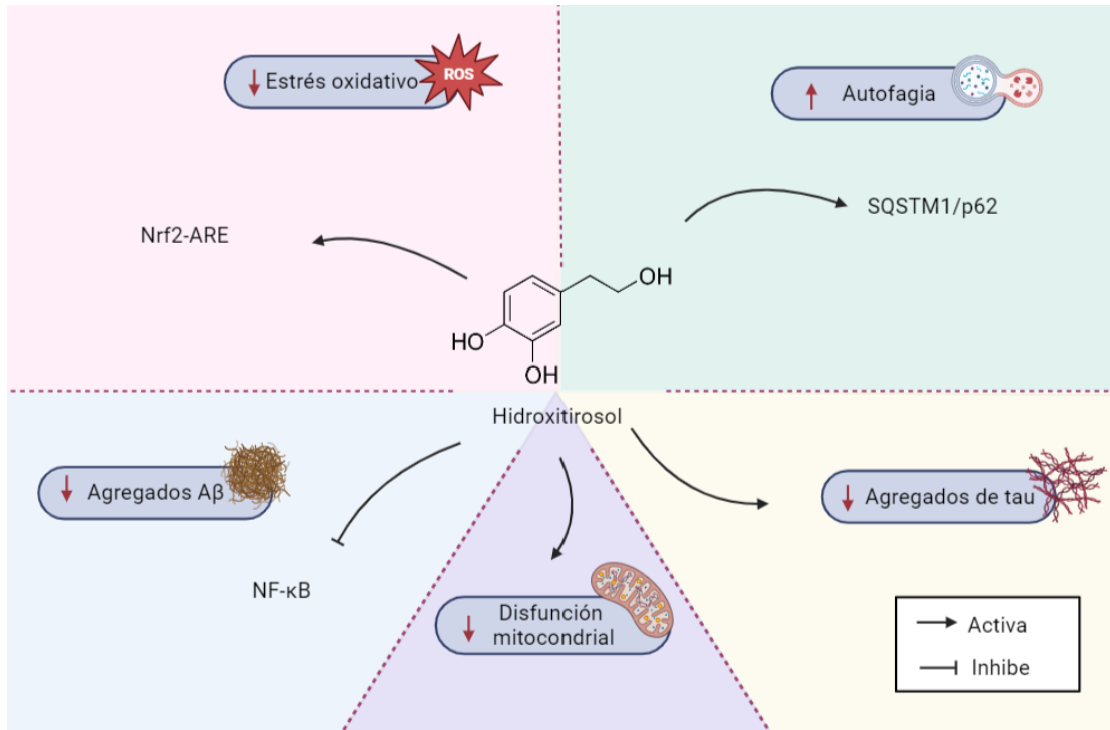


Figura 6. Mecanismo de acción de HT en el contexto de la EA. Diagrama unificado basado en estudios que involucran la acción de HT en diferentes vías relacionadas con la enfermedad de Alzheimer. SQSTM1/ p62: sequestosoma 1; Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2; ARE: elemento de respuesta antioxidante; NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

Basado en las propiedades descritas de los compuestos bioactivos HT y Q, resulta interesante investigar cómo la combinación de estos compuestos podría potenciarse en relación con sus efectos individuales y, de esta manera, desarrollar un nuevo nutraceutico neuroprotector para la EA con acción multitarget.

1.5 Hipótesis

La combinación de quercetina e hidroxitirosol ejerce un efecto neuroprotector al disminuir la agregación y el daño celular inducido por la proteína rhtau-40 en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar la acción antiagregante y neuroprotectora de la combinación de quercetina (Q) e hidroxitirosol (HT) en el daño celular inducido por la proteína tau recombinante humana (rhtau-40) en la línea celular SH-SY5Y.

1.6.2 Objetivos específicos (OE)

OE1: Determinar el efecto de la combinación de Q más HT sobre la agregación de rhtau-40 en un ensayo *in vitro* libre de células.

OE2: Establecer un modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada en la línea celular SH-SY5Y.

OE3: Evaluar el efecto neuroprotector de la combinación de Q más HT en el modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Expresión y purificación de rhtau-40

La secuencia de htau40 (isoforma 2N4R) fue gentilmente donada por el Dr. Eckard Mandelkow (Hamburgo, Alemania). Este fragmento se clonó en un vector pET-28^a (Novagen) para producir una proteína marcada con histidina. La proteína htau40 se expresó en la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) (ThermoFisher), utilizada ampliamente para la producción de proteínas recombinantes. Esta colonia creció a 37°C en medio LB suplementado con 30 µg/mL de kanamicina hasta que alcanzó una densidad óptica (OD) adecuada de 0,6. Luego, esta colonia fue inducida con 1 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, US Biological Life Sciences) durante 2.30 h aproximadamente. Transcurridas las 2.30 h, el caldo que contenía la bacteria se centrifugó a 13.500xg en ciclos de 5 min a 25°C obteniéndose un pellet.

El pellet obtenido anteriormente fue tratado con 10 mL de buffer de extracción, y posteriormente se centrifugó durante 30 min a 13.500xg en una temperatura de 4°C. Se recolectó la fracción soluble y se dejó agitando durante 2 h con 3,5 mL de resina (Ni-Sepharose, Cytiva) previamente ambientada y lavada con Buffer de unión (preparación de: Na₂H₂PO₄ 20 mM, Imidazol 20 mM, NaCl 500 mM).

La solución se sometió a cromatografía en columna de exclusión molecular para separar las proteínas unidas a ella. Las proteínas fueron eluidas utilizando un buffer de elución (preparación de: Na₂H₂PO₄ 20 mM, Imidazol 200 mM, NaCl 500 mM), y se recolectaron en cuatro fracciones de aproximadamente 2 mL cada una. Mediante SDS-

PAGE al 10%, se analizaron las fracciones que contenían la proteína htau40 y posteriormente estas se sometieron a diálisis durante toda la noche. Para esto se utilizó un buffer de Diálisis pH 7,2 (preparación: $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 20 mM y NaCl 500 mM) que, mediante difusión simple, quitaba el imidazol contenido en las fracciones. Finalmente, se obtuvo la proteína purificada, cuya concentración se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop.

2.2 Agregación de rhtau-40 *in vitro* libre de células

Para formar agregados de la proteína tau previamente purificada se siguió el protocolo descrito por Friedhoff y col. (1998) en donde la htau40 se agrega en presencia del inductor polianiónico heparina (Sigma-Aldrich) en una relación 4:1 proteína-inductor. Para esto se mezcló 70,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 μM) de htau40 y 12,5 μM de heparina en una solución de 100 μL PBS 1x. Ya realizada esta mezcla se dejó incubando a 37°C en agitación constante durante 20 h. Como control negativo se utilizó la proteína en ausencia de heparina.

La agregación se captó mediante el método de fluorescencia con Tioflavina S (ThS, Sigma-Aldrich) según Friedhoff y col. (1998) con algunas modificaciones. La ThS corresponde a una sonda fluorescente que se une a las estructuras de sábana- β formadas, por ende, corresponde a una forma indirecta de medición del nivel de agregación de la proteína rhtau-40. Transcurridas las 20 h se agregó 6,25 μM de ThS a la mezcla de agregación y se dejó incubando durante 1 h en agitación y protegida de la luz. Transcurrido este tiempo, se cuantificó la fluorescencia en un lector de microplacas Infinite M Nano (TECAN) configurado con una excitación a 440 nm y

emisión a 508 nm.

2.3 Inhibición de la agregación de rhtau-40 por Q más HT

En esta sección se utilizaron los compuestos puros Q $\geq 95\%$ (HPLC, Sigma-Aldrich) y HT $\geq 98\%$ (HPLC, Sigma-Aldrich). Q fue disuelta en DMSO (Merck Millipore) y preparada en un stock de 6.620 μM , mientras que HT se disolvió en agua milliQ en una concentración stock de 40.542,3 μM . Se generaron alícuotas de 50 μL para cada compuesto que se conservaron a -20°C .

Se realizaron diluciones seriadas de HT desde 300 μM hasta 1 nM. En el caso de Q, se preparó una concentración única de 1 μM y 10 μM . Posteriormente, se prepararon las diluciones de la combinación de Q más HT para evaluar su efecto en la agregación de rhtau-40. Luego, se co-aplicaron en la mezcla de agregación con rhtau-40, heparina y PBS 1x según lo descrito anteriormente. Como controles del ensayo se utilizaron: la combinación con las concentraciones más altas de los compuestos puros en ausencia de tau y heparina, heparina sola, rhtau-40 en ausencia de heparina y rhtau-40 con heparina como control positivo de la agregación.

El efecto de las combinaciones sobre la agregación de rhtau-40 se determinó mediante ThS (6,25 μM) luego de 20 h de incubación. Tras 1 h de incubación con ThS en agitación constante a 37°C , se cuantificó la fluorescencia en un lector de microplacas con excitación a 440 nm y emisión a 508 nm.

2.4 Estandarización y establecimiento de un modelo de daño celular inducido por rhtau-40 fosforilada en la línea celular SH-SY5Y

Durante el desarrollo de este trabajo se estableció un nuevo modelo de daño celular inducido por la adición de rhtau-40 fosforilada en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (CellZion, AddexBio: C0005004, ATCC: CRL-2266). El establecimiento de este modelo deriva del descubrimiento de nuestro laboratorio en el cual se identificaron sitios de fosforilación en la proteína rhtau-40 mediante espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS Cuadrupolo TOF) y el programa PEAKS Studio X+ para análisis de las fosforilaciones.

Las células se mantuvieron en placas de 100 mm con medio MEM/F12 (MEM/EBSS con Glutamina (HyClone) y Ham's F-12 (Gibco) en relación 1:1) suplementado con suero fetal bovino (FBS, Gibco) al 10% y con una solución de Penicilina/Estreptomicina 100x (Corning) al 1%. Cabe destacar que, para realizar los experimentos posteriormente mencionados, se cultivaron células en placas de 96 pocillos.

Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad

Para el establecimiento del modelo de daño celular, en primer lugar, se evaluó la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con diferentes concentraciones de rhtau-40 (0, 7, 14, 21 y 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 h. Transcurrida la incubación, se añadieron 20 μL de una solución de 12 mM de MTT (M6494, Invitrogen) a las diferentes condiciones de tratamiento, la mezcla se incubó a 37°C por 4 h aproximadamente. Luego, se retiró la solución de medio más MTT quedando el formazán en el fondo. El formazán se disolvió en una solución de 100 μL de isopropanol (MilliporeSigma) más SDS (Merck Millipore)

al 3% y se cuantificó la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas. Complementario a este ensayo, se utilizó el kit LDH CyQUANT™ (C20300, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante, el cual determina la citotoxicidad de las células. De este modo, se obtuvo la viabilidad celular y citotoxicidad inducida por las diferentes concentraciones de rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y.

Extracción de proteínas y Dot Blot

Para complementar este modelo, se analizó el reconocimiento de la proteína rhtau-40 por un anticuerpo monoclonal que reconoce sitios de fosforilación en tau. Se utilizó el anticuerpo monoclonal phospho-tau181 (MN1050, ThermoFisher), el cual reconoce específicamente el sitio fosforilado Treonina181 en tau. Como primera etapa, se realizó una extracción de proteínas totales de células SH-SY5Y. Para esto las células se trataron durante 24 h con 14 µg/mL (concentración que genera un mayor daño en células) de rhtau-40 y otras se mantuvieron sin tratamientos como condición control. Transcurridas este tiempo, las células se lavaron con PBS 1x frío durante 5 min y luego se les añadió una solución de buffer RIPA 10x (5 mM Tris-HCl pH 7,5; 1,5 mM NaCl, NP-40 10%, deoxicolato de sodio 10%, 20 mM EDTA, 500 mM NaF y SDS 1%) junto con inhibidor de proteasas 10 x (Roche), PMSF 100 mM (Thermo Scientific) y agua destilada filtrada. Posteriormente se utilizaron scrappers para la recogida mecánica de las células adheridas. Una vez recolectadas las muestras en tubos de ensayo, estas se dejaron en hielo durante 10 min para luego ser centrifugadas a 14.000g por 20 min. Una vez terminada la centrifugación de las muestras, se recolectó el sobrenadante en tubos de ensayo y se guardaron a -20°C hasta su cuantificación y uso en ensayos de Dot Blot.

Se realizó un ensayo de Dot Blot para determinar el reconocimiento del anticuerpo ptau181 en células tratadas con rhtau-40 (14 µg/mL), células sin tratamientos, y en la proteína rhtau-40 purificada (libre de células). Para esto, se sensibilizaron tres membranas de nitrocelulosa con un buffer de transferencia por 30 min. Luego, cada membrana se incubó con 4 µg de extracto de proteínas totales tratadas 14 µg/mL de rhtau-40 (14 µg/mL), 4 µg de extracto de proteínas totales de células control sin tratamiento y 1 µg de proteína rhtau-40 purificada (libre de células), respectivamente. Posteriormente, las membranas se bloquearon con una solución de TBS 1X-BSA 5% por 1 h a temperatura ambiente en agitación. Después, se incubó el anticuerpo primario ptau181-mouse (1:750) durante 2 h en agitación a 37°C. Luego, se lavaron las membranas con TBST-20 0,1% y se incubaron con el anticuerpo secundario HRP anti-mouse (1:7.000) por 1 h a temperatura ambiente en constante agitación. Finalmente se lavaron con TBS Tween-20 0,1% y se revelaron con el kit SuperSignal™ West Femto (34095, Thermo Scientific) según instrucciones del fabricante.

2.5 Evaluación del efecto de la combinación Q más HT en la viabilidad celular de SH-SY5Y

Para determinar la viabilidad celular de los compuestos Q y HT en SH-SY5Y, se cultivaron 40.000 células en placas de 96 pocillos. Estas se mantuvieron con una solución de 200 µL MEM/F12, FBS 10% y Antibiótico al 1%.

En estos ensayos fueron probadas las combinaciones de Q (1 µM y/o 10 µM) y HT (1 nM hasta 300 µM). Este diseño experimental también incluyó los compuestos por sí

solos en las células, controles con los vehículos de cada uno (PBS 1x y H₂O milliQ), SDS 10% como control de muerte celular y células sin tratar. Se definieron 3 réplicas por cada ensayo independiente. El tratamiento se dejó en incubación durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂. Después del período de incubación, se evaluó la viabilidad celular de SH-SY5Y en presencia de los compuestos utilizando el método colorimétrico MTT descrito anteriormente. Mediante un lector de microplacas Infinite M Nano (TECAN) se cuantificó la absorbancia a 550 nm. Los resultados se normalizaron con respecto a un 100% de viabilidad en células sin tratamientos.

2.6 Evaluación del efecto neuroprotector de la combinación Q más HT en el modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40

Viabilidad celular y citotoxicidad en células SH-SY5Y

Para evaluar el efecto neuroprotector de las diferentes combinaciones de Q y HT sobre el daño inducido por rhtau-40 (14 µg/mL) en células SH-SY5Y, los compuestos se co-aplicaron en presencia de rhtau-40 (14 µg/mL). Este diseño experimental también incluyó como controles: las distintas combinaciones de los compuestos Q más HT en ausencia de rhtau-40, SDS 10% como control de muerte celular y células sin tratar. Se realizaron entre 4 a 5 ensayos independientes con 3 réplicas intraensayo.

Luego de 24 h de incubación de las combinaciones (Q más HT) en co-aplicación con rhtau-40, se determinó la viabilidad celular mediante el método de MTT descrito anteriormente. Cabe destacar que el efecto de la combinación en células SH-SY5Y dañadas con rhtau-40 también se evaluó con el kit LDH siguiendo las instrucciones del

fabricante. Este método se utilizó tan solo para la combinación de Q (1 μM) más HT (1 μM).

Inmunofluorescencia y microscopia confocal

Para profundizar en el efecto neuroprotector de la combinación de Q más HT en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 fosforilada, se evaluó la señal del anticuerpo monoclonal phospho-tau181 mediante inmunofluorescencia.

Como primera etapa, se trataron las células SH-SY5Y específicamente con la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) en presencia de rhtau-40 (14 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 h en duplicado. En este ensayo se incluyeron además los siguientes controles: células sin tratamiento, células tratadas solo con rhtau-40 y células tratadas solo con la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) en ausencia de rhtau-40. Transcurridas las 24 h de incubación, las células se lavaron con PBS 1x y se fijaron con una solución de PFA 4% + sacarosa 4% en PBS 1x durante 30 min a 37°C. Después, se lavaron tres veces con PBS 1x por 5 min a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón 0,1%-PBS 1x durante 5 min. Las células se bloquearon con una solución de BSA 5%-PBS 1x a temperatura ambiente durante 1 h, y luego se incubó con el anticuerpo ptau181 (1:100) en una solución de BSA 1%-PBS 1x durante toda la noche a 4°C.

Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las células con PBS 1x por 5 min y se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluóor 488 goat anti-mouse (1:600) (A11001, Invitrogen) en una solución de BSA 1%-PBS 1x durante 45 min. Las células se lavaron nuevamente con PBS 1x durante 5 min y se incubaron con DAPI 3 μM (ThermoFisher) durante 15 min para identificar el núcleo. Se realizaron los últimos tres lavados con PBS

1x por 5 min y se montaron los covers en portaobjetos con Fluorsave (MilliporeSigma). Las muestras fijadas se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron protegidas de la luz durante 20 min hasta que el Fluorsave se solidificara. Finalmente, las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis por microscopía confocal.

Las imágenes de inmunofluorescencia fueron capturadas con el software ZEN incorporado en el microscopio confocal de barrido láser 710 Carl-Zeiss.

2.7 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos presentados en este Seminario de Título fueron realizados con el programa GraphPad Prism 8 aplicando la prueba t-student. En las gráficas se representa cada valor como promedio entre ensayos independientes con un tamaño muestral entre 3 a 5 \pm la desviación estándar. Aquellos valores con un $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

En cuanto al análisis de imágenes de inmunofluorescencia se utilizó el programa ImageJ.

3. RESULTADOS

3.1 Las combinaciones de Q más HT inhiben en su mayoría la agregación de rhtau-40 en un modelo *in vitro* libre de células

Para determinar el efecto de las diferentes combinaciones de Q más HT en la agregación de rhtau-40, se co-aplicaron los compuestos en presencia de rhtau-40 agregada por el inductor heparina durante 20 h. La agregación de rhtau-40 junto con los compuestos fue monitoreada por la fluorescencia de ThS, la cual corresponde a una sonda fluorescente que se une a las estructuras de sábana β en la proteína tau agregada. En este estudio, el 100% de agregación se determinó respecto a la fluorescencia neta entregada por la proteína rhtau-40 más el inductor heparina. En relación con lo anterior, los compuestos en presencia de la proteína agregada se evaluaron con respecto a este 100% de agregación.

Previo a la evaluación de las combinaciones, se determinó el efecto individual de los compuestos Q y HT sobre la agregación de rhtau-40. A diferencia de HT, Q inhibe la agregación de tau de manera concentración-dependiente, es decir, que a medida que aumenta la concentración de Q, mayor es el porcentaje de inhibición de agregación de rhtau-40 (Fig. 7A). En cuanto a las combinaciones, se evidenció que aquellas que contienen bajas concentraciones de HT (1 nM hasta 1 μ M) inhiben entre 12,9% hasta un 31,6% la agregación de rhtau-40 (Fig. 7B-C), mientras que las combinaciones con concentraciones mayores de HT (10, 100 y 300 μ M) incrementan la agregación por sobre el 100%.

Al comparar las diferentes curvas de las combinaciones (Fig. 7B-C) se observa que las combinaciones de Q (10 μ M) más HT (1 nM - 300 μ M) presentan un mayor porcentaje de inhibición respecto a Q (1 μ M) más HT (1 nM - 300 μ M).

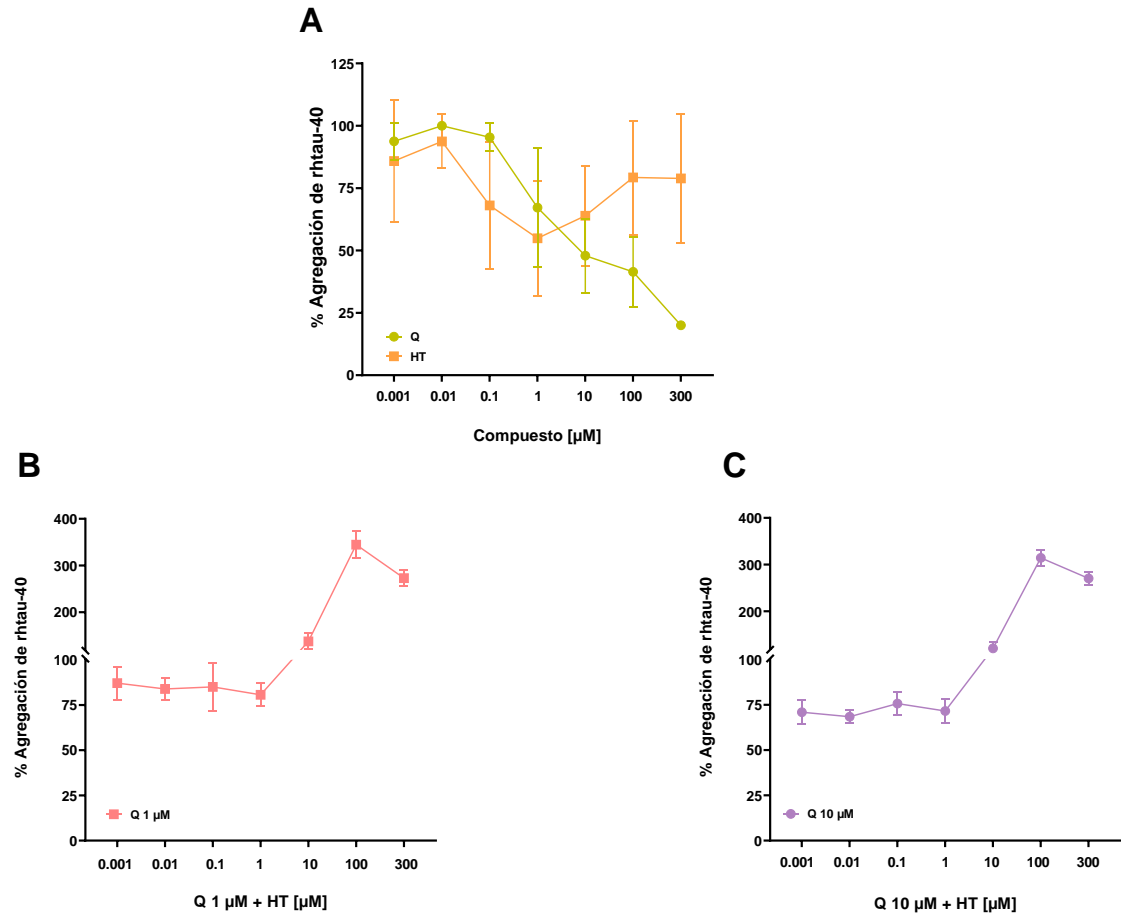


Figura 7. Determinación del efecto de Q y HT en la agregación de rhtau-40 *in vitro* libre de células. (A) Curva concentración respuesta del efecto antiagregante inducido de forma individual por los compuestos Q y HT (n=3). **(B)** Curva concentración respuesta del efecto antiagregante inducido por las diferentes combinaciones de Q (1 μ M) más HT (1 nM - 300 μ M) (n=3). **(C)** Curva concentración respuesta del efecto

antiagregante inducido por las diferentes combinaciones de Q (10 μ M) más HT (1 nM - 300 μ M) (n=3). Cada punto en la gráfica representa el valor promedio \pm la desviación estándar.

3.2 Establecimiento de un nuevo modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y

Agregación de rhtau-40 de manera concentración-dependiente en un modelo in vitro libre de células

De acuerdo con los antecedentes de nuestro laboratorio en el que se identificó que la proteína rhtau-40 se encuentra fosforilada, se comparó la fluorescencia de diferentes concentraciones de rhtau-40 respecto a esta proteína agregada por el inductor heparina. Para ensayo, se utilizó nuevamente la sonda ThS que se une a las estructuras de sábana β en la proteína tau agregada, por lo que mientras mayor fluorescencia (UA) se presente, mayor será el nivel de agregación de rhtau-40. En este ensayo se observó el incremento en la fluorescencia neta de ThS de manera concentración-dependiente. Al comparar estos resultados con rhtau-40 más heparina, se observó una mayor fluorescencia neta respecto a rhtau-40 sin heparina. Si bien este aumento es al menos 2 veces mayor (Fig. 8), complementa la idea de que los sitios de fosforilación de rhtau-40 podrían provocar su agregación.

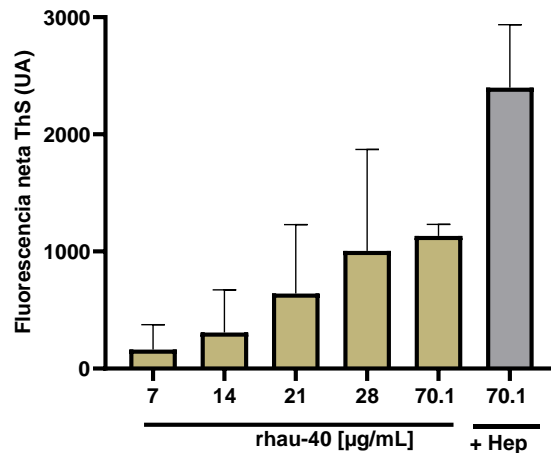


Figura 8. Evaluación de la fluorescencia neta de ThS a diferentes concentraciones de rhtau-40 en un ensayo *in vitro* libre de células. La proteína rhtau-40 en ausencia del inductor de agregación heparina incrementa la fluorescencia neta de ThS de manera concentración-dependiente. rhtau-40 7 a 28 µg/mL (n=5), rhtau-40 70,1 µg/mL en ausencia y presencia de heparina (n=2).

El tratamiento con rhtau-40 fosforilada en células SH-SH5Y induce daño celular

Posterior a la determinación del incremento de la fluorescencia de rhtau-40 de manera concentración-dependiente, se evaluó el efecto de estas mismas concentraciones (0, 7, 14, 21 y 28 µg/mL) en la viabilidad de las células SH-SY5Y. Las células se trataron durante 24 con las diferentes concentraciones de rhtau-40. Transcurrido este tiempo, se añadió una solución de MTT. Este corresponde a un tetrazol de color amarillo que al reducirse se convierte en su producto insoluble formazán de color púrpura. La reducción del MTT está dada por enzimas que se encuentran tan solo en células viables, por ende, este ensayo entrega de manera indirecta la viabilidad de las células tras el tratamiento. Se demostró que las diferentes concentraciones de rhtau-40

disminuyen significativamente la viabilidad en células SH-SY5Y. Sin embargo, 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rhtau-40 es la concentración que induce la mayor disminución en la viabilidad de las células SH-SY5Y (73,6%, Fig. 9A). Complementario a los ensayos de viabilidad celular por MTT, se evaluó el porcentaje de citotoxicidad de estas mismas concentraciones en ensayos de LDH durante 24 h. Este ensayo utiliza la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador citotóxico, encima liberada al medio extracelular cuando las células se encuentran dañadas o muertas por factores internos o externos. En este ensayo, al igual que en MTT, se demostró que 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rhtau-40 induce un efecto citotóxico significativo en las células SH-SY5Y (10,8%, Fig. 9B). De acuerdo con estos resultados, se estableció como modelo de daño celular el tratamiento con 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de rhtau-40 (en ausencia de un inductor) en células SH-SY5Y.

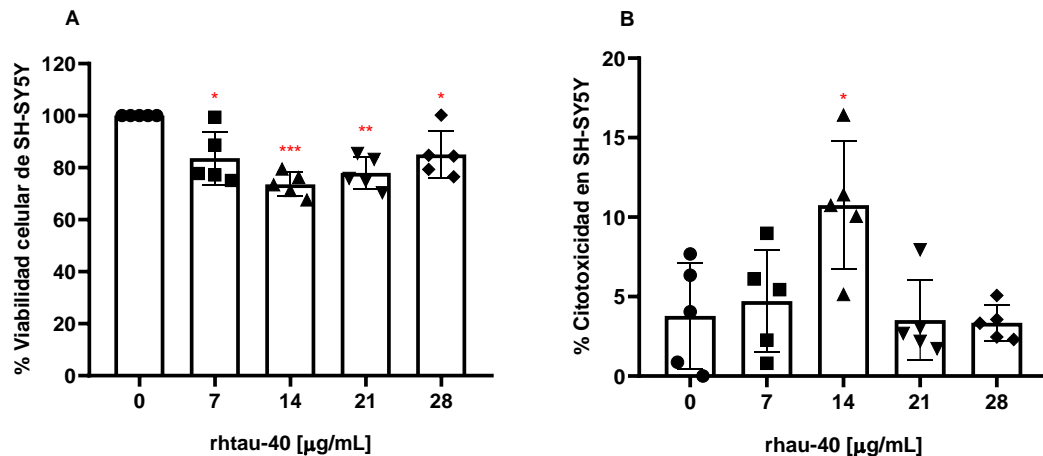


Figura 9. Evaluación del efecto de rhtau-40 en la viabilidad celular de SH-SY5Y.

(A) Ensayos de viabilidad celular por MTT en células SH-SY5Y luego del tratamiento con diferentes concentraciones de rhtau-40 (n=5). **(B)** Ensayos de citotoxicidad por LDH de las diferentes concentraciones de rhtau-40 en células SH-SY5Y (n=5). Las barras

representan el valor promedio \pm la desviación estándar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

El anticuerpo ptau181 reconoce la proteína rhtau-40 fosforilada

De acuerdo con los antecedentes sobre los sitios de fosforilación en rhtau-40, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-ptau181 para determinar el reconocimiento de la proteína rhtau-40 fosforilada tanto en muestras solo con la proteína purificada como en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40. Este anticuerpo es ampliamente utilizado para el reconocimiento de la proteína tau fosforilada en muestras biológicas. Para esto se realizó un ensayo de dot blot el cual demostró que el anticuerpo monoclonal ptau181 reconoce la proteína rhtau-40 fosforilada tanto en muestras solo con la proteína purificada (libre de células) como en células SH-SY5Y tratadas con de rhtau-40 (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como se muestra en la Fig. 10. Es importante señalar que muestras de células control (sin tratamiento) no fueron reconocidas por este anticuerpo.

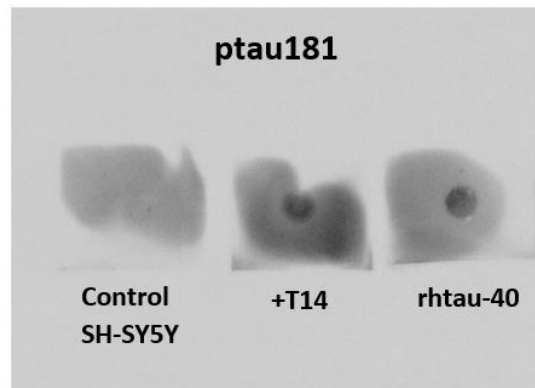


Figura 10. Reconocimiento de la proteína rhtau-40 fosforilada por el anticuerpo ptau181. Dot blot del reconocimiento de la proteína rhtau-40 fosforilada por el anticuerpo ptau181. Control SH-SY5Y: proteínas totales de células sin tratamientos; +T14:

proteínas totales de células tratadas con rhtau-40 (14 µg/mL) durante 24 h; rhtau-40: proteína rhtau-40 purificada.

3.3 Efecto neuroprotector de la combinación de Q más HT en células SH-SY5Y tratadas con la proteína rhtau-40

Las combinaciones de Q más HT no afectan la viabilidad de las células SH-SY5Y

Primero se realizaron ensayos de reducción de MTT para evaluar la viabilidad de las células tratadas solo con las combinaciones de Q más HT. Las combinaciones de los compuestos Q más HT demuestran ser seguras para la línea celular de neuroblastoma (89-100% de viabilidad), a excepción de las combinaciones con concentraciones más altas de HT (10 y 300 µM) que muestran una disminución significativa de la viabilidad (Fig. 11A-B, $p < 0,05$). Es importante señalar que la combinación con HT 100 µM provoca al menos un 20% de disminución de la viabilidad, pero no es estadísticamente significativo.

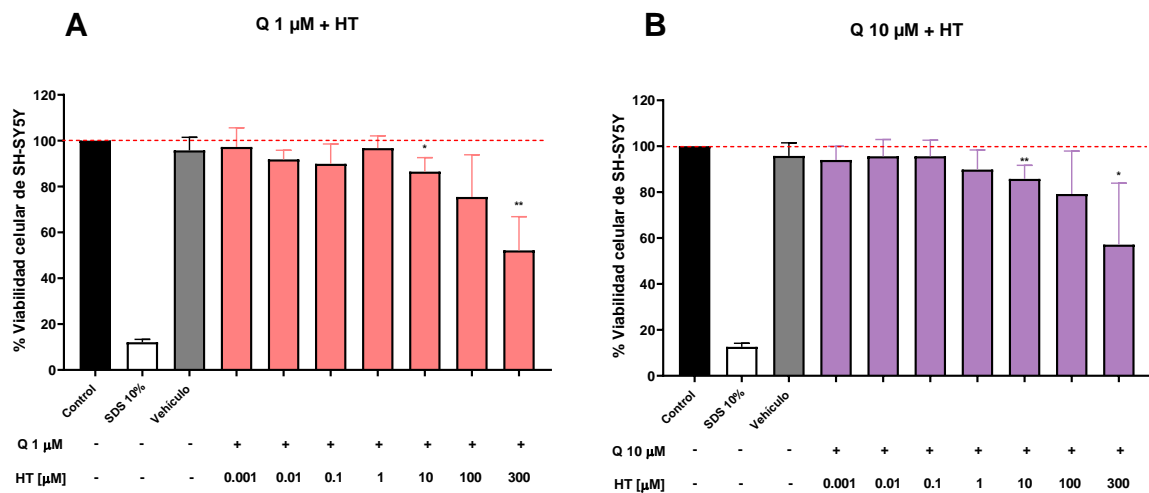


Figura 11. Determinación de la viabilidad celular en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y tratadas solo con Q más HT. (A) Viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con las diferentes combinaciones de HT con Q (1 μ M) (n=4). **(B)** Viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con las diferentes combinaciones de HT con Q (10 μ M) (n=5), excepto la combinación con HT 10 μ M y el vehículo (n=4). Las barras representan el valor promedio \pm la desviación estándar. El vehículo corresponde a la combinación de los solventes de Q y HT respectivamente. *p<0,05 y **p<0,01.

Las combinaciones de Q más HT revierten el daño celular inducido por rhtau-40 en células SH-SY5Y

Se determinó el efecto de las diferentes combinaciones de Q más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 fosforilada (14 μ g/mL) mediante ensayos de MTT, de acuerdo con el modelo de daño establecido previamente. Se demostró que las combinaciones de los compuestos Q más HT revierten en un 2,7%-14,5% el daño celular inducido por la proteína rhtau-40, a excepción de aquellas combinaciones con altas concentraciones de HT (>100 μ M) (Fig. 12A-B). Específicamente, las combinaciones que revierten el daño de manera estadísticamente significativa son: Q (1 μ M) más HT (1 μ M) (10,8%, p<0,05) y Q (1 μ M) más HT (1 nM) (11 %, p<0,05). Si bien existe una reversión del daño inducido por la proteína rhtau-40 cuando los compuestos Q y HT son co-aplicados, esta viabilidad celular es menor que la viabilidad de las células tratadas solo con los compuestos combinados en ausencia de rhtau-40 (Fig. 12C-D).

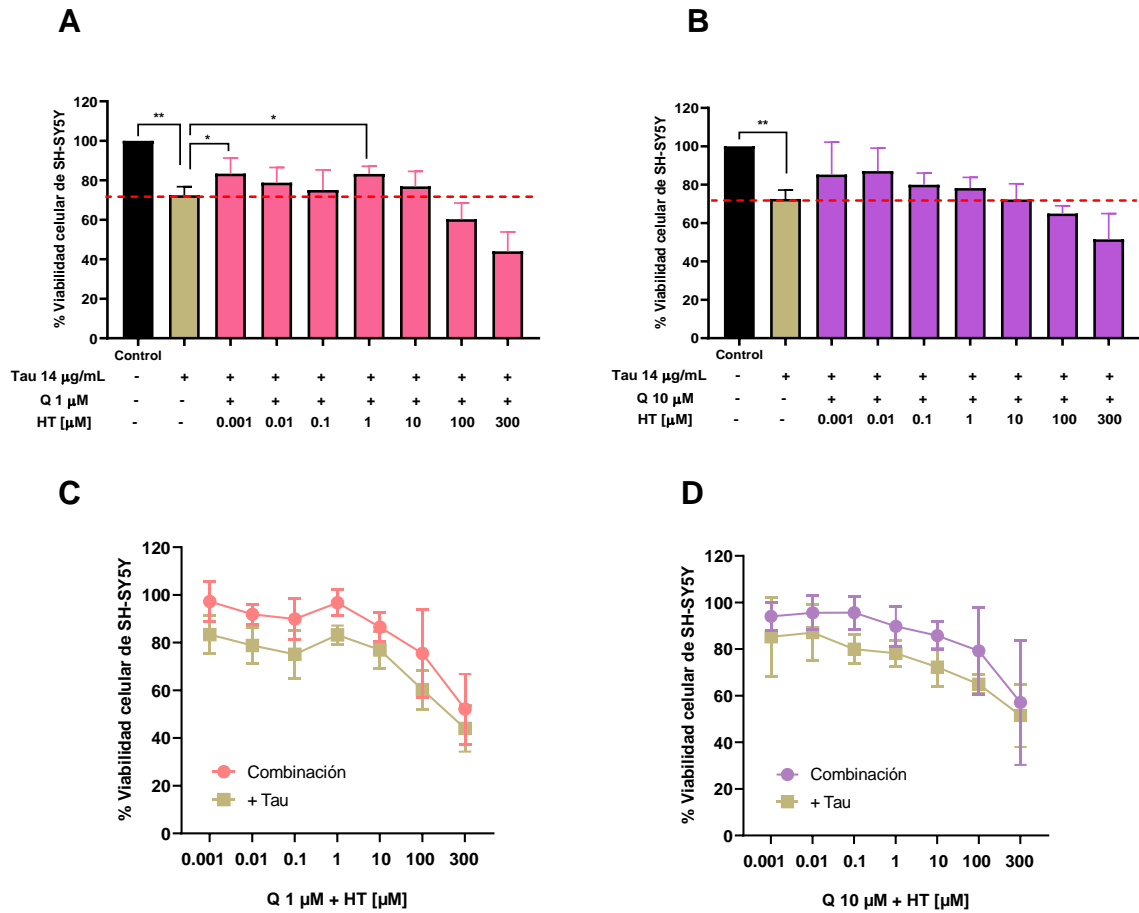


Figura 12. Evaluación del efecto de las distintas combinaciones de Q más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con la proteína rhtau-40 fosforilada. (A) Efecto de las diferentes combinaciones de Q (1 μM) más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 (14 μg/mL) (n=5). **(B)** Efecto de las diferentes combinaciones de Q (10 μM) más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 (14 μg/mL) (n=5). **(C)** Curva concentración-respuesta del efecto que ejercen las combinaciones de Q (1 μM) más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 en comparación al efecto de las combinaciones de Q (1 μM) más HT en ausencia de rhtau-40 (n=4). **(D)** Curva concentración-respuesta del efecto que

ejercen las combinaciones de Q (10 μ M) más HT en la viabilidad de las células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 en comparación al efecto de las combinaciones de Q (1 μ M) más HT en ausencia de rhtau-40 (n=5). Las barras y puntos representan el valor promedio de cada ensayo \pm la desviación estándar. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

De acuerdo con los resultados de MTT, Q (1 μ M) más HT (1 μ M) demostró ser aquella combinación que además de ser segura para las células SH-SY5Y (96,8%), revierte significativamente el daño inducido por rhtau-40 en un 10,8% ($p < 0,05$, Fig. 13A). Esta misma combinación se evaluó en ensayos de citotoxicidad por LDH, demostrando un 2,7% de citotoxicidad en células SH-SY5Y comprobando aún más que no afecta su viabilidad. Además, la combinación disminuye el efecto citotóxico inducido por la proteína rhtau-40 en un 7,8% ($p < 0,05$, Fig. 13B). De este modo, la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) se presenta como el mejor candidato neuroprotector en células SH-SY5Y.

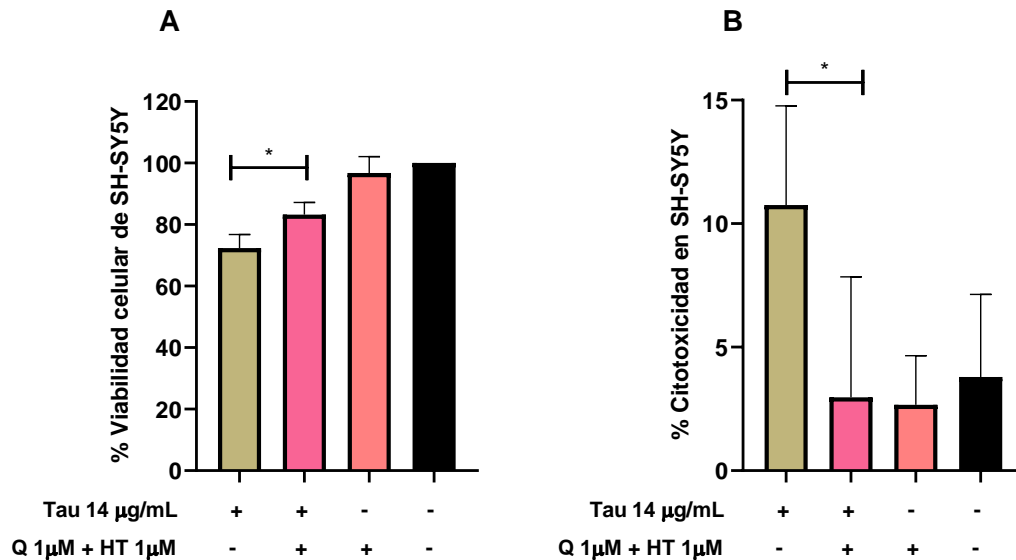


Figura 13. Evaluación del efecto de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en el daño celular inducido por rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y. (A) Efecto de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en la viabilidad celular de SH-SY5Y tratadas con 14 μ g/mL de rhtau-40 (n=5). (B) Determinación de la citotoxicidad de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en células SH-SY5Y tratadas con 14 μ g/mL de rhtau-40 (n=4). Las barras representan el valor promedio \pm la desviación estándar. *p<0,05.

La combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) disminuye la señal del anticuerpo ptau181 que reconoce rhtau-40 fosforilada en células SH-SY5Y tratadas con la proteína

Mediante inmunofluorescencia se profundizó en el efecto neuroprotector de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M). Para esto se comparó la señal del anticuerpo ptau181 (que reconoce la proteína rhtau-40 fosforilada) en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 en presencia o ausencia de la combinación. Las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopia confocal muestran una disminución en la señal de fluorescencia del anticuerpo ptau181 cuando las células fueron tratadas con rhtau-40 más la combinación (Fig. 14B-D). Respecto a las células tratadas solo con la combinación no se observó señal de fluorescencia de ptau181 al igual que en la condición control de células sin tratamientos (Fig. 14A-C). Estos resultados se complementan con el efecto neuroprotector obtenido en los ensayos de MTT y LDH (Fig. 13).

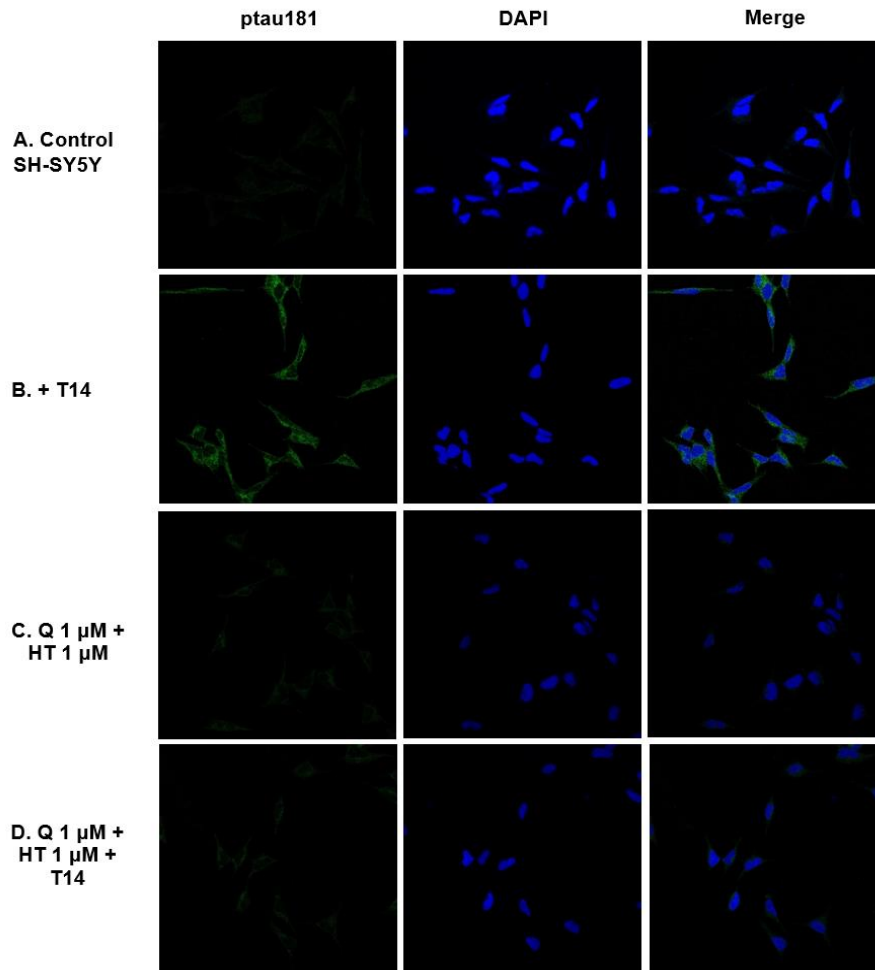


Figura 14. Imágenes representativas de ensayos de inmunofluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 en presencia o ausencia de Q (1 μM) más HT (1 μM). **(A)** Imágenes de inmunofluorescencia de células SH-SY5Y control sin tratamientos. **(B)** Imágenes de inmunofluorescencia de células SH-SY5Y tratadas solo con rhtau-40 (14 μg/mL) durante 24 h. **(C)** Imágenes de inmunofluorescencia de células SH-SY5Y tratadas solo con la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) durante 24 h. **(D)** Imágenes de inmunofluorescencia de células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 (14 μg/mL) en presencia de la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) durante 24 h. En todas las imágenes las células fueron incubadas con el anticuerpo primario ptau181 (1:100)

que reconoce el sitio de fosforilación Thr181 en rhtau-40, el anticuerpo secundario Alexa Flúor 488 (1:600) y DAPI (3 μ M) que reconoce el núcleo de las células. El objetivo utilizado es de 63x en un zoom de 0.6.

Interesantemente, se observó que el número de células SH-SY5Y por área incrementaría respecto al control luego del tratamiento con Q (1 μ M) más HT (1 μ M) (19,8 \pm 2,7 vs 16,5 \pm 2,4, Fig. 15). Además, esta combinación incrementaría levemente el número de células viables en el modelo de daño celular inducido por rhtau-40 (15,4 \pm 2 vs 13,8 \pm 1,8, Fig. 15).

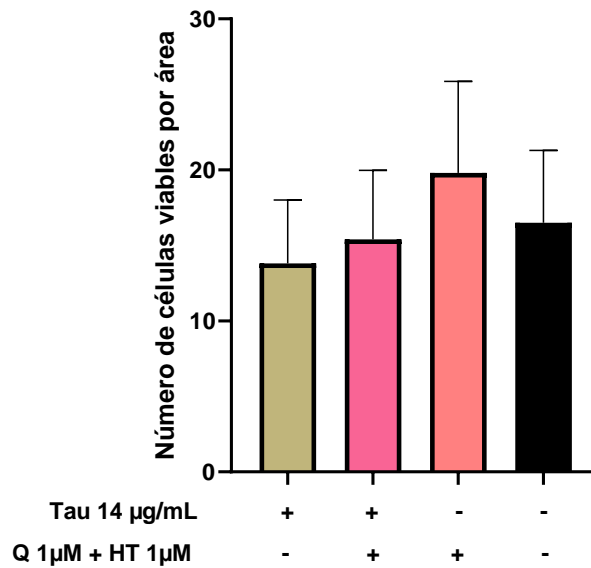


Figura 15. Cuantificación del número de células viables luego del tratamiento con rhtau-40 en presencia o ausencia de Q (1 μ M) más HT (1 μ M). El número de células se estableció según el marcaje de los núcleos con DAPI por área (n=5). Los n corresponden a imágenes tomadas en un ensayo único. Las barras representan el valor promedio \pm desviación estándar.

4. DISCUSIÓN

La proteína tau es una proteína intracelular que se encuentra principalmente en los axones de las neuronas y juega un papel importante en la estabilización de los microtúbulos. Se ha demostrado que la agregación anormal de tau es un evento clave en la patología de enfermedades neurodegenerativas como la EA debido a una desregulación de quinasas (Cdk5/Gsk3 β) y fosfatasas (PP1A/PP2A). En el contexto de la prevención de la EA, las terapias actuales buscan potenciar los beneficios multienfoque de los compuestos bioactivos encontrados en la dieta para su uso como nutracéuticos como son la Q y HT.

En este seminario de título se demuestra que las diferentes combinaciones de Q más HT inhiben la agregación de rhtau-40 entre un 12,9% y 31,6% en un modelo *in vitro* libre de células. Cabe destacar que esto solo se evidencia en las combinaciones de Q con concentraciones bajas de HT (1 nM hasta 1 μ M). A diferencia de lo anterior, altas concentraciones de los compuestos por si solos (> 10 μ M) alcanzan un 80% (Q) y un 45,1% (HT) de inhibición de la agregación de rhtau-40 respectivamente. Estos resultados son compatibles con lo reportado por Daccache y colaboradores en 2011, quienes demostraron mediante ensayos *in vitro* libre de células, que HT (10 μ M) inhibe la agregación de tau en un 51%. En este mismo contexto, el oleocantal, un compuesto orgánico derivado del aceite de oliva estructuralmente similar a la oleuropeína (precursor de HT), ha demostrado inhibir la agregación de tau actuando directamente en el sitio K311 de esta proteína. Esta modificación provoca que se interrumpan las interacciones tau-tau responsables de la formación de las estructuras tipo β en la agregación de tau

(Li y col., 2009). En el caso del HT, este podría estar ejerciendo una acción similar al oleocantal actuando directamente en sitios de la proteína rhtau-40 para su protección ante las hiperfosforilaciones y agregación. Si nos centramos en las combinaciones de estos compuestos como nutracéuticos, el porcentaje de inhibición es menor que los compuestos por si solos. Lo anterior sugiere que en ensayos de ThS, los compuestos Q y HT ejercen un efecto competitivo y no sinérgico como se esperaba. Esto debido a que ambos compuestos estarían actuando en los mismos residuos de tau para protegerla de su agregación. Un resultado importante de este estudio tiene relación con el uso de altas concentraciones de HT en combinación con Q, que provocaron sobre el 100% la agregación de rhtau-40.

Diversos modelos de daño neuronal *in vitro* se han propuesto para entender lo que ocurre en la EA. Incluso se ha evaluado cómo los compuestos bioactivos de la dieta (ciertos polifenoles) actúan en la reversión del daño celular ocasionado por oligómeros de tau (Sun y col., 2021). En este seminario de título, se estableció un nuevo modelo de daño celular basado en los sitios de fosforilación identificados en la proteína tau recombinante humana (rhtau-40) expresada y purificada en nuestro laboratorio. Lo anterior se sustenta con ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40, en que se demostró que 14 µg/mL es la concentración que provoca un daño significativo en las células. La viabilidad celular se midió por el ensayo de MTT, el cual mide la actividad mitocondrial de las células basado en la reducción de MTT a su producto insoluble formazán por células viables. El MTT no penetra en las células muertas o dañadas, por lo que este ensayo se utiliza comúnmente como un indicador indirecto de la viabilidad celular. Por otra parte, la citotoxicidad de rhtau-40 se midió por ensayos LDH, el cual se basa en la liberación de la enzima LDH al medio

extracelular cuando la membrana celular está dañada. Cuanto mayor sea la cantidad de LDH en el medio, mayor será la cantidad de células muertas o dañadas. A diferencia del ensayo MTT, el ensayo LDH puede detectar células dañadas por agentes externos o internos, incluso cuando las células todavía no han liberado todo su contenido celular en el medio extracelular (Fotakis & Timbrell, 2006). Estos métodos tienen en común la detección del daño celular provocado por un agente externo. En este caso, ambos métodos demostraron un significativo daño celular inducido por rhtau-40 (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Además, se evidenció la agregación de la proteína rhtau-40 en ausencia de inductor en ensayos *in vitro* libre de células con ThS.

Un resultado importante de este estudio es el reconocimiento de la proteína rhtau-40 por el anticuerpo monoclonal ptau181. Posiblemente este anticuerpo estaría reconociendo el sitio Thr181 que se encuentra fosforilado en rhtau-40. En relación con lo anterior, se deduce que rhtau-40 podría sufrir hiperfosforilaciones anómalas que conllevarían a la formación de agregados de tau. Estos agregados podrían ejercer un efecto priónico propagándose en células vecinas y provocando la degeneración celular (Kfoury y col., 2012; Goedert y col., 2017; Ayers y col., 2018).

Previo a la evaluación del efecto neuroprotector de las combinaciones Q más HT en el modelo de daño celular inducido por rhtau-40, se analizó el efecto de las combinaciones en la viabilidad celular de las células SH-SY5Y. Notamos que la viabilidad de las células no fue mayormente afectada cuando las concentraciones de HT eran bajas ($>10 \mu\text{M}$). Sin embargo, las combinaciones de Q con altas concentraciones de HT en el rango entre $10 \mu\text{M}$ y $300 \mu\text{M}$ demostraron ser citotóxicas para las células. Estudios previos han evaluado los efectos de la Q y HT por sí solos en la viabilidad celular de la línea de

neuroblastoma, SH-SY5Y. Shi y colaboradores (2009), demostraron que la viabilidad de las células SH-SY5Y no era afectada tras la administración de Q (5 hasta 20 μM) durante 24 h, sugiriendo que este compuesto es seguro para su uso en estudios *in vitro*. En cuanto al HT, un estudio de Yu y colaboradores el 2016, mostró que concentraciones de hasta 100 μM de HT no afectaban la viabilidad de las células SH-SY5Y, no obstante concentraciones de 150-250 μM de HT eran citotóxicas, por lo cual se debe tener precaución al utilizar estas concentraciones en posibles terapias para el Alzheimer. Estos datos son consistentes con nuestros resultados de viabilidad celular por MTT. Una observación derivada de estos ensayos mostró que concentraciones altas de HT (100 y 300 μM) inducen rápidamente la formación de cristales de formazán, lo cual se podría relacionar con la sobreestimulación de la función y/o biogénesis mitocondrial (Visioli y col., 2020). Cabe señalar que esta característica no se observó con concentraciones altas de Q.

La Q y el HT son dos compuestos bioactivos con una alta actividad antioxidante que han demostrado tener un efecto neuroprotector en líneas celulares. En un estudio se demostró que la aplicación de 50 μM de HT en la línea celular de neuroblastoma de ratón (N2a) disminuye la muerte celular provocada por agregados de $\text{A}\beta$ y además disminuye la expresión de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, lo que catalogaría a este compuesto como agente neuroprotector contra a los agregados de $\text{A}\beta$ (St-Laurent-Thibault y col., 2011). La Q por su parte, ha sido estudiada en la línea celular de neuronas hipocámpales de ratón (HT22) inhibiendo la hiperfosforilación de la proteína tau posiblemente por un mecanismo que involucraría la inhibición de la actividad de Cdk5 y un bloqueo de la vía de señalización Ca^{+2} -calpaína-p25-Cdk5 (Shen y col., 2018). El efecto neuroprotector de la Q también fue estudiado en la línea celular SH-SY5Y, en donde un tratamiento

con 10 μM de este compuesto, mostraron una atenuación en la fosforilación en tau mediante la activación de la vía AMPK (Chen y col., 2016). Cabe enfatizar que, si bien diferentes autores han demostrado efectos neuroprotectores de Q y HT en estudios independientes, un gran aporte de este trabajo ha sido el haber demostrado el efecto neuroprotector de la combinación de ambos compuestos (Q y HT) sobre un modelo de daño celular inducido por rhtau-40, lo que abre una importante vía hacia el desarrollo de posibles terapias multitarget basadas en el uso de nutraceuticos.

Al evaluar el efecto neuroprotector de las diferentes combinaciones de Q más HT en SH-SY5Y tratadas con rhtau-40, se observó que las combinaciones Q (1 μM) más HT (1 μM) y Q (1 μM) más HT (10 nM) fueron la más efectivas en revertir el daño celular inducido por rhtau-40 (10,8% y 11% respectivamente) mediante el método de MTT. Sin embargo, se escogió la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) para estudios posteriores debido a la mayor capacidad antioxidante frente a Q (1 μM) más HT (10 nM) evaluada mediante la captación de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), reportando una actividad de 15,9% vs 11,6% respectivamente (Anexo Fig. suplementaria 1). Además, se observó una mayor inhibición de la agregación de rhtau-40 en un modelo *in vitro* libre de células con la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) en comparación a Q (1 μM) más HT (10 nM) (19,3% vs 16,1% respectivamente). Cabe destacar que el efecto neuroprotector de la combinación de Q (1 μM) más HT (1 μM) en células SH-SY5Y se complementó mediante ensayos de citotoxicidad por LDH, mostrando un 7,8% de reversión del daño celular inducido por rhtau-40. En este contexto, tanto el método de MTT como el de LDH demuestran el efecto neuroprotector de la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) al aumentar la viabilidad celular y disminuir la citotoxicidad cuando las células SH-SY5Y fueron tratadas con rhtau-40 (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Profundizando en el efecto neuroprotector de la combinación Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en las células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40, se demostró, mediante imágenes de inmunofluorescencia, tanto una disminución de la señal de fluorescencia de ptau181 como un incremento en el número de células respecto a las células dañadas con la proteína rhtau-40 fosforilada. Lo anterior sustenta el hecho de que la combinación contribuiría a que las células no se degeneren producto del daño inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada. Comprobando de este modo que los compuestos bioactivos combinados Q y HT se pueden utilizar como un potencial nutracéutico para la prevención de la EA, siempre teniendo en consideración la concentración efectiva que demuestran sus efectos neuroprotectores. En futuros estudios se podría evaluar esta combinación en modelos animales y/o experimentales de la EA y así proponer una fórmula nutracéutica comercial que apunte al tratamiento de pacientes con Alzheimer y a pacientes cognitivos sanos que buscan prevenir la enfermedad.

En cuanto al mecanismo de acción neuroprotector de la Q y el HT en combinación, son necesarias más pruebas y estudios experimentales para dilucidar su acción. De todos modos, en este trabajo se propone un posible mecanismo de acción de estos compuestos combinados como se muestra en la Fig. 16. La combinación de Q y HT podría actuar directamente en los residuos fosforilados de tau, protegiéndolos de su hiperfosforilaciones mediante modificaciones e impedimentos estéricos, tal como se ha descrito con otros polifenoles (Li y col., 2009). También podrían modular la acción de quinasas (Cdk5 y Gsk-3 β) y fosfatasas (PP1/PP2), lo que conllevaría a una desagregación de tau y, por ende, a una reversión del daño. Lo anterior se condice con estudios que muestran que Q desagrega la proteína tau al inactivar la quinasa Cdk5

(Shen y col., 2018), o como en el caso del resveratrol, un polifenol que actúa sobre la activación de PP2 e inhibe la acción de Gsk-3 β (Schweiger y col., 2017; Shati y col., 2019). Este mismo polifenol ha sido estudiado como inhibidor de la actividad de Cdk5 a través de la regulación de la expresión de p35 (Utreras y col, 2011), por lo que sería interesante investigar si el polifenol HT podrían actuar bajo estas mismas dianas moleculares. La estabilización del daño oxidativo provocado por tau en la neurona es otra vía por la cual los compuestos podrían estar ejerciendo su mecanismo neuroprotector dada su potente actividad antioxidante. Se ha demostrado que la Q y HT por sí solos tienen efectos contra el daño oxidativo tras modular vías comunes como Nfr2-ARE (Vasconcelos y col., 2019; Zou y col., 2012) y JNK (Costa y col., 2016; Zou y col., 2012). Por lo tanto, sería interesante evaluar la acción antioxidante de estos compuestos combinados en el modelo de estudio propuesto mediante el uso de sondas que se activan ante la liberación de ROS.

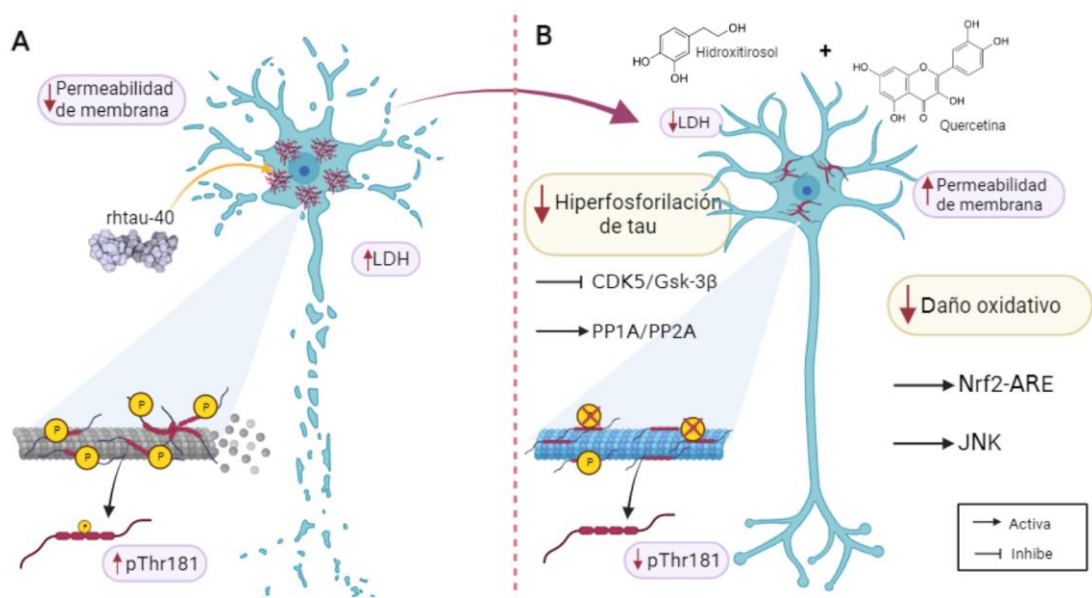


Figura 16. Modelo propuesto del efecto neuroprotector de la combinación Q (1 μM) más HT (1 μM) en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40. (A) Esquema que representa el modelo de daño celular inducido por rhtau-40 (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en células SH-SY5Y. (B) Esquema de la acción neuroprotectora de la combinación de Q más HT en el modelo de daño celular inducido por rhtau-40 (14 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mediante posibles vías. LDH: lactato deshidrogenasa; pThr181: treonina 181 fosforilada; rhtau-40: proteína tau recombinante humana 40; CDK5: quinasa dependiente de ciclina 5; Gsk-3 β : glicógeno sintasa quinasa 3-beta; PP1A: proteína fosfatasa 1; PP2A: proteína fosfatasa 2; JNK: quinasa c-Jun N-terminal; Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2; ARE: elemento de respuesta antioxidante.

5. CONCLUSIONES

En este seminario de título se estableció un nuevo modelo de daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Este modelo sería una aproximación a lo que estaría ocurriendo en la EA en relación con hiperfosforilaciones patológicas de tau que conllevan a la degeneración neuronal.

La combinación de Q (1 μ M) más HT (1 μ M) inhibe la agregación de la proteína rhtau-40 inducida por heparina (19,3%) en un modelo *in vitro* libre de células y posee una mayor actividad antioxidante que los compuestos por si solos (15,9%). Esta combinación es segura para las células SH-SY5Y (96,8% de viabilidad) y más importante aún, revierte el daño celular inducido por la proteína rhtau-40 fosforilada (MTT: 10,8%, LDH: 7,8%) en células SH-SY5Y. Lo anterior se complementa con el efecto de la combinación en la disminución de la señal de fluorescencia del anticuerpo ptau181 en células SH-SY5Y tratadas con rhtau-40 fosforilada. Todas estas acciones demuestran el potente efecto neuroprotector de Q (1 μ M) más HT (1 μ M) en el contexto de la EA. Esta combinación se propone como un potencial nutracéutico para proteger la función neuronal en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 2021 Alzheimer's disease facts and figures. 2021. *Alzheimer's & Dementia*. **17(3)**: 327-406.
- Anand, P., & Singh, B. 2013. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*. **36**: 375-399.
- Arendt, T., Stieler, J. T., & Holzer, M. 2016. Tau and tauopathies. *Brain Research Bulletin*. **126**: 238-292.
- Arredondo, F., Echeverry, C., Abin-Carriquiry, J. A., Blasina, F., Antúnez, K., Jones, D. P., Go, Y., Liang, Y., & Dajas, F. 2010. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radical Biology and Medicine*. **49(5)**: 738-747.
- Ayers, J. I., Giasson, B. I., & Borchelt, D. R. 2018. Prion-like Spreading in Tauopathies. *Biological Psychiatry*. **83(4)**: 337-346.
- Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M. S., Wiltfang, J., & Da Cruz e Silva, O. A. B. 2014. Flavonoids as Therapeutic Compounds Targeting Key Proteins Involved in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. **5(2)**: 83-92.
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. 2005. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation*. **115(6)**: 1449-1457.
- Betteridge, D. J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism-clinical and Experimental*. **49(2)**: 3-8.
- Calfío, C., Gonzalez, A., Singh, S. K., Rojo, L. E., & Maccioni, R. B. 2020. The Emerging Role of Nutraceuticals and Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. **77(1)**: 33–51.
- Cetrullo, S., D'Adamo, S., Guidotti, S., Borzì, R. M., & Flamigni, F. 2016. Hydroxytyrosol prevents chondrocyte death under oxidative stress by inducing autophagy through sirtuin 1-dependent and -independent mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1860(6)**: 1181-1191.
- Chen, C., Zhou, W., Liu, S., Deng, Y., Cai, F., Tone, M., Tone, Y., Tong, Y., & Song, W. 2012. Increased NF- κ B signalling up-regulates BACE1 expression and its therapeutic potential in Alzheimer's disease. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. **15(01)**: 77-90.
- Chen, J., Deng, X., Liu, N., Li, M., Liu, B., Fu, Q., Qu, R., & Ma, S. 2016. Quercetin attenuates tau hyperphosphorylation and improves cognitive disorder via suppression of ER stress in a manner dependent on AMPK pathway. *Journal of Functional Foods*. **22**: 463-476.

Cordaro, M., Salinaro, A. T., Siracusa, R., D'Amico, R., Impellizzeri, D., Scuto, M., Ontario, M. L., Crea, R., Cuzzocrea, S., Di Paola, R., Petrillo, A., & Calabrese, V. 2021. Hidrox® Roles in Neuroprotection: Biochemical Links between Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease. *Antioxidants*. **10(5)**: 818.

Cordero, J. G., García-Escudero, R., Avila, J., Gargini, R., & García-Escudero, V. 2018. Benefit of Oleuropein Aglycone for Alzheimer's Disease by Promoting Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2018**: 1-12.

Cornejo, A., Jiménez, J. M., Caballero, L., Melo, F., & Maccioni, R. B. 2011. Fulvic acid inhibits aggregation and promotes disassembly of tau fibrils associated with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*. **27(1)**: 143–153.

Costa, L. G., Garrick, J. M., Roquè, P. J., & Pellacani, C. 2016. Mechanisms of Neuroprotection by Quercetin: Counteracting Oxidative Stress and More. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2016**: 1-10.

Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., Slomianny, C., Lippens, G., & Cotelle, P. 2011. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochemistry international*. **58(6)**: 700-707.

Deepika, & Maurya, P. K. 2022. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules*. **27(8)**: 2498.

Drepper, F., Biernat, J., Kaniyappan, S., Meyer, H. E., Mandelkow, E. M., Warscheid, B., & Mandelkow, E. 2020. A combinatorial native MS and LC-MS/MS approach reveals high intrinsic phosphorylation of human Tau but minimal levels of other key modifications. *Journal of Biological Chemistry*. **295(52)**: 18213-18225.

Farias, G., Cornejo, A., Jimenez, J., Guzman, L., & B Maccioni, R. 2011. Mechanisms of tau self-aggregation and neurotoxicity. *Current Alzheimer Research*. **8(6)**: 608-614.

Fotakis, G., & Timbrell, J. A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. **160(2)**: 171-177.

Friedhoff, P., Schneider, A., Mandelkow, E. M., & Mandelkow, E. 1998. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry*. **37(28)**: 10223-30.

Gao, Y. L., Wang, N., Sun, F. R., Cao, X. P., Zhang, W., & Yu, J. T. 2018. Tau in neurodegenerative disease. *Annals of translational medicine*. **6(10)**: 175.

Gan, L., & Johnson, J. A. 2014. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1842(8)**: 1208-1218.

Goedert, M. 1993. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*. **16(11)**: 460-465.

Goedert, M., Eisenberg, D. S., & Crowther, R. A. 2017. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*. **40(1)**: 189-210.

Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. 1989. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*. **3(4)**: 519-526.

Guzman-Martinez, L., Calfio, C., Farias, G. A., Vilches, C., Prieto, R., & Maccioni, R. B. 2021a. New Frontiers in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. **82**: S51-S63.

Guzman-Martinez, L., Farías, G. A., Tapia, J. P., Sánchez, M. P., Fuentes, P., Gloger, S., & Maccioni, R. B. 2021b. Interventional Study to Evaluate the Clinical Effects and Safety of the Nutraceutical Compound BrainUp-10® in a Cohort of Patients with Alzheimer's Disease: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Trial. *J Alzheimer's Dis*. **81(3)**: 1231–1241.

Hamaguchi, T., Ono, K., & Yamada, M. 2010. REVIEW: Curcumin and Alzheimer's Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. **16(5)**: 285-297.

Hempel, H., Vassar, R., De Strooper, B., Hardy, J., Willem, M., Singh, N. K., Zhou, J. L., Yan, R., Vanmechelen, E., De Vos, A., Nisticò, R., Corbo, M., Imbimbo, B. P., Streffer, J., Voytyuk, I., Timmers, M., Monfared, A. A. T., Irizarry, M. C., Albala, B., ... & Vergallo, A. 2021. The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*. **89(8)**: 745-756.

Hase, T., Shishido, S., Yamamoto, S., Yamashita, R., Nukima, H., Taira, S., Toyoda, T., Abe, K., Hamaguchi, T., Ono, K., Noguchi-Shinohara, M., Yamada, M., & Kobayashi, S. 2019. Rosmarinic acid suppresses Alzheimer's disease development by reducing amyloid β aggregation by increasing monoamine secretion. *Scientific Reports*. **9(1)**.

Howard, R., McShane, R., Lindesay, J., Ritchie, C., Baldwin, A., Barber, R., Burns, A., Dening, T., Findlay, D., Holmes, C., Hughes, A., Jacoby, R., Jones, R., Jones, R., McKeith, I., Macharouthu, A., O'Brien, J., Passmore, P., Sheehan, B., ... & Phillips, P. 2012. Donepezil and Memantine for Moderate-to-Severe Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. **366(10)**: 893-903.

Huang, Y., & Mucke, L. 2012. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*. **148(6)**: 1204-1222.

Kfoury, N., Holmes, B. B., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. 2012. Trans-cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species. *Journal of Biological Chemistry*. **287(23)**: 19440-19451.

Khan, H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W. S., & Akkol, E. K. 2019. Neuroprotective Effects of Quercetin in Alzheimer's Disease. *Biomolecules*. **10(1)**: 59.

Komatsu, M., & Ichimura, Y. 2010. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Letters*. **584(7)**: 1374-1378.

- Köpke, E., Tung, Y., Shaikh, S., Alonso, A., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. 1993. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*. **268(32)**: 24374-24384.
- Leri, M., Natalello, A., Bruzzone, E., Stefani, M., & Bucciantini, M. 2019. Oleuropein aglycone and hydroxytyrosol interfere differently with toxic A β 1-42 aggregation. *Food and Chemical Toxicology*. **129**: 1-12.
- Li, W., Sperry, J. B., Crowe, A., Trojanowski, J. Q., Smith III, A. B., & Lee, V. M. Y. 2009. Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with the amino groups of tau. *Journal of Neurochemistry*. **110(4)**: 1339-1351.
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. **179(2)**: 312-339.
- Ma, S., Attarwala, I. Y., & Xie, X. 2019. SQSTM1/p62: A Potential Target for Neurodegenerative Disease. *ACS Chemical Neuroscience*. **10(5)**: 2094-2114.
- Maccioni, R. B., Calfío, C., González, A., & Lüttges, V. 2022. Novel Nutraceutical Compounds in Alzheimer Prevention. *Biomolecules*. **12(2)**: 249.
- Maccioni, R. B., González, A., Andrade, V., Cortés, N., Tapia, J. P., & Guzmán-Martínez, L. 2018. Alzheimer's Disease in the Perspective of Neuroimmunology. *The open neurology journals*. **12**: 50–56.
- Maccioni, R. B., Rojo, L. E., Fernandez, J. A., & Kuljis, R. O. 2009. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer 's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1153(1)**: 240-246.
- Maeda, S., Sahara, N., Saito, Y., Murayama, S., Ikai, A., & Takashima, A. 2006. Increased levels of granular tau oligomers: An early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience Research*. **54(3)**: 197-201.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K., & Mucke, L. 2011. The many faces of tau. *Neuron*. **70(3)**: 410-426.
- Paris, D. H., Mathura, V., Ait-Ghezala, G., Beaulieu-Abdelahad, D., Patel, N. K., Bachmeier, C., & Mullan, M. 2011. Flavonoids lower Alzheimer's A β production via an NF-kB dependent mechanism. *Bioinformation*. **6(6)**: 229-236.
- Pérez-Bonilla, M., Salido, S., Van Beek, T.A., & Altarejos, J. 2014 Radical-scavenging compounds from olive tree (*Olea europaea* L.) wood. *J Agric Food Chem*. **62**: 144–151.
- Prickaerts, J., Heckman, P. R., & Blokland, A. 2017. Investigational phosphodiesterase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease. Expert opinion on investigational drugs. **26(9)**: 1033-1048.
- Schweiger, S., Matthes, F., Posey, K., Kickstein, E., Weber, S., Hettich, M. M., ... &

Krauß, S. 2017. Resveratrol induces dephosphorylation of Tau by interfering with the MID1-PP2A complex. *Scientific reports*. **7(1)**: 1-13.

Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., ... & Mount, C. 2016. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. **537(7618)**: 50-56.

Shati, A. A., & Alfaifi, M. Y. 2019. Trans-resveratrol inhibits tau phosphorylation in the brains of control and cadmium chloride-treated rats by activating PP2A and PI3K/Akt induced-inhibition of GSK3 β . *Neurochemical research*. **44**: 357-373.

Shen, X., Luo, T., Li, S., Ting, O., He, F., Xu, J., & Wang, H. 2018. Quercetin inhibits okadaic acid-induced tau protein hyperphosphorylation through the Ca²⁺-calpain-p25-Cdk5 pathway in HT22 cells. *International Journal of Molecular Medicine*.

Shi, C., Zhao, L., Zhu, B., Li, Q., Yew, D. T., Yao, Z., & Xu, J. 2009. Protective effects of Ginkgo biloba extract (EGb761) and its constituents quercetin and ginkgolide B against β -amyloid peptide-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Chemico-Biological Interactions*. **181(1)**: 115-123.

Silva, P., Rodríguez-Pérez, M., Gómez-Torres, Ó., & Burgos-Ramos, E. 2021. Olive oil and wine as source of multi-target agents in the prevention of Alzheimer disease. *Nutrition Research Reviews*. **36(1)**: 140-154.

Solomon, A., Mangialasche, F., Richard, E., Andrieu, S., Bennett, D.A., Breteler, M., Fratiglioni, L., Hooshmand, B., Khachaturian, A.S., Schneider, L.S., Skoog, I., & Kivipelto, M. 2014. Advances in the prevention of Alzheimer's disease and dementia. *J Intern Med*. **275**: 229-250.

St-Laurent-Thibault, C., Arseneault, M., Longpre, F., & Ramassamy, C. 2011. Tyrosol and Hydroxytyrosol Two Main Components of Olive Oil, Protect N2a Cells Against Amyloid- β -Induced Toxicity. Involvement of the NF- κ B Signaling. *Current Alzheimer Research*. **8(5)**: 543-551.

Sun, X., Li, L., Dong, Q. L., Zhu, J., Huang, Y., Hou, S., Yu, X., & Liu, R. 2021. Rutin prevents tau pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*. **18(1)**.

Tosatti, J. A. G., Fontes, A. F. D. S., Caramelli, P., & Gomes, K. B. 2022. Effects of Resveratrol Supplementation on the Cognitive Function of Patients with Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Drugs & Aging*. **39(4)**: 285-295.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division 2022. *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3.

Utreras, E., Terse, A., Keller, J., Iadarola, M.J., Kulkarni, A.B. 2011. Resveratrol inhibits

Cdk5 activity through regulation of p35 expression. *Molecular Pain*. **7**: 1744-1749.

Van Bulck, M., Sierra-Magro, A., Alarcon-Gil, J., Perez-Castillo, A., & Morales-Garcia, J. A. 2019. Novel Approaches for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, **20(3)**: 719.

Van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., ... & Iwatsubo, T. 2023. Lecanemab in early Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*. **388(1)**: 9-21.

Vasconcelos, A. R., Dos Santos, N. B., Scavone, C., & Munhoz, C. D. 2019. Nrf2/ARE Pathway Modulation by Dietary Energy Regulation in Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology*. 10.

Visioli, F., Rodríguez-Pérez, M., Gómez-Torres, Ó., Pintado-Losa, C., & Burgos-Ramos, E. 2020. Hydroxytyrosol improves mitochondrial energetics of a cellular model of Alzheimer's disease. *Nutr Neurosci*. 1-11.

Wegmann, S., Biernat, J., & Mandelkow, E. 2021. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*. **69**: 131-138.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **72(5)**: 1858–1862.

Winblad, B., Jones, R. W., Wirth, Y., Stöfler, A., & Möbius, H. J. 2007. Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. **24(1)**: 20–27.

Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C. C., & Bu, G. 2019. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature Reviews Neurology*. **15(9)**: 501-518.

Yu, G., Deng, A., Tang, W., Ma, J., Yuan, C., & Ma, J. 2016. Hydroxytyrosol induces phase II detoxifying enzyme expression and effectively protects dopaminergic cells against dopamine- and 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity. *Neurochemistry International*. **96**: 113-120.

Zhang, X. W., Chen, J. Y., Ouyang, D., & Lu, J. H. 2020. Quercetin in Animal Models of Alzheimer's Disease: A Systematic Review of Preclinical Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. **21(2)**: 493.

Zou, X., Feng, Z., Li, Y., Wang, Y., Wertz, K., Weber, P., Fu, Y., & Liu, J. 2012. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **23(8)**: 994-1006.

7. ANEXOS

1. Capacidad antioxidante de los compuestos Q y HT

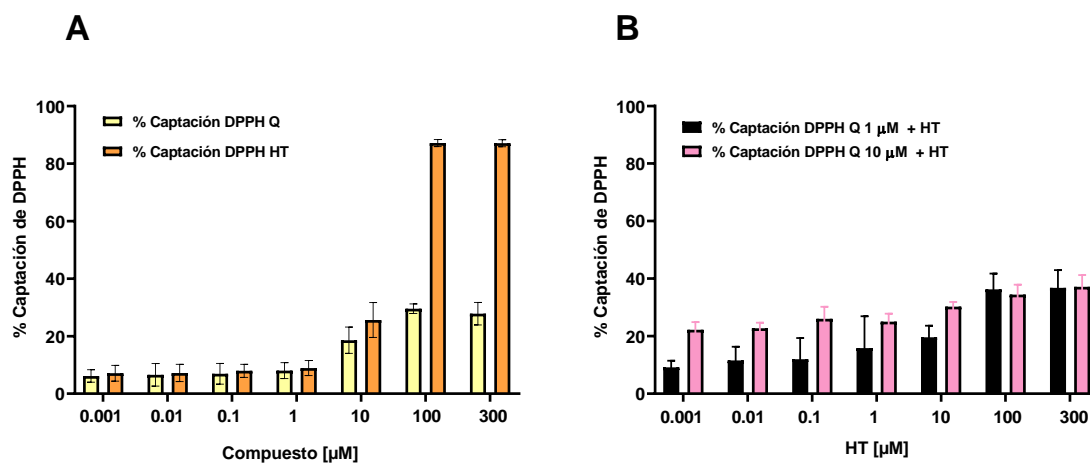


Figura suplementaria 1. Determinación de la capacidad antioxidante de Q y HT.

(A) Captación de DPPH de las diferentes combinaciones de Q más HT. **(B)** Captación de DPPH de los compuestos Q y HT por sí solos ($n=5$). Las barras representan el valor promedio \pm la desviación estándar.