



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis del papel protector de oleuropeína en los procesos de agregación patológica de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson

Jesús García Carrillo

Julio, 2020



Análisis del papel protector de
oleuropeína en los procesos de
agregación patológica de la
 α -sinucleína en la enfermedad de
Parkinson



Fdo. Jesús García Carrillo

Jaén. Julio 2020

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
ABSTRACT	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1. Papel de la α-sinucleína en la enfermedad de Parkinson	8
2.2. Técnicas de detección de la agregación de α-sinucleína	14
2.3. Compuestos fenólicos de origen vegetal y su papel en enfermedades neurodegenerativas	15
<i>2.3.1. La oleuropeína</i>	15
3.OBJETIVO	17
4. METODOLOGÍA	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	24
BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXOS	31

1. RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión de la literatura científica existente sobre los datos de los que se dispone desde 2010 hasta la actualidad acerca del efecto protector que desempeña la oleuropeína en la agregación de la α -sinucleína, proteína implicada en la Enfermedad de Parkinson.

Se explica el papel que desempeña esta proteína amiloide, la α -sinucleína, en la enfermedad de Parkinson, así como el compuesto fenólico oleuropeína afecta a la agregación de α -sinucleína.

A pesar de los pocos trabajos recogidos en la bibliografía, éstos muestran como la oleuropeína es capaz de mitigar e inhibir los agregados de α -sinucleína, desagregar las fibrillas existentes, prevenir la muerte neuronal y reducir la producción de especies reactivas de oxígeno.

ABSTRACT

The goal of this project was to undertake a research of the existing scientific literature on the data 2010 available until now about the protective effect of oleuropein on the main aggregation mechanisms of the α -synuclein involved in Parkinson's disease. With this aim, we introduce this Project through a general idea about Parkinson's disease.

The role of this amyloid protein, α -synuclein, in Parkinson's disease is explained, as well as the phenolic compound oleuropein affects the aggregation of α -synuclein.

Despite the few Works collected in the bibliographic, they show how oleuropein is capable of mitigating and inhibiting α -synuclein aggregates, breaking down existing fibrils, preventing neuronal death and mitigating the production of reactive oxygen species.

2. INTRODUCCIÓN

Cada vez más se conocen distintos polifenoles de origen vegetal que afectan a los principales mecanismos de agregación de proteínas implicadas en enfermedades neurodegenerativas como la α -sinucleína, principal proteína implicada en la Enfermedad de Parkinson. Este trabajo fin de grado se ha estructurado dando una explicación de cómo afecta la oleuropeína, polifenol principal en el olivo, a la α -sinucleína.

2.1. Papel de la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, después del Alzheimer, con un riesgo estimado de casi el 3-7%, la cual fue descrita y documentada por James Parkinson en el año 1817 en su ensayo: *An Essay on the Shaking Palsy*. Este ensayo describe la historia médica de seis individuos que sufrían la enfermedad. (Enfermedad de Parkinson y trastornos relacionados 2006).

De 1990 a 2016, la carga mundial de EP aumentó de 2.5 a 6.1 millones de pacientes (Dextera, D *et al.*, 2013; Weintraub *et al.*, 2010). Dado que la edad representa el mayor factor de riesgo para esta enfermedad y que nos encontramos en un contexto en el cual la población a nivel mundial envejece exponencialmente, Dehay y colaboradores indican que la prevalencia de la EP continuará aumentando. (Dehay *et al.*, 2010).

El sello patológico de la EP se caracteriza por la acumulación de agregados mal plegados de cuerpos de Lewy que contienen α -sinucleína, es una proteína nuclear y sináptica que es el principal componente de los cuerpos de Lewy, en todo el cerebro, y la degeneración de las neuronas en la sustancia negra de la pars compacta. (SNpc) (Li, J *et al.*, 2107).

Esto conduce a un estado de deficiencia dopaminérgica, más profundamente en el cuerpo estriado, que finalmente culmina en los síntomas motores cardinales que ejemplifican la enfermedad. (Hwang, O. 2013; Li, J *et al.*, 2017).

El primer vínculo de la EP con la α -sinucleína fue también la primera demostración concluyente de un defecto genético que conduce a la EP, y por lo tanto tiene un valor histórico y conceptual. Si bien algunos discutieron la contribución familiar a la enfermedad, la mayoría consideró que en el mejor de los casos era menor. (Pfefferkorn, C., *et al* 2012; Thome, A *et al.*, 2015).

El descubrimiento tangible de un defecto genético vinculado a la EP en familias particulares fue un descubrimiento innovador, que abrió la puerta a una gran cantidad de estudios que investigaron la base genética del trastorno, que culminó en estudios más recientes de asociación de todo el genoma (GWAS), que notablemente, han hecho un círculo completo volviendo a los orígenes de la era de la genética molecular de la EP. Resulta que uno de los principales genes identificados como vinculados a la EP esporádica no es otro que SNCA, el gen que codifica la α -sinucleína. (Deuschl, G *et al.*, 2013; Gorbatyuk, M *et al.*, 2012; Irwin, D *et al.*, 2012).

El gen SNCA codifica una proteína de 140 aminoácidos, en soluciones acuosas no tiene una estructura definida, de ahí el término "proteína desplegada de forma nativa". Sin embargo, la α -sinucleína forma estructuras helicoidales α al unirse a los lípidos cargados negativamente, como los fosfolípidos presentes en las membranas celulares y las estructuras de sheetrich β en períodos prolongados de incubación. (Venda, L *et al.*, 2010).

La proteína se compone de tres regiones distintas (Figura 1):

- 1) Un terminal amino (residuos 1 a 60), que contiene elementos de unión a lípidos de apolipoproteína, que se predice que forman hélices anfifílicas que confieren la propensión a formar estructuras α -helicoidales en la unión a la membrana.
- 2) Una región hidrofóbica central (61–95), llamada NAC (componente no Ab), que confiere el potencial de la lámina β .
- 3) Un terminal carboxilo que está altamente cargado negativamente y es propenso a ser desestructurado. (Lashuel, H *et al.*, 2013).

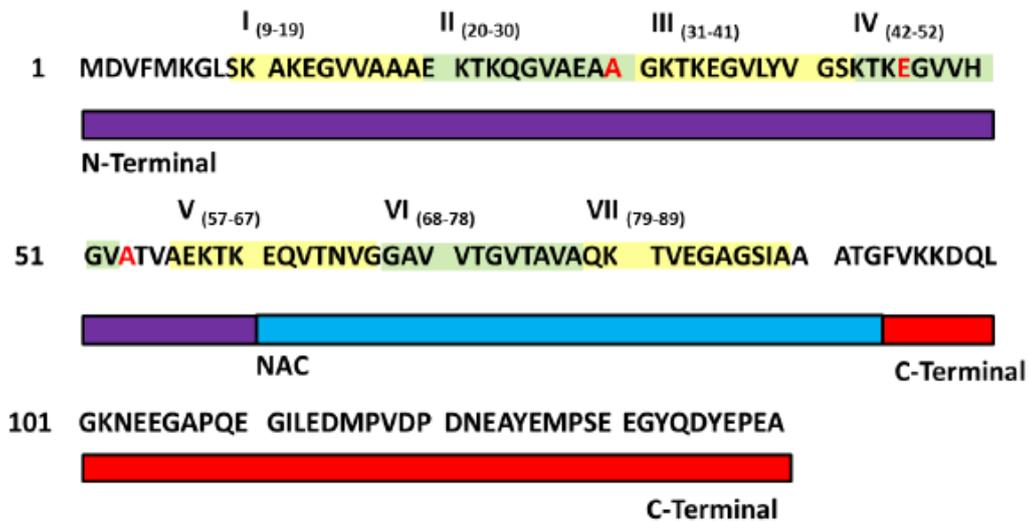


Figura 1: Regiones de la secuencia de aminoácidos de la α -sinucleína. (Imagen obtenida y adaptada de: Uversky, V *et al.*, 2012)

Hay al menos dos variantes más cortas de empalme alternativo de la transcripción del gen SNCA, pero sus funciones fisiológicas y patológicas no se han caracterizado bien. (Dehay, B *et al.*, 2015; Reish, H *et al.*, 2015).

Una historia paralela que se ha desarrollado a lo largo de los años es la patología anormal de α -sinucleína, que caracteriza las muestras neuropatológicas derivadas no solo de pacientes con EP, sino también de pacientes con otras afecciones neurodegenerativas, denominadas colectivamente "sinucleinopatías". (Li, Y *et al.*, 2010; Nakamura, K *et al.*, 2011).

La capacidad de modelar la acumulación anormal de α -sinucleína en varios modelos celulares y animales ha llevado al estudio de las consecuencias de dicha acumulación, al desciframiento de las vías moleculares involucradas y a la identificación de posibles objetivos terapéuticos.

Dichos objetivos pueden ser de utilidad general y proporcionar la base para futuras terapias de la mayoría de las formas de EP y

potencialmente de otras sinucleinopatías. (Bruggink, K *et al.*, 2011; Emmanouilidou, E *et al.*, 2011).

La figura 2 esquematiza el proceso por etapas mediante el cual la α -sinucleína se pliega incorrectamente y se convierte en oligómeros patológicos y agregados de orden superior que se fibrilizan y depositan en cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy en las neuronas del cerebro con EP. (Virginia, M *et al.*, 2006).

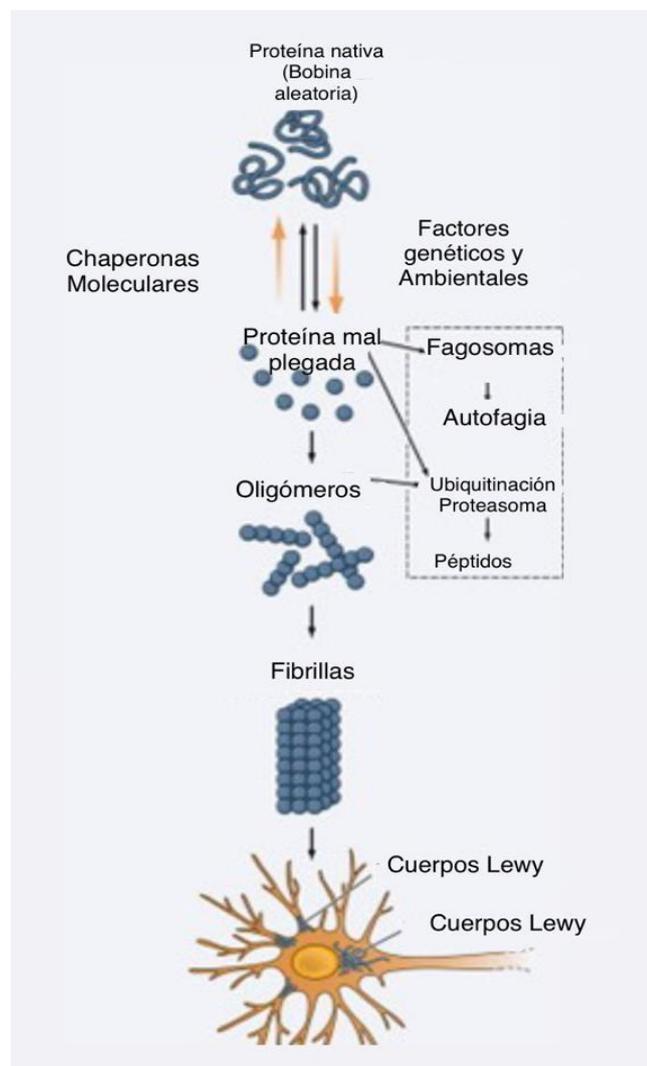


Figura 2: Modelo de plegamiento y agregación de α -sinucleína y las consecuencias posteriores. (Imagen obtenida y adaptada de: Virginia, M *et al.*, 2006)

La α -sinucleína es un miembro de la familia de las proteínas de la sinucleína, que también incluye la sinucleína β y γ , lo que distingue en gran medida la α -sinucleína de los otros miembros estructuralmente es la región NAC.

Los tres miembros de la familia son proteínas predominantemente neuronales que, en condiciones fisiológicas se localizan preferentemente en terminales presinápticas. (Winner, B *et al.*, 2012). Hay algunos informes de patología neurítica extranigral de sinucleína β y γ en sinucleinopatías, pero si es que esta existe no parece estar extendida. (Guardia-Laguarta, C *et al.*, 2015; Stefanis, L. 2012).

Curiosamente, se han descrito mutaciones puntuales en la sinucleína β en casos raros con DLB (Auluck, P *et al.*, 2010), y la expresión de uno de estos en una neurodegeneración inducida por un modelo de ratón transgénico. (Kalia, L *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha encontrado que la sinucleína β de tipo salvaje (WT) es protectora en varios entornos contra la neurodegeneración mediada por α -sinucleína. (Winslow, A *et al.*, 2011; Yasuda, T *et al.*, 2010).

Parece, por lo tanto, que la β -sinucleína puede tener propiedades neuroprotectoras, pero que, bajo ciertas situaciones puede asumir un potencial neurotóxico. La α -sinucleína se expresa abundantemente en el sistema nervioso y comprende el 1% de la proteína citosólica total. En la inmunohistoquímica en cerebros normales los anticuerpos anti-sinucleína confieren un patrón de tinción neuropilo puntual, que es consistente con la tinción terminal presináptica, mientras que la tinción del soma neuronal es menos aparente. (Feng, L *et al.*, 2010).

En los terminales presinápticos, la α -sinucleína está presente muy cerca, pero no dentro, de las vesículas sinápticas. De hecho, la α -sinucleína también es muy abundante, por razones poco claras, en eritrocitos y plaquetas. (Lu, Y *et al.*, 2011; Tsigelny, I *et al.*, 2012).

La expresión de α -sinucleína se induce durante el desarrollo neuronal, después de la determinación del fenotipo neuronal y el establecimiento de conexiones sinápticas, y va después de la inducción de proteínas involucradas en la estructura sináptica. (Winslow, A *et al.*, 2011; Yasuda, T *et al.*, 2010).

Además, los niveles de expresión de α -sinucleína se modulan en condiciones que alteran la plasticidad o confieren daño. (Kalia, L *et al.*, 2013; Tsigelny, I *et al.*, 2012). Tales datos han llevado a la noción de que la α -sinucleína puede ser un modulador de la transmisión sináptica.

Los exámenes de las propiedades neurofisiológicas de ratones nulos para α -sinucleína y de sistemas celulares en los que WT α -sinucleína se sobreexpresa, han sido fundamentales en este sentido, ya que revelan alteraciones en la liberación de neurotransmisores, que no siempre son consistentes en los sistemas neuronales. (Stefanis, L. 2012; Winslow, A *et al.*, 2011).

Sin embargo, en general, parece que la α -sinucleína actúa como una ruptura sutil para la liberación de neurotransmisores en circunstancias de disparos repetidos. Un elegante estudio (Auluck, P *et al.*, 2010) mostró que la α -sinucleína marcada con fluorescencia se aleja de las vesículas en la activación neuronal y luego regresa gradualmente.

Estos efectos pueden involucrar la unión transitoria de α -sinucleína a las vesículas, mientras que la α -sinucleína también puede estar involucrada en la biogénesis vesicular, a través de los efectos sobre el metabolismo del ácido fosfatídico y en la compartimentación entre las piscinas en reposo y fácilmente liberables. (Kalia, L *et al.*, 2013).

2.2. Técnicas de detección de la agregación de α -sinucleína

Las principales técnicas para la detección de la agregación de α -sinucleína son las siguientes:

Ensayos Thioflavin T (ThT): Desde su primera descripción en 1959, el tinte fluorescente ThT se ha convertido en uno de los más utilizados para identificar fibrillas amiloides tanto in vivo como in vitro. Esto es debido a su gran facilidad de emitir fluorescencia al unirse a las fibrillas amiloides (Biancalana *et al.*, 2010)

Microscopia electrónica de transmisión (TEM): Esta técnica puede ser usada para el diagnóstico de enfermedades de origen microbiano, aunque su principal uso es en el campo de la investigación. La TEM provee detalles ultraestructurales se utiliza sobre todo para validar los datos proporcionados por el ensayo ThT dando mediciones independientes del alcance de la fibrilación y la estructura de agregados finales. (SB Jurado *et al.*, 2005)

SDS-PAGE: Esta técnica se usa comúnmente para separar proteínas según su peso molecular y es la técnica de entrada para la purificación de proteínas para su análisis por espectrometría de masas. (Sch-gger, H. 2006)

2.3. Compuestos fenólicos de origen vegetal y su papel en enfermedades neurodegenerativas

Los compuestos fenólicos que encontramos en las plantas tienen una amplia gama de propiedades como: anti alergénicos, antiarterogénicos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, contra el cáncer, cardio protectores, efectos vasodilatadores y neuroprotectores. (Baladusundram, N *et al.*, 2006).

Uno de los cultivos más importantes en los países mediterráneos es el de aceituna *olive europaea* (Peralbo-Molina 2013)

Los compuestos fenólicos en hojas de olivo son numerosos y de diversa naturaleza. (Tsimidou, M *et al.*, 2010).

Las oleuropeínas y los secoiridoide relacionados son los principales compuestos en hojas de olivo entre los cuales el principal compuesto es la oleuropeína. (Kontogianni, V *et al.*, 2012).

2.3.1. La oleuropeína

La oleuropeína (figura 3) es un secoiridoide fenólico glicosilado del éster del ácido elenólico con 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol), es la molécula responsable del amargor del aceite de oliva virgen. (AOV).

La oleuropeína aparece principalmente en la forma desglicosilada o oleuropeína aglicona. Es el principal polifenol en las hojas de olivo, también se encuentra en sus frutos, pero su concentración varía según la fase de maduración. (Karaya *et al.*, 2009).

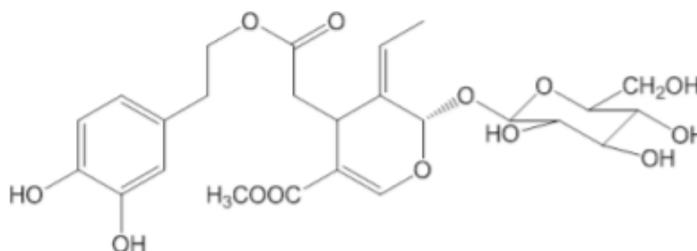


Figura 1: Estructura química de la oleuropeína. (Karaya *et al.*, 2009).

Varios estudios han demostrado que la oleuropeína se absorbe en el intestino grueso, esto es porque la parte glucosídica protege a la molécula de la degradación en el medio ácido del estómago.

La oleuropeína se degrada en el colon y se libera hidroxitirosol como producto mayoritario. (Vissers MN *et al.*, 2002).

No es nuevo que el extracto de hoja de olivo se ha usado en medicina tradicional en múltiples afecciones e incluso se ha llegado a comercializar, es por eso que el estudio del efecto farmacológico de la oleuropeína en distintos modelos tanto animales como moleculares se ha incrementado en los últimos años.

La oleuropeína tiene varias propiedades farmacológicas como puede ser su actividad antioxidante, gracias a su estructura ortodifenólica, que ha demostrado tener una actividad antioxidante superior a la de otros antioxidantes conocidos, como pueden ser las vitaminas E y C. (Charoenprasert, S *et al.*, 2012).

3.OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo fin de grado ha sido revisar y discutir la información actual sobre el efecto de la oleuropeína en los principales mecanismos de agregación de la α -sinucleína, principal proteína implicada en la enfermedad de Parkinson.

4. METODOLOGÍA

En cuanto a la metodología, se llevó a cabo una investigación exploratoria y descriptiva mediante una exhaustiva búsqueda bibliográfica de literatura relativa al tema de terapias e intervenciones.

Para la revisión literaria, se han utilizado las bases de datos Pubmed, Scielo, Dialnet y Google Scholar, para la búsqueda de los artículos se han usado como palabras clave: *oleuropein*, *oleuropein aglycone*, *α -synuclein*, *α -synuclein aggregation* y *Parkinson disease*, tanto en inglés como en español.

La selección de las publicaciones encontradas se realizó en base a los criterios de inclusión y exclusión que podemos encontrar en la tabla 1.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">-Estudios publicados desde el 2010 hasta la actualidad.-Artículos publicados en lengua española o inglesa.-Estudios que se realizan sobre la oleuropeína en los procesos de agregación patológica de la α-sinucleína en el Parkinson.	<ul style="list-style-type: none">-Artículos a los que no se tuvo acceso a texto completo.-Estudios que no se centran en el programa de oleuropeína en los procesos de agregación patológica de la α-sinucleína en el Parkinson y sus aportaciones.-Artículos repetidos.-Estudios en otro idioma que no sea inglés o español.-Documentos sin autor, sin referencia o incompletos.-Aportes desactualizados.

Tabla 1: Criterios de inclusión y exclusión considerados en este trabajo.

5. RESULTADOS

La búsqueda bibliográfica realizada nos lleva a cinco artículos a comentar:
(ver anexo 1)

En el estudio de Mohammad-Beigi (Mohammad-Beigi et al. 2019) se realiza una búsqueda de compuestos naturales que inhiban la agregación de α -sinucleína y reduzca su tendencia a formar oligómeros tóxicos. Se estudian las variedades de aceitunas Koroneiki, arbequina y picual mediante una amplia diversidad de métodos y técnicas de análisis. De los 15 extractos estudiados, se seleccionaron 7 como los más eficaces inhibiendo la agregación de α -sinucleína. El extracto de Koroneiki fue particularmente eficaz en la retención de la conformación desplegada de α -sinucleína. La mayor familia de compuestos presentes en los extractos consistió en oleuropeína y sus derivados, atribuyéndose a este compuesto la ausencia de fibrillas en la α -sinucleína.

En el estudio de Palazzi, L., Bruzzone, E. y Bisello (Palazzi L. et al., 2018) se investiga sobre una posible estrategia que consiste en el uso de moléculas pequeñas capaces de ralentizar el proceso de agregación de α -sinucleína. Como resultados más relevantes indican que la oleuropeína interfiere con la agregación de α -sinucleína en fibrillas amiloideas. Se observa que cuando se incuban *in vitro* se agregan estas fibrillas. La formación de las fibrillas se retrasa cuando están en presencia de oleuropeína aglicona en una proporción 1:3 α -sinucleína:oleuropeína, pero si se cambia a 1:10 la señal de fibrilación de la α -sinucleína apenas incrementa esto confirma que la oleuropeína aglicona interfiere con el proceso de agregación de la α -sinucleína.

En el estudio de Brunetti, G., Di Rosa, G., Scuto, M., Leri, M., Stefani, M., Schmitz-Linneweber, C., Calabrese, V., y Saul, N. (Brunetti, G, et al., 2020) se realiza una investigación con *C. elegans* al cual se le induce el Parkinson para ver como la oleuropeína aglicona afecta a la enfermedad. Para ver de forma más esquemática estos resultados he confeccionado una tabla en la cual se representa el número de golpes de *C. elegans* sano, con la enfermedad de Parkinson y tras tratarlo con la oleuropeína aglicona (figura 4). Para ver como la oleuropeína aumenta la vida del organismo se evalúa la resistencia al estrés por

calor y estos resultados se ven en la figura 5, en la cual podemos ver como al tratar con concentraciones de 30 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de oleuropeína la vida media del organismo aumenta.

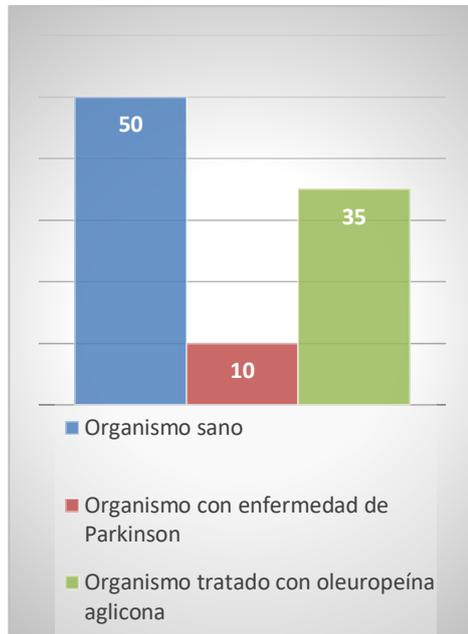


Figura 4: Efectos de oleuropeína en la tasa de golpeo. (Elaboración propia)

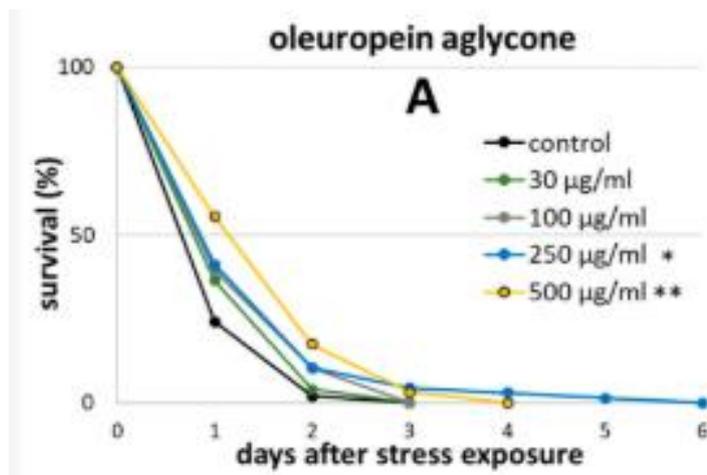


Figura 5: Curva de supervivencia por estrés térmico durante el tratamiento con oleuropeína. (Brunetti, G, *et al.*, 2020).

En el estudio de Priyanka Borah, Airy Sanjeev y Venkata Satish Kumar (Priyanka Borah *et al.*, 2019) se investiga sobre el efecto que tiene la oleuropeína frente a la estabilización monomérica de la α -sinucleína mediante el uso de una simulación computacional. En la figura 6 se puede ver como se ha preparado el complejo α -sinucleína – oleuropeína la cual se ha demostrado como se estabiliza debido al plegamiento parcial.

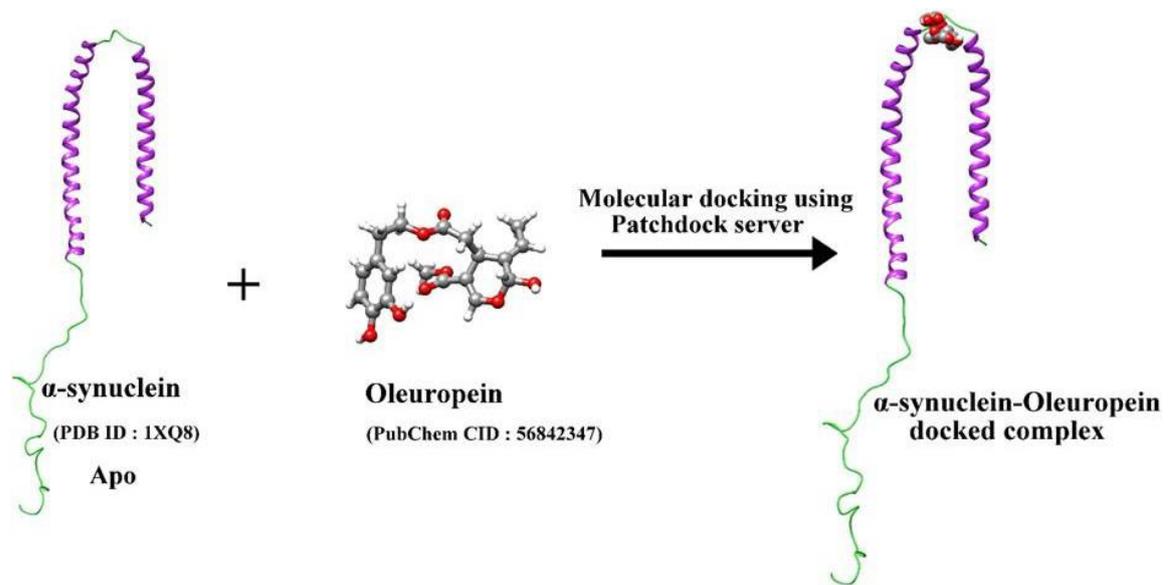


Figura 6: representación esquemática de la unión de oleuropeína a α -sinucleína. (Priyanka Borah *et al.*, 2019)

En el estudio de Imène Achour (Imène Achour *et al.*, 2016) investiga si la oleuropeína puede prevenir la degeneración neuronal en la enfermedad del Parkinson a través de un modelo dopaminérgico. Como resultado más relevante se ve como la oleuropeína previene la muerte neuronal y mitiga la producción de especies reactivas de oxígeno. También mediante una medición de los autofagos formados se vio como la oleuropeína es capaz de reducir la autofagia neuronal.

6. DISCUSIÓN

De la búsqueda realizada llama la atención los pocos artículos publicados de 2010 hasta la actualidad, (2020) que estudian el efecto de la oleuropeína en la agregación de la α -sinucleína, en la mayoría de ellos se usan patrones de oleuropeína, solo en uno de ellos (Mohammad-Beigi *et al.*, 2019) se estudian aceitunas de 15 variedades (las cuales contienen oleuropeína) en los demás la oleuropeína se obtiene como patrones comerciales con el fin de estudiar como este compuesto fenólico se comporta respecto a la α -sinucleína, excepto en el estudio de Priyanka Borah (Priyanka Borah, *et al.*, 2019) el cual es una simulación computacional.

Para preparar la muestra de oleuropeína tanto en el artículo de Palazzi, L. (Palazzi L. *et al* 2018) como de Brunetti, G. (Brunetti, G *et al.*, 2020) se desglucosiló mediante tratamiento con almendra de glicosidasa, ya que la muestra era glucósido de oleuropeína, esta desglucosilación se comprobó mediante análisis de espectrometría de masas.

Solo se ha usado un trabajo en el cual se ha simulado computacionalmente la reacción que tiene la oleuropeína al unirse a la α -sinucleína, mientras que por otro lado en los demás estudios se han usado modelos *in vitro* o modelos *in vivo*.

Para evaluar la agregación de la α -sinucleína, se han realizado exámenes basados en ensayos Tht tanto en el artículo de Mohammad-Beigi como en el de Palazzi, L. , ensayo que se hizo *in vitro* sin embargo, en el artículo de Brunetti G. se usa *C.elegans* (organismo invertebrado) que es un ensayo in vivo a los cuales se les indujo el Parkinson, es decir la formación de agregados de α -sinucleína mediante un tratamiento con retonona (es un pesticida que ha demostrado que produce degeneración en las neuronas). Para evaluar los datos de los ensayos de Tht se hace uso de técnicas como la microscopia electrónica de transmisión.

Para comprobar si la oleuropeína es capaz de inhibir o desagregar la α -sinucleína en cada trabajo se hace un tipo de experimento diferente, en el estudio de Mohammad-Beigi se hace uso de la filtración de gel para ver si los extractos son capaces de desagregar las fibrillas existentes mientras se monitorea mediante absorción a 215 nm para detectar la aparición de α -sinucleína soluble.

Palazzi, L. estudió el tamaño de los agregados mediante microscopía electrónica de transmisión. En el trabajo de Brunetti, G. se observó el cambio en el número de golpes por minuto de los organismos con y sin tratamiento de oleuropeína, mostrando así como en los organismos que si se han tratado con este polifenol bajaba el número de golpes por minuto, también se hace uso del microscopio electrónico para ver la reducción de la acumulación de α -sinucleína. Priyanka Borah muestra como la α -sinucleína se estabiliza debido al plegamiento parcial.

En el artículo de Imène Achour (Imène Achour *et al.*, 2016) no se busca investigar si la oleuropeína afecta a la agregación de la α -sinucleína si no como lo hace frente al estrés oxidativo, el cual produce la muerte neuronal causante de la EP.

En general, todos los artículos dan como resultado positivo el uso de la oleuropeína contra la inhibición y desagregación de la α -sinucleína, así como la mitigación de la muerte neuronal.

CONCLUSIONES

Estos trabajos han contribuido a la mejora del conocimiento sobre el papel que tiene la α -sinucleína en la enfermedad de Parkinson, ya que nos explican cómo se agrega, como podemos tratarla, los efectos que tienen en el ser humano, en modelos in vitro y en modelos in vivo de animales, así como los beneficios del uso de polifenoles como es la oleuropeína la cual se puede obtener de materia prima como el olivar el cual es un recurso bastante abundante.

Para finalizar las conclusiones me gustaría exponer mi punto de vista, creo que se deberían estudiar más la oleuropeína como los compuestos fenólicos que hay en el olivo, tanto en la aceituna como en las hojas ya que hoy en día hay muy poca información al respecto. Para mí sería muy interesante disponer de complementos alimenticios o fármacos para enfermedades tales como el Parkinson usando polifenoles como la oleuropeína como principio activo.

BIBLIOGRAFÍA

- Auluck, P. K., Caraveo, G., & Lindquist, S. (2010). α -Synuclein: Membrane Interactions and Toxicity in Parkinson's Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), 211–233. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113313>
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Compuestos fenólicos en plantas y subproductos agroindustriales: Actividad antioxidante, ocurrencia, y usos potenciales. *Química de alimentos*. 2006, 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1804(7):1405-1412. doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001
- Bruggink, K. A., Kuiperij, H. B., & Verbeek, M. M. (2011). Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in Csf from patients with parkinson disease. *Neurology*, 77(5), 510–511. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318219dd92>
- Brunetti, G., Di Rosa, G., Scuto, M., Leri, M., Stefani, M., Schmitz-Linneweber, C., Calabrese, V., & Saul, N. (2020). Healthspan maintenance and prevention of parkinson's-like phenotypes with hydroxytyrosol and oleuropein aglycone in *C. elegans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2588. <https://doi.org/10.3390/ijms21072588>
- Charoenprasert S, Mitchell A. Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*). *J Agric Food Chem*. 2012; 60:7081-7095.
- Dehay, B., Bourdenx, M., Gorry, P., Przedborski, S., Vila, M., Hunot, S., ... Meissner, W. G. (2015). Targeting α -synuclein for treatment of Parkinson's disease: Mechanistic and therapeutic considerations. *The Lancet Neurology*, 14(8), 855–866. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00006-X)
- Dehay, B., Bové, J., Rodríguez-Muela, N., Perier, C., Recasens, A., Boya, P., & Vila, M. (2010). Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease.

Journal of Neuroscience, 30(37), 12535–12544.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1920-10.2010>

Deuschl, G., Schade-Brittinger, C., Agid, Y., & EARLYSTIM Study Group. (2013). Neurostimulation for Parkinson's disease with early motor complications. *The*

Dextera, D. T., & Jenner, P. (2013). Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018>

El NS, Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Reviews*. 2009; 67:632–638.

Enfermedad de parkinson y transtornos relacionados. (2006). Editorial Médica Panamericana
(<https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WN9hmAhJg9UC&oi=fnd&pg=PA1&dq=parkinson&ots=-PN8HsN4Ag&sig=mcCNucdjxuj9PokKMt72ljjpTDE#v=onepage&q=parkinson&f=false>)

Emmanouilidou, E., Elenis, D., Papasilekas, T., Stranjalis, G., Gerozissis, K., Ioannou, P. C., & Vekrellis, K. (2011). Assessment of α -synuclein secretion in mouse and human brain parenchyma. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022225>

Feng, L. R., Federoff, H. J., Vicini, S., & Maguire-Zeiss, K. A. (2010). α -Synuclein mediates alterations in membrane conductance: A potential role for α -synuclein oligomers in cell vulnerability. *European Journal of Neuroscience*, 32(1), 10–17.

Gorbatyuk, M. S., Shabashvili, A., Chen, W., Meyers, C., Sullivan, L. F., Salganik, M., ... Gorbatyuk, O. S. (2012). Glucose regulated protein 78 diminishes α -synuclein neurotoxicity in a rat model of parkinson disease. *Molecular Therapy*, 20(7), 1327–1337. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.28>

Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Schon, E. A., & Przedborski, S. (2015). A new role for α -synuclein in Parkinson's disease: Alteration of ER–

- mitochondrial communication. *Movement Disorders*, 30(8), 1026–1033.
<https://doi.org/10.1002/mds.26239>
- Hwang, O. (2013). Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Experimental Neurobiology*, 22(1), 11–17. <https://doi.org/10.5607/en.2013.22.1.11>
- Imène Achour , Anne-Marie Arel-Dubeau , Justine Renaud , Manon Legrand ,
Everaldo Attard ,Marc Germain and Maria-Grazia Martinoli *Int. J. Mol. Sci.*,
EISSN 1422-0067, Published by MDPI AG
<https://doi.org/10.3390/ijms17081293>
- Irwin, D. J., White, M. T., Toledo, J. B., Xie, S. X., Robinson, J. L., Van Deerlin,
V., ... Trojanowski, J. Q. (2012). Neuropathologic substrates of Parkinson
disease dementia. *Annals of Neurology*, 72(4), 587–598.
<https://doi.org/10.1002/ana.23659>
- Kalia, L. V., Kalia, S. K., McLean, P. J., Lozano, A. M., & Lang, A. E. (2013). A-
Synuclein Oligomers and Clinical Implications for Parkinson Disease.
Annals of Neurology, 73(2), 155–169. <https://doi.org/10.1002/ana.23746>
- Kontogianni, V.G.; Gerothanassis, I.P. Compuestos fenólicos y actividad
antioxidante de extractos de hoja de olivo. *Nat. Res.* 2012, 26, 186-189.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2011.582842>
- Lashuel, H. A., Overk, C. R., Oueslati, A., & Masliah, E. (2013). The many faces
of α -synuclein: From structure and toxicity to therapeutic target. *Nature
Reviews Neuroscience*, 14(1), 38–48. <https://doi.org/10.1038/nrn3406>
- Li, J., Jin, M., Wang, L., Qin, B., & Wang, K. (2017). MDS clinical diagnostic
criteria for Parkinson's disease in China. *Journal of Neurology*, 264(3),
476–481. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8370-2>
- Li, Y., Sun, L., Cai, T., Zhang, Y., Lv, S., Wang, Y., & Ye, L. (2010). α -Synuclein
overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y
neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*, 81(4–5), 428–433.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.11.007>
- Mohammad-Beigi et al. (2019). Oleuropein derivatives from olive fruit extracts
reduce α -synuclein fibrillation and oligomer toxicity. *Journal of biological
chemistry*, Brunetti, G. et.al <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.005723>

- Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., ... Edwards, R. H. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(23), 20710–20726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213538>
- Palazzi, L., Bruzzone, E., Bisello, G. et al. Oleuropein aglycone stabilizes the monomeric α -synuclein and favours the growth of non-toxic aggregates. *Sci Rep* 8, 8337 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26645-5>
- Peralbo-Molina, de Castro, M.D. Potencial de residuos de la agricultura mediterránea y de la industria agroalimentaria. *Tendencias Food Sci. Technol.* 2013, 32, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.007>
- Pfefferkorn, C. M., Jiang, Z., & Lee, J. C. (2012). Biophysics of α -synuclein membrane interactions. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1818(2), 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.032>
- Priyanka Borah, Airy Sanjeev, Venkata Satish Kumar (2019, October 25) Mattaparthi <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1728384>
- Reish, H. E. A., & Standaert, D. G. (2015). Role of α -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(1), 1–19. <https://doi.org/10.3233/JPD-140491>
- SB Jurado, MA Petruccelli (2005) Aplicaciones de la microscopía electrónica de transmisión en el diagnóstico microbiológico.
- Sch-gger, H. Tricine–SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1, 16–22 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Stefanis, L. (2012). α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009399>
- Thome, A. D., Standaert, D. G., & Harms, A. S. (2015). Fractalkine signaling regulates the inflammatory response in an α -synuclein model of Parkinson disease. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140566>

- Tsigelny, I. F., Sharikov, Y., Wrasidlo, W., Gonzalez, T., Desplats, P. A., Crews, L., ... Masliah, E. (2012). Role of α -synuclein penetration into the membrane in the mechanisms of oligomer pore formation. *FEBS Journal*, 279(6), 1000–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08489.x>
- Tsimidou, M.Z.; Papoti, V.T. *Ingredientes Bioactivos en Hojas de Olivo*; Elsevier Inc.: Amsterdam, Países Bajos, 2010 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00039-5>
- Uversky, V. N., & Eliezer, D. (2009). Biophysics of Parkinson's disease: structure and aggregation of α -synuclein. *Current protein & peptide science*, 10(5), 483.
- Venda, L. L., Cragg, S. J., Buchman, V. L., & Wade-Martins, R. (2010). α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends in Neurosciences*, 33(12), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.09.004>
- Virginia M.-Y. Lee, and John Q. Trojanowski. (2006). Mechanisms of Parkinson's Review Disease Linked to Pathological a-Synuclein: New Targets for Drug Discovery. *Neuron*, 52, 36-37. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.026>
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJ, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr*. 2002; 132:409-417.
- Weintraub, D., Koester, J., Potenza, M. N., Siderowf, A. D., Stacy, M., Voon, V., ... Lang, A. E. (2010). Impulse control disorders in Parkinson disease: A cross-sectional study of 3090 patients. *Archives of Neurology*, 67(5), 589–595. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.65>
- Winner, B., Regensburger, M., Schreglmann, S., Boyer, L., Prots, I., Rockenstein, E., ... Gage, F. H. (2012). Role of α -synuclein in adult neurogenesis and neuronal maturation in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 32(47), 16906–16916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2723-12.2012>

Winslow, A. R., & Rubinsztein, D. C. (2011). The Parkinson disease protein α -synuclein inhibits autophagy. *Autophagy*, 7(4), 429–431. <https://doi.org/10.4161/auto.7.4.14393>

Yasuda, T., & Mochizuki, H. (2010). The regulatory role of α -synuclein and parkin in neuronal cell apoptosis; Possible implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Apoptosis*, 15(11), 1312–1321. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-04>

ANEXOS

Anexo 1.

En este apartado se ha incluido una tabla resumen de los 5 artículos estudiados en este trabajo final de grado.

Titulo (referencia)	Objetivo	Tipo de muestra	Metodología	Resultados
<p>Oleuropein derivatives from olive fruit extracts reduce α-synuclein fibrillation and oligomer toxicity (https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.005723)</p>	<p>Búsqueda de compuestos naturales que inhiban la agregación de α-sinucleína y reduzca su tendencia a formar oligómeros tóxicos</p>	<p>Fruta del olivo, se usan 15 variedades de aceituna para identificar los compuestos que puedan inhibir la agregación y la toxicidad del oligómero aparte de tener un efecto antioxidante. La variedad con mejores resultados es la Koroneiki, la cual contiene extractos de oleuropeína aglicona y oleuropeína</p>	<p>-Se realiza un examen contra la agregación de α-sinucleína basado en ensayos de detección Tioflavin T (ThT). Para validar los datos que nos proporciona ThT se hace uso de las técnicas de Far-UV CD spectroscopy, SDS-PAGE y microscopia electrónica de transmisión. -Se hace uso de la filtración de gel para ver si la incubación de los extractos puede desagregar las fibrillas existentes. Se monitorea mediante absorción 215 nm para poder detectar la aparición de α-sinucleína soluble. -Determinación de si los extractos podrían afectar o no al alargamiento de las fibrillas existentes. Para ello se hicieron ensayos de agitación y no agitación. -Se evalúa la actividad antioxidante mediante el ensayo con 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH). -Se hace una separación e identificación de compuestos fenólicos de las fracciones más eficaces, usando el análisis LC-MS para separar e identificar los componentes principales de estas fracciones.</p>	<p>- Los 15 extractos que se usan son eficaces inhibiendo la agregación de α-sinucleína, pero se usaran los 7 mejores. El extracto de Koroneiki fue particularmente eficaz en la retención de la conformación desplegada de α-sinucleína, y su preeminencia en comparación con los otros extractos se hizo más evidente ya que la concentración de extracto se redujo a 0.15 y 0.1 mg/ml. -El efecto de los agregados solubles en todos los casos el nivel de monómeros no cambia lo que quiere decir que la mayoría de α-sinucleína no se perdía. -Las fibrillas existentes son desagregadas por el extracto de Koroneiki. -El extracto de Koroneiki fue el mejor inhibidor de la nucleación y el alargamiento en los ensayos de agitación y no agitación. Todos los extractos mostraron niveles de dosis-respuesta similares en este ensayo. - la mayor familia de compuestos consiste en oleuropeína y sus derivados. Las imágenes TEM de la α-sinucleína después de la incubación en presencia de oleuropeína confirman la ausencia de fibrillas.</p>

<p>Oleuropein aglycone stabilizes the monomeric α-synuclein ()and favours the growth of non-toxic aggregates (https://doi.org/10.1038/s41598-018-26645-5)</p>	<p>Investigar sobre una posible estrategia que consiste en el uso de moléculas pequeñas capaces de ralentizar el proceso de agregación de α-sinucleína</p>	<p>-Glucósido de oleuropeína comprado. -α-sinucleína</p>	<p>- Para preparar la muestra esta se desglucosiló mediante tratamiento con almendra de glicosidasa, la desglucosilacion de la oleuropeína se comprobó mediante análisis de espectrometría de masas y mediante el ensayo de la glucosa liberada en el sobrenadante. -Se expresó α-sinucleína en la línea celular <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) transfectada con el plasmido pER28b/syn. La proteína recombinante se purifico por RP-HPLC. La pureza del material, así como la identidad del mismo fueron evaluados por espectrometría de masas. - Para inducir la agregación de la α-sinucleína se filtró y se incubo una muestra con 70 proteínas, la agregación de estas se comprobaría con un ensayo de unión de ThT, microscopia electrónica de transmisión, proteólisis limitada, cromatografía de filtración de gel y fase inversa (RP-HPLC). Se hicieron experimentos para evaluar la interferencia de la oleuropeína aglicona añadiendo polifenoles a las muestras de proteína e incubando estas. -Se estudio el tamaño y la morfología de los agregados de α-sinucleína mediante microscopia electrónica de transmisión y dispersión dinámica de luz.</p>	<p>El efecto entre oleuropeína aglicona y α-sinucleína se evaluó mediante espectroscopia. La oleuropeína interfiere con la agregación de α-sinucleína en fibrillas amiloideas, cuando se incuban <i>in vitro</i> se agregan estas fibrillas y la formación de las mismas se ha visto retrasada, cuando están en presencia de oleuropeína aglicona en una proporción 1:3 α-sinucleína: oleuropeína, aun se distingue fibrillas en la muestra pero si se cambia a 1:10 la señal de fibrilación de α-sinucleína apenas incrementa, esto confirma que la oleuropeína aglicona interfiere con el proceso de agregación de la α-sinucleína.</p>
<p>Healthspan Maintenance and Prevention of Parkinson's-like Phenotypes with Hydroxytyrosol and Oleuropein Aglycone in <i>C. elegans</i> (https://doi.org/)</p>	<p>La investigación se centra en el estudio de los polifenoles del aceite de oliva y el efecto beneficioso que tienen sobre el envejecimiento y la</p>	<p>Oleuropeína aglicona del aceite de oliva virgen extra. <i>C. elegans</i> (caenorhabditis elegans) organismo invertebrado</p>	<p>La oleuropeína glucosada de desglucosida mediante tratamiento con almendra de glicosidasa Para producir la α-sinucleína humana en <i>C. elegans</i> se expone al pesticida retonona y así poder inducir la enfermedad de Parkinson en los modelos, se manifiesta en forma de movimiento deteriorado. En esta investigación se han realizado experimentos con <i>C. elegans</i> en los que mediante el uso de oleuropeína aglicona, se evaluó la resistencia al estrés por calor, para ello se probaron con distintas concentraciones de oleuropeína aglicona. Para evaluar cómo afecta la oleuropeína aglicona al Parkinson los modelos afectados por la retonona son tratados con este polifenol. La retonona es capaz de disminuir en un 80% la</p>	<p>Mediante la evaluación de la resistencia al estrés por calor la vida media aumento entre un 15% y un 22% al ser tratado con 250 μg/ml y 500 μg/ml de oleuropeína aglicona, con 30 μg/ml y 100 μg/ml no se observó beneficio. La oleuropeína aglicona fue capaz de inhibir parcialmente la disminución del movimiento inducido por la retonona en al menos un 42% En la cepa OW13 el tratamiento con oleuropeína aglicona mejoro un 27% el número de golpes/min en el día 3 y un 40% en el día 7</p>

10.3390/ijms21072588)	enfermedad de Parkinson mediante la estabilización del estado monomérico de la α -sinucleína		<p>capacidad de movimiento de <i>C. elegans</i>, esto se ve en la tasa de golpes del organismo, se redujo de 50 golpes/min a 10 golpes/min.</p> <p>Para comprobar el efecto anti-parkinson del polifenol, la actividad motora también se evaluó en las cepas transgénicas <i>C. elegans</i> OW13 y UA44, ambos modelos con sinucleopatías. La tasa de golpes se deterioró de unos 50 golpes/min a unos 35 y 23 golpes/min en gusanos jóvenes no tratados.</p> <p>La ventaja que tiene la cepa OW13 es el estado fluorescente amarillo de la α-sinucleína sintetizada por lo que la inhibición polifenólica se puede observar al microscopio electrónico, se van a observar los daños inducidos por la α-sinucleína y la acumulación de esta junto al tratamiento con los polifenoles.</p>	<p>Para la cepa UA44 aumento el índice de actividad, pero con cambios poco significativos</p> <p>Los resultados fueron mucho más notable en los nematodos que sufren de exposición a la retonona o expresión de α-sinucleína en las células musculares (cepa OW13).</p> <p>El tratamiento que se realizó sobre la cepa OW13 ante los daños producidos por la α-sinucleína observable al microscopio electrónico vio como la reducción de la acumulación de α-sinucleína fue de aproximadamente un 5% en el día 3 y un 8% en el 7 en grupos tratados con oleuropeína.</p>
Computational investigation on the effect of Oleuropein aglycone on the α -Synuclein aggregation (https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1728384)	Investigar el efecto que tiene la oleuropeína frente a la estabilización monomérica de la α -sinucleína mediante una simulación computacional	Estructura monomérica de α -sinucleína humana unida a micelas como molécula receptora para el acoplamiento molecular y oleuropeína como ligando	<p>Las muestras se obtuvieron de bases de datos como RCSB Protein Data Bank y PubChem.</p> <p>Para la preparación del complejo a la molécula receptora (α-sinucleína) se le acoplo el ligando oleuropeína usando Patchdock (un servidor en línea de unión de moléculas)</p> <p>Se prepararon sistemas complejos de α-sinucleína y α-sinucleína + oleuropeína usando AMBER ff99sBildn force Field</p>	<p>Los cambios conformacionales de la α-sinucleína en el complejo α-sinucleína + oleuropeína observados durante el periodo de simulación han demostrado como la estructura de α-sinucleína se estabiliza debido al plegamiento parcial, en el complejo se observa como el ligando oleuropeína se une a los residuos de sinucleína presentes en el dominio terminal.</p>

<p>Oleuropein Prevents Neuronal Death, Mitigates Mitochondrial Superoxide Production and Modulates Autophagy in a Dopaminergic Cellular Model (https://doi.org/10.3390/ijms17081293)</p>	<p>Investigar si la oleuropeína puede prevenir la degeneración neuronal en un modelo dopaminérgico celular de enfermedad de Parkinson e investigar la capacidad de oleuropeína de mitigar el estrés oxidativo</p>	<p>Se usaron células obtenidas de feocromocitoma de rata (células PC12)</p>	<p>Se realizaron mediciones de citotoxicidad, la cual se evaluó mediante un ensayo calorimétrico basado en la medición de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada de las células dañadas en el sobrenadante. La detección específica de la apoptosis de la desnaturalización del ADN se evaluó con el kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima (ELISA) de ADN Detección de anión de superperóxido mitocondrial, se usó para estimar la producción de aniones de superperóxido intracelular. Mediante la microscopia de inmunofluorescencia se consigue monitorear los procesos relacionados con la autofagia</p>	<p>La oleuropeína previene la muerte neuronal inducida por 6-OHDA, las células PC12 tratadas con 6-OHDA se evaluaron midiendo el índice de citotoxicidad que acompañado de la medición de niveles de desnaturalización de ADN se logra detectar la muerte neuronal. La oleuropeína mitiga la producción de especies reactivas de oxígeno, para ello se hace uso de la medición de anión superperóxido mitocondrial y se compara la intensidad de la fluorescencia. La oleuropeína modula la autofagia, para concluir esto se midió la formación de autófalos estos se pueden ver por inmunofluorescencia, las células con oleuropeína apenas sufren ninguna alteración.</p>
---	---	---	---	---

Anexo 1: Tabla resumen de los artículos estudiados (elaboración propia)