



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**ANÁLISIS DEL PAPEL PROTECTOR  
DEL HIDROXITIRO SOL Y LA  
OLEUROPEÍNA AGLICONA EN LOS  
PROCESOS DE AGREGACIÓN  
PATOLÓGICA DE LA ALFA-  
SINUCLEÍNA**

**Alumno: María Teresa García Tejada**

**Julio, 2021**



**UNIVERSIDAD  
DE JAÉN**



Trabajo Fin de Grado

# **ANÁLISIS DEL PAPEL PROTECTOR DEL HIDROXITIROSOLO Y LA OLEUROPEÍNA AGLICONA EN LOS PROCESOS DE AGREGACIÓN PATOLÓGICA DE LA ALFA- SINUCLÉINA**

**Alumno: María Teresa García Tejada**

**Jaén, Julio, 2021**

## ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	
<b>1.1. <math>\alpha</math>-syn: estructura, localización y función.....</b>	<b>2</b>
<i>1.1.1. Mal Plegamiento y agregación patológica de <math>\alpha</math>-syn .....</i>	<i>5</i>
<b>1.2. Papel de la <math>\alpha</math>-syn en la EP.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Papel protector de los polifenoles en la EP.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Técnicas experimentales para analizar la agregación y toxicidad de la <math>\alpha</math>-syn.....</b>	<b>15</b>
<i>1.4.1. Ensayo con Tioflavina T (ThT) .....</i>	<i>15</i>
<i>1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET) .....</i>	<i>17</i>
<i>1.4.3. Electroforesis (SDS-PAGE) y western blot.....</i>	<i>17</i>
<i>1.4.4. Ensayos de agregación y toxicidad in vivo.....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.4.1. Modelo experimental: Caenorhabditis elegans (C. elegans) .....</i>	<i>18</i>
<i>1.4.4.2. Ensayo de movilidad C.elegans.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.4.3. Ensayo de agregación de <math>\alpha</math>-syn en C. elegans.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.4.4. Ensayo de neurodegeneración en C.elegans utilizando la estirpe UA44.....</i>	<i>21</i>
<b>2. DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>3. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>4. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>26</b>

## **RESUMEN**

La enfermedad del Parkinson (EP), es una enfermedad neurodegenerativa causada principalmente por la falta de dopamina en el cerebro debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro. Aunque la etiología de la EP es probablemente multifactorial, la proteína  $\alpha$ -sinucleína (syn) se considera el biomarcador principal de la enfermedad y el proceso de agregación, el mecanismo por el que la  $\alpha$ -syn causa toxicidad y contribuye a la muerte neuronal sigue sin estar claro. Esta revisión discute la evidencia del papel neuropatológico de la  $\alpha$ -syn en la EP, así como el potencial neuroprotector de algunos polifenoles del olivo, como el Hidroxitirosol (HT) y la Oleuropeína Aglicona (OleA) en esta enfermedad. Mediante varios estudios a través de diferentes técnicas y modelos experimentales mostramos cómo estos polifenoles inhiben la formación de agregados de  $\alpha$ -syn y contribuyen a la desestabilización de su estructura patológica.

## **ABSTRACT**

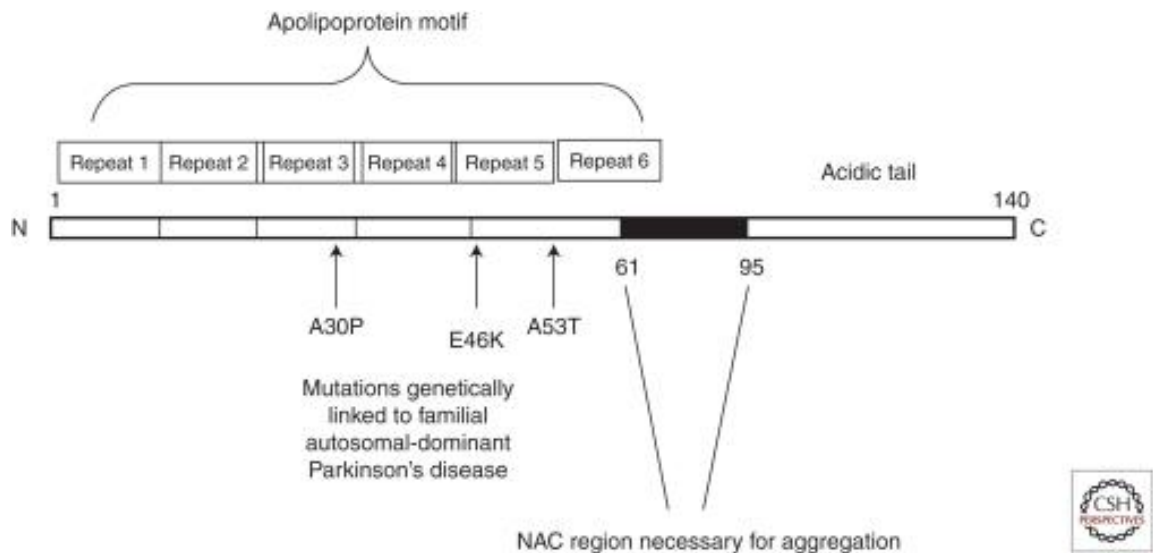
Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease caused mainly by the lack of dopamine in the brain due to the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the brain. Although the etiology of PD is likely multifactorial, the  $\alpha$ -syn protein is considered the primary biomarker of the disease and the aggregation process, the mechanism by which  $\alpha$ -syn causes toxicity and contributes to neuronal death remains unclear. This review discusses the evidence for the neuropathological role of  $\alpha$ -syn in PD, as well as the neuroprotective potential of some olive polyphenols, such as Hydroxytyrosol (HT) and Oleuropein Aglycone (OleA) in this disease. By means of several studies through different techniques and experimental models we show how these polyphenols inhibit the formation of  $\alpha$ -syn aggregates and contribute to the destabilization of their pathological structure.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. $\alpha$ -syn: estructura, localización y función.

La  $\alpha$ -syn es una proteína de 140 aminoácidos, con un peso molecular de 15kDa (Benskey et al., 2016; Heras-Garvin y Stefanova, 2020) que, junto con la  $\beta$  y la  $\gamma$ -sinucleína, pertenece a la familia de proteínas de las sinucleínas. La  $\alpha$ -syn está codificada por el gen SNCA, localizado en el brazo largo del cromosoma 4 en humanos (Benskey et al., 2016).

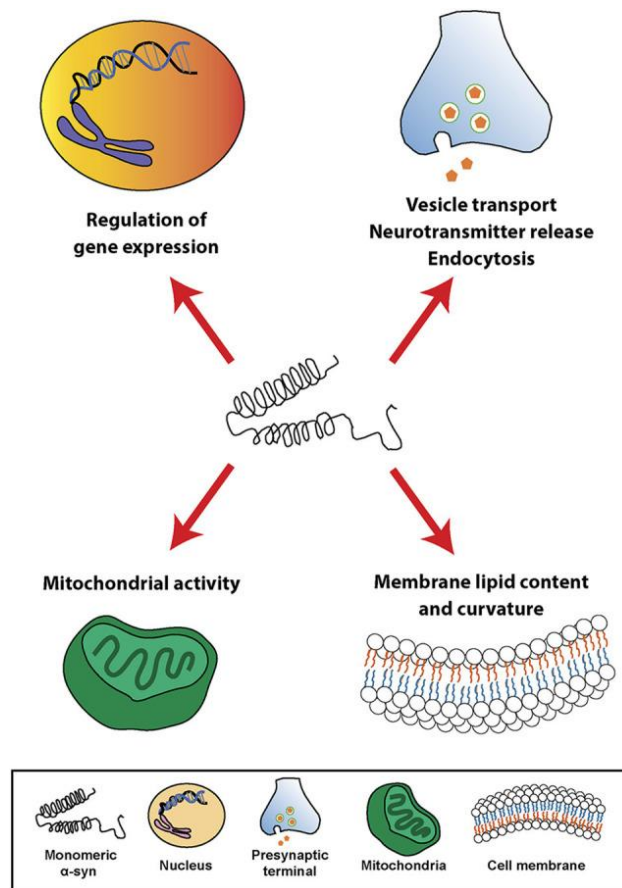
En cuanto a su estructura molecular, la secuencia peptídica de la  $\alpha$ -syn puede subdividirse en un extremo N-terminal básico (aminoácidos 1-60), un núcleo hidrofóbico central ("componente no amiloidogénico") (aminoácidos 61-95), y una cola C-terminal ácida (aminoácidos 96-140). El extremo N-terminal de la  $\alpha$ -syn se caracteriza por siete repeticiones de 11 aminoácidos que contienen una secuencia consenso KTKEGV, esta secuencia es similar a la de las apolipoproteínas y forma una hélice alfa anfipática con 3 vueltas, lo que predice una asociación de la  $\alpha$ -syn con la membrana lipídica (Benskey et al., 2016; Burré, 2015; Stefanis, 2012). La porción central de la  $\alpha$ -syn es altamente hidrofóbica y esto permite su oligomerización, ya que es el área donde se produce la agregación de la  $\alpha$ -syn. La primera asociación entre la  $\alpha$ -syn y la enfermedad siguió a la identificación de un fragmento de péptido dentro de placas aisladas del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Benskey et al., 2016). Este péptido escindido se encontró en el núcleo hidrofóbico central de  $\alpha$ -syn, dando lugar al componente no amiloidogénico, o región NAC, de la  $\alpha$ -syn. Finalmente, el dominio C-terminal de la  $\alpha$ -syn muestra la mayor variabilidad dentro de la familia de las sinucleínas y entre especies. El extremo C-terminal de la  $\alpha$ -syn contiene un gran número de residuos cargados, es muy ácido y está sujeto a una modificación traslacional significativa, lo que sugiere que esta región puede desempeñar un papel en la regulación de la función de la  $\alpha$ -syn y su conformación. Más allá de la regulación de la propia  $\alpha$ -syn, la cola C-terminal puede también tener un rol funcional en las interacciones mediadoras entre la  $\alpha$ -syn y el receptor de la proteína de fijación soluble de NSF (SNARE) (Benskey et al., 2016; Burré, 2015) (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Esquema de la estructura de  $\alpha$ -syn (Stefanis, 2012)

La  $\alpha$ -syn está principalmente asociada con el sistema nervioso central (SNC) y puede comprender hasta un 1% de la proteína citosólica total en este tejido (Stefanis, 2012). La  $\alpha$ -syn está considerada una proteína neuronal y se expresa en altas concentraciones en el terminal presináptico de tejidos neuronales, pero no dentro de las vesículas sinápticas (Benskey et al., 2016; Stefanis, 2012). A pesar de que el terminal sináptico esté enriquecido de esta proteína, ésta no se encuentra en todos los terminales sinápticos (Stefanis, 2012) y, de hecho, esta localización de la  $\alpha$ -syn no está clara, ya que carece de un dominio transmembrana. Aunque cabría esperar que la  $\alpha$ -syn dependa en gran medida de su extremo N-terminal anfipático para su interacción y localización de la membrana, ciertos estudios han demostrado que estas interacciones son bastante débiles y la mayoría de la proteína está en su forma soluble (Mehra et al., 2019).

En la actualidad, la función de la  $\alpha$ -syn no está definida pero hay varios procesos en los que podría estar implicada. Si hablamos de funciones fisiológicas, podemos decir que desempeña un papel esencial en el tráfico de vesículas sinápticas, el ensamblaje del complejo SNARE y participa en los mecanismos de regulación asociados al mantenimiento de la homeostasis sináptica, regulación del calcio, homeostasis mitocondrial, expresión génica, fosforilación de proteínas, o incluso la unión con ácidos grasos (Benskey et al., 2016 ; Mehra et al., 2019) (Figura 1.2).



**Figura1.2.**Resumen esquemático que incluye algunos de los procesos celulares fisiológicos de la  $\alpha$ -syn (Heras et al.,2020).

Hay varias teorías que apoyan que la  $\alpha$ -syn regula la cantidad de vesículas que se acoplan en la sinapsis durante la liberación de neurotransmisores y que por tanto participa en el tráfico de vesículas (Rocha et al., 2018).

En lo que respecta a la  $\alpha$ -syn en la neurotransmisión, se puede apreciar cómo una pérdida de la función de la  $\alpha$ -syn podría dar lugar a neurotoxicidad. La  $\alpha$ -syn actúa como un regulador negativo de la transmisión sináptica, interactúa con vesículas sinápticas y proteínas complejas SNARE, potencialmente mediando el tráfico vesicular y el acoplamiento con la membrana presináptica, así como la endocitosis vesicular. La expresión de  $\alpha$ -syn da lugar a una disminución en el tráfico y acoplamiento de vesículas sinápticas y a una disminución correspondiente en la liberación de neurotransmisores. La  $\alpha$ -syn también puede tener un papel especializado en la sinápsis dopaminérgica ya que interactúa con prácticamente todas las principales proteínas involucradas en la biosíntesis y manejo de las neuronas dopaminérgicas. Así, la  $\alpha$ -syn puede

actuar como un freno a la neurotransmisión dopaminérgica. Por ejemplo, después de la estimulación neuronal, la  $\alpha$ -syn se dispersa rápidamente desde el terminal presináptico, permitiendo el tráfico vesicular sin obstáculos y la exocitosis para la liberación eficiente de neurotransmisores. Al terminar la transmisión sináptica, la  $\alpha$ -syn repobla rápidamente el terminal presináptico actuando para impedir el tráfico y acoplamiento de vesículas sinápticas con la membrana presináptica, deteniendo así la transmisión química (Benskey et al., 2016).

Además, dentro del terminal dopaminérgico, la dispersión de la  $\alpha$ -syn desde el terminal presináptico durante el disparo neuronal desinhibiría la tirosina hidroxilasa (TH) y aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), permitiendo la síntesis de dopamina para reponerla para su liberación durante la transmisión sináptica. Finalmente, como la  $\alpha$ -syn repobla la terminal presináptica después de la terminación de la estimulación neuronal, podría aumentar la tasa de reciclaje de vesículas sinápticas a través de la endocitosis y también activar el transportador de dopamina y aumentar transportador de monoamina vesicular, permitiendo así un nivel continuo de señalización neuronal de alta fidelidad. Con  $\alpha$ -syn potencialmente realizando tantas funciones críticas dentro de la sinapsis dopaminérgica, es fácil imaginar cómo una pérdida de la función  $\alpha$ -syn podría resultar en neurotoxicidad (Benskey et al., 2016).

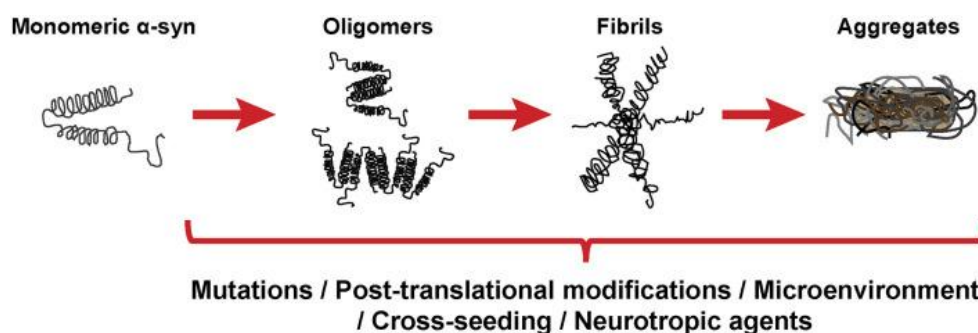
#### *1.1.1. Mal Plegamiento y agregación patológica de $\alpha$ -syn*

Las proteínas nativamente desplegadas o intrínsecamente desordenadas, son a veces consideradas como una única clase de proteínas caracterizadas por la ausencia de una estructura terciaria uniforme (Benskey et al., 2016). Un trabajo reciente ha sugerido que las proteínas nativamente desplegadas, como la  $\alpha$ -syn, necesita la presencia de interacciones moleculares asociadas con el fin de asumir una conformación terciaria específica (Benskey et al., 2016). La  $\alpha$ -syn es altamente soluble e intrínsecamente desordenada en condiciones normales. Sin embargo, en presencia de ácidos lipídicos en la membrana o membranas con mucha curvatura, el N-terminal del pliegue de la  $\alpha$ -syn en la hélice alfa interactúa con las membranas. Así parece como si la estructura de  $\alpha$ -syn pudiera ajustarse a su estructura fisiológica, y a sus funciones fisiológicas, solo en presencia de las moléculas que interactúan con ellas. La lista de sustancias



que pueden interactuar con la  $\alpha$ -syn es muy larga. La  $\alpha$ -syn interactúa directamente con las membranas lipídicas, vesículas sinápticas, proteínas complejas SNARE, proteínas implicadas en la homeostasis de la dopamina (DA), proteínas implicadas en la regulación del calcio y la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) entre una lista muy numerosa (Benskey et al., 2016; Stefanis, 2012).

Por otro lado, además de las interacciones con otras proteínas, la  $\alpha$ -syn también puede interactuar consigo misma y dar lugar a la formación de tetrámeros como estructura fisiológica (Benskey et al., 2016). Pero bajo determinadas condiciones como las modificaciones post-traduccionales, pH bajo, condiciones oxidativas, apilamiento de moléculas producido por altas concentraciones de macromoléculas que aumentan los niveles de la  $\alpha$ -syn y mutaciones genéticas, se favorece el mal plegamiento de la  $\alpha$ -syn, adquiriendo una estructura de lámina plegada  $\beta$  que conduce a la agregación (Villar-Piqué et al., 2016). Bajo tales condiciones, la formación de agregados insolubles se da muy rápido, siguiendo una cinética de primer orden. Estos oligómeros crecen y acaban formando fibrillas amiloides. Durante la agregación los oligómeros varían de tamaño, tipo, estructura y estabilidad, pasan de oligómeros a protofibrillas y posteriormente a fibrillas insolubles, que resultan ser la base de los cuerpos de Lewis maduros y neuritas de Lewis que se hallan en las sinucleinopatías (Mehra et al., 2019) (Figura 1.3). Se da mediante un mecanismo *feed-forward* en el que los oligómeros o protofibrillas pueden actuar como semillas que acelera la conversión de  $\alpha$ -syn fisiológica a patológica. Es difícil capturar esas estructuras intermedias en células o *in vivo* pero muchas, no todas, solamente las que son SDS-estables, se pueden detectar en SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes) (Benskey et al., 2016).



**Figura 1.3.**Proceso de agregación de  $\alpha$ -syn. Mal plegamiento de la proteína debido a varios factores que conllevan a la formación de agregados patológicos (Heras et al., 2020).

Teniendo en cuenta las condiciones que promueven la agregación como las mutaciones o las modificaciones post-traduccionales, en lo que a la fosforilación respecta, alrededor de un 4% de la  $\alpha$ -syn, en cerebros sanos, se encuentra fosforilada en el residuo de Serina-129 (Ser-129) y el 90% de la fosforilación en ser-129 se detecta en cerebros con EP que poseen cuerpos de Lewis y promueve la agregación oligomérica de la  $\alpha$ -syn. La fosforilación de la  $\alpha$ -syn está regulada por proteínas como la caseína quinasa, polo-like quinasa 2 o como la PP2A (Aryal et al., 2020).

Por otro lado, las mutaciones que se producen en la  $\alpha$ -syn se localizan en el extremo N-terminal y por tanto cabría esperar que esto afecte a las propiedades de unión de la membrana así como, a las interacciones electrostáticas de largo alcance con el extremo C-terminal que a su vez, puede producir una desestabilización del estado nativo desplegado de la proteína y formar un intermedio parcialmente plegado que aumente la probabilidad de autoensamblaje (Villar-Piqué et al., 2016). Las mutaciones en A53T, E46K y H50Q aceleran la fibrilación de la  $\alpha$ -syn, mientras que A30p, A53E y G51D retrasan la agregación, son más propensas a la oligomerización. El A53V también acelera la agregación de la  $\alpha$ -syn y promueve la oligomerización temprana. La sobreexpresión de la  $\alpha$ -syn mutada en las neuronas dopaminérgicas primarias provoca la muerte neuronal (Aryal et al., 2020; Villar-Piqué et al., 2016).

Por otro lado, la EP también está relacionada con la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo. Según Singh et al., la sobreexpresión de  $\alpha$ -syn en ratones provoca una disfunción mitocondrial, que puede conducir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y finalmente a la muerte celular. Una alta concentración  $\alpha$ -syn puede producir daños en los lisosomas y el aparato de golgi. Finalmente, la sobreexpresión de dicha proteína en modelos como *Drosophila* se asocia con la pérdida de neuronas dopaminérgicas, formación de inclusiones intracelulares y disfunción locomotora (Singh et al., 2017).

En conclusión, la transformación de la estructura desplegada nativa de la  $\alpha$ -syn soluble a fibrillas insolubles es lo que denominamos proceso de agregación, se da mediante un mecanismo *feed-forward*, y se puede considerar como la principal función patológica de la  $\alpha$ -syn (Benskey et al. 2016; Stefanis, 2012)

Por otra parte, Karpinar et al., en su estudio para validar el papel neurotóxico de los oligómeros de  $\alpha$ -syn de la EP *in vitro* e *in vivo*, observó los efectos de la  $\alpha$ -syn mutante, que muestran mayor tendencia a formar oligómeros frente a fibrillas, así como los defectos en el comportamiento que depende de la dopamina, en un modelo celular y modelos animal de la EP como *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* (Karpinar et al., 2018).

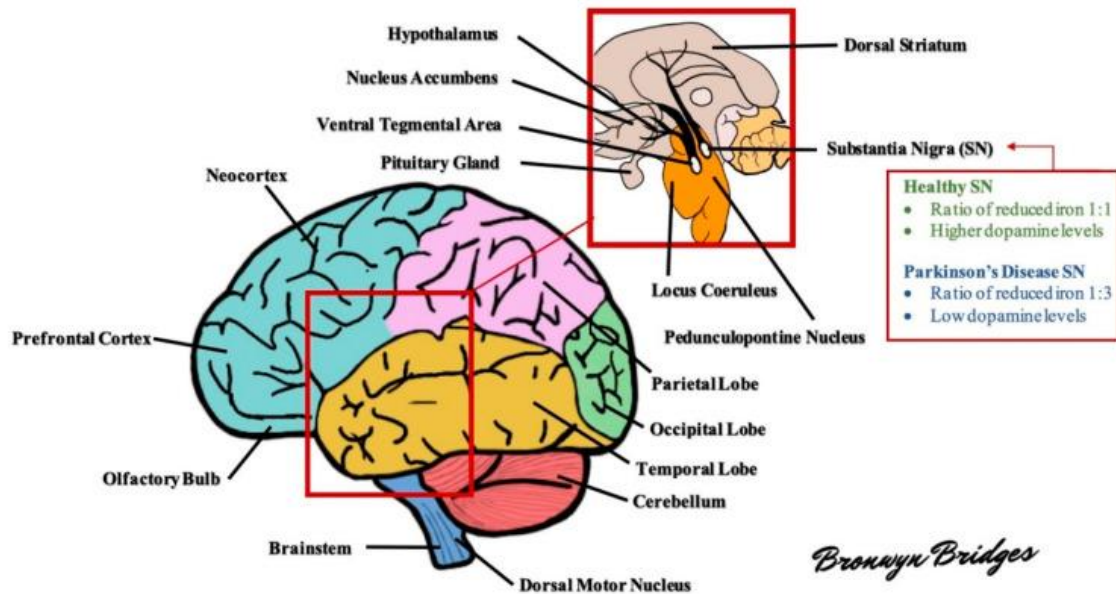
A pesar de que se han determinado los factores que favorecen la agregación de la  $\alpha$ -syn, aún no se ha encontrado cuáles son los mecanismos exactos que promueven la agregación. Puede que ese simple cambio de estructura de  $\alpha$ -syn de desplegada o parcialmente desplegada sea suficiente para la formación de agregados. Aunque las proteínas intrínsecamente desordenadas normalmente tienen secuencias primarias, que impiden la agregación y suelen poseer gran cantidad de residuos cargados, prolinas, y secciones hidrofóbicas no demasiado largas (Villar-Piqué et al., 2016). Además, podemos decir que la región NAC, que es la región más propensa a la agregación, está protegida debido a las cargas positivas y negativas de los extremos N- y C- terminal, puesto que impide que se dé la agregación y mantiene a la  $\alpha$ -syn en su estado monomérico. Estas interacciones de largo alcance se producen entre el C-terminal y la región NAC y entre los extremos N y C, probablemente debido a contactos hidrofóbicos y electrostáticos, y parecen impedir la agregación. Por tanto, si eliminamos el C-terminal será más propenso el proceso de agregación y tanto la inhibición del plegamiento de la  $\alpha$ -syn como la inducción de su plegamiento parcial, aumentan la exposición del núcleo amiloidogénico NAC de la  $\alpha$ -syn, proporcionando así una semilla para iniciar el proceso de agregación en *feed-forward* (Benskey et al., 2016; Villar-Piqué et al., 2016).

## 1.2. Papel de la $\alpha$ -syn en la EP

La EP es una enfermedad neurodegenerativa causada principalmente por la falta de dopamina en el cerebro (Emamzadeh y Surguchov, 2018). Clínicamente, la EP se caracteriza por síntomas motores, como la bradicinesia, el temblor en reposo y la rigidez, así como por síntomas no motores como la anosmia, el estreñimiento, el fallo autonómico, la depresión y la disfunción cognitiva (Atik et al., 2016). La dopamina es un neurotransmisor que interviene en el movimiento, memoria, motivación y otras funciones en el sistema nervioso. Así, la disminución de este neurotransmisor en el cerebro debido a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra*, causa tanto deficiencia motora como déficit cognitivo que son algunos de los síntomas observados en pacientes de la EP. Esta enfermedad tiene el inconveniente de no poder ser detectada en su fase inicial debido a la larga latencia entre el primer daño causado en las neuronas dopaminérgicas y los primeros síntomas que manifiesta la enfermedad. Luego, resulta de especial importancia el hecho de encontrar biomarcadores que nos permitan distinguir la EP de otras enfermedades, controlar el avance de ésta o encontrar una terapia efectiva. Entre los biomarcadores más comunes podemos destacar la  $\alpha$ -syn ya esté en su forma soluble, agregada o modificada postraduccionalmente (Emamzadeh y Surguchov, 2018). Los agregados de  $\alpha$ -syn mal plegada en el sistema nervioso central y periférico es una característica neuropatológica que abarca trastornos denominados sinucleinopatías y dentro de éstas, la EP es la más caracterizada. Dependiendo de en qué parte de la neurona se produzca la agregación de  $\alpha$ -syn dará lugar a un tipo de sinucleinopatía como insuficiencia autonómica pura, atrofia multisistémica (AMS), demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la EP (Coon y Singer, 2020).

La  $\alpha$ -syn se identificó como el principal componente de los cuerpos de Lewy y las neuritas de Lewy y se consideró como una de las características distintivas en la EP y DCL (Villar-Piqué et al., 2016). Ambas sinucleinopatías se caracterizan por un agregado de  $\alpha$ -syn dentro del soma y neuritas de las neuronas mientras que la MSA se caracteriza por la deposición de  $\alpha$ -syn principalmente dentro de células gliales mielinizantes (Benskey et al., 2016). En la EP las neuronas dopaminérgicas más afectadas son las de la *substantia*

*nigra pars compacta* en el cerebro medio que dan lugar a deficiencias motoras típicas de esta enfermedad (Figura 1.4). Sin embargo, en la DCL, los pacientes presentan la patología en la corteza, por lo que presentan demencia que es un síntoma de la enfermedad del Alzheimer. Por otro lado, en los pacientes con AMS, la  $\alpha$ -syn se acumula en el citosol de oligodendrocitos en inclusiones citoplasmáticas gliales (Villar-Piqué et al., 2016).



**Figura 1.4.** Diagrama esquemático del cerebro humano. Varias áreas del cerebro se ven afectadas en la EP. Pero la sustancia negra, parece ser la más afectada, muestra una profunda pérdida de neuronas dopaminérgicas y niveles alterados de hierro reducido, probablemente como resultado de un mayor estrés oxidativo en la EP (Aryal et al., 2020).

Por otra parte, a día de hoy no hay tratamientos efectivos para tratar la enfermedad pero, en cuanto a lo comentado anteriormente de que la disminución de la concentración de dopamina está relacionado con la EP, Ehringer y Hornykiewicz en 1960 hicieron los primeros ensayos con Levodopa en pacientes con la EP y años más tarde le concedieron el Premio Nobel de Medicina a Carlsson en 2000 (Jankovic, 2007). A día de hoy, la levodopa es uno de los fármacos más efectivos, se desarrolló como medio para restaurar los niveles de dopamina estriatal, mejorando tanto la calidad como la esperanza de vida de los pacientes con EP. Con el paso de los años los científicos han ido mejorando su tolerabilidad y eficacia al combinarla con un inhibidor de la dopa-descarboxilasa. La levodopa es la terapia oral más eficaz

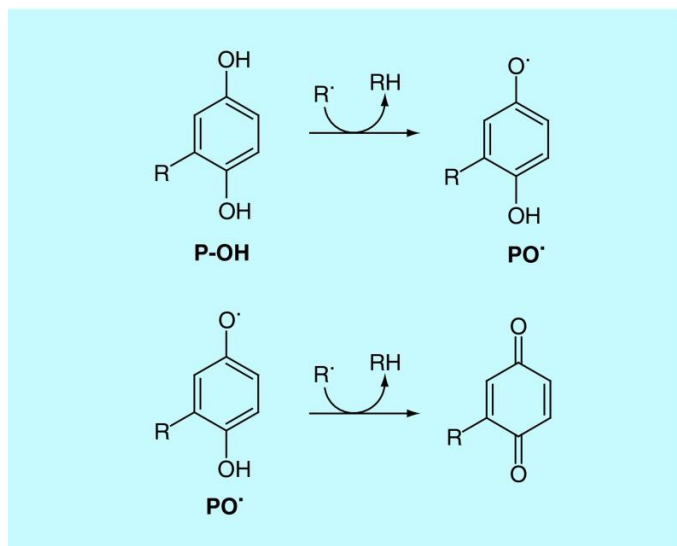
para el tratamiento sintomático de las características motoras de la EP, pero el gran inconveniente de este fármaco es la capacidad de inducir complicaciones motoras como la discinesia, junto con los síntomas motores y no motores de la EP. Aún así, se siguen buscando otras terapias para tratar esta enfermedad (Schapira et al., 2009).

### **1.3. Papel protector de los polifenoles en la EP.**

Los polifenoles son moléculas que se pueden encontrar en frutas, verduras y otros tipos de alimentos como el vino, el té y las especias y por tanto presentan alta disponibilidad en la dieta (Dhouafli et al., 2018). Se trata de metabolitos secundarios sintetizados por plantas, hongos y microorganismos que están involucrados en las respuestas de defensa frente a factores de estrés y la radiación UV. La presencia de éstos influye en las características organolépticas de los alimentos y en la planta se van a distribuir en mayor o menor cantidad dependiendo de la especie, los tejidos, los órganos y la etapa de desarrollo. Según las estructuras químicas de las agliconas, se pueden clasificar en flavonoides y no flavonoides (Dhouafli et al., 2018).

Como se ha comentado anteriormente, la agregación y el depósito de la  $\alpha$ -syn son las principales características patológicas en la EP, en la demencia con cuerpos de Lewy y en otras  $\alpha$ -sinucleinopatías (Ono et al., 2020). Aunque hay tratamientos para mejorar los síntomas que la EP ocasiona, no existen terapias que disminuyan la progresión de esta enfermedad (Di Rosa et al., 2020). Asumiendo que la toxicidad aparece con la forma agregada de  $\alpha$ -syn, los dos aspectos principales que deberían tratarse para obtener un tratamiento efectivo contra la EP serían la utilización de compuestos antiagregantes y de compuestos que desestabilicen los agregados ya formados (Singh et al., 2017). Durante estos últimos años, se ha comprobado que numerosos compuestos fenólicos tienen esas propiedades. Esto parece deberse a que su estructura es adecuada para unir de manera específica los monómeros de  $\alpha$ -syn y seguidamente inhibir la polimerización de estos monómeros en fibrillas, aunque también podrían unirse directamente a las fibrillas ya preformadas y desestabilizarlas (Aryal et al., 2020; Ono et al., 2020). Asimismo, debido a la

gran propiedad antioxidante que poseen los polifenoles, muchos de estos compuestos pueden neutralizar los radicales libres a través de la abstracción de átomos de hidrógeno como se muestra en la figura.1.5 (Singh et al., 2017).



**Figura 1.5.** Mecanismo de la capacidad de los polifenoles de eliminar los radicales libres. POH indica polifenoles, PO· y R· representan radicales libres. El radical libre PO puede además reaccionar con un segundo radical que da lugar a la formación de una estructura estable de quinona, como se muestra en el segundo paso. (Singh et al., 2017).

Actualmente hay muchos estudios epidemiológicos y clínicos que destacan cómo la dieta mediterránea (DM) influye en la salud y mejora el proceso de envejecimiento, que se relaciona a su vez con la neurodegeneración dado que, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o Parkinson suelen aparecer con la edad (Brunetti et al., 2020). La DM se caracteriza por el consumo del aceite de oliva Virgen Extra (AOVE) que aporta efectos beneficiosos sobre la salud debido a las propiedades que proporcionan los polifenoles, entre los que destacan sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotectores, neuroprotectivos, anticancerígenos, antidiabéticos, antisteatóticos y antimicrobianos entre otros (Di Rosa et al., 2020; Karkovic et al., 2019).

Numerosos estudios han demostrado el papel de diversos compuestos fenólicos naturales para inhibir la agregación de proteínas amiloides en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el PD, enfermedades priónicas, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y diabetes de tipo 2.

Concretamente los que mejores resultados han demostrado son la apigenin, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), fisetin, kaempferol, morín, miricetina, quercetin, curcumina, ácido gálico, isoquinolinas, orceína, reveratrol y ácido tánico que ofrecen efectos beneficiosos (Dhouafli et al., 2018). Entre los polifenoles más relevantes del AOVE, la oleuropeina aglicona (OleA) y su principal metabolito, el hidroxitirosol (HT) han demostrado su capacidad protectora en enfermedades como:

- Las enfermedades cardiovasculares (ECV), en las que tienen un importante papel el endotelio cardiovascular puesto que es uno de los objetivos de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardíacas (hipertensión, hiperglucemia, hiperlipidemia, inflamación, envejecimiento), y su daño es uno de los primeros pasos en el desarrollo de la ECV. La característica clave que comparten los factores de riesgo de ECV es el aumento de ROS; a su vez, la producción de ROS por parte de las mitocondrias del endotelio contribuye significativamente a la enfermedad cardíaca. La cardioprotección que ofrecen los polifenoles del olivo se ha visto respaldada por estudios que demuestran su capacidad para mejorar la oxidación de las grasas y optimizar el metabolismo energético (Rigacci y Stefani, 2016).

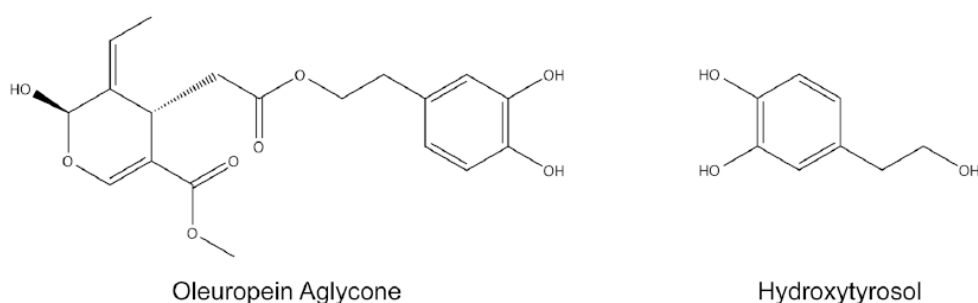
- El cáncer, sobre el que varias investigaciones han demostrado que pueden impedir directa o indirectamente la transformación neoplásica debido a xenobióticos y factores cancerígenos contribuyendo así a reducir el riesgo de desarrollar cáncer. La carcinogénesis se caracteriza por un cambio en la actividad transcripcional de muchos genes y, así pues, en la función biológica de las proteínas codificadas por esos genes también confirmaron su potencial anticancerígeno sobre la proliferación y la muerte celular de varios tipos de cáncer (osteosarcoma, neuroblastoma, cáncer de mama). Estas propiedades anticancerígenas del AOVE parecen estar relacionadas con la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en él, que como hemos visto anteriormente, son capaces de eliminar los radicales libres y ROS (Gorzinyck-Debicka et al., 2018).

Aunque, hasta hace pocos años, no se había investigado su gran potencial en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o la EP, hoy en día está



siendo objeto de estudio. En la EP, estos compuestos actúan ante la pérdida de neuronas dopaminérgicas que se asocian a diferentes causas, incluyendo la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, neuroinflamación y acumulación anormal de proteínas entre otras posibles causas. En esta revisión nos hemos centrado en el estudio del papel protector de ambos compuestos en la agregación de la  $\alpha$ -syn principalmente, aunque también actúan sobre ROS o reduciendo los niveles de citoquinas proinflamatorias (Angeloni et al., 2017)

El HT es un compuesto fenólico no flavonoide con fuertes propiedades antioxidantes, que se encuentra junto a la OleA, en hojas de olivos, donde su concentración depende de varias variables incluido el cultivo del olivo, como el tiempo de cosecha de la fruta, proceso de la fruta y condiciones de almacenamiento del aceite. El HT es también uno de los productos finales del metabolismo de la dopamina *in vivo* y un metabolito de OleA. (Brunetti et al., 2020; Palazzi et al., 2020) (Figura 1.6). En cuanto a sus propiedades, el HT posee importantes acciones antiinflamatorias y atenúa la expresión de  $\text{TNF}\alpha$  e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), que son citoquinas proinflamatorias que se observan a menudo en las enfermedades inflamatorias (Cicerale et al., 2012).



**Figura 1.6..** Estructura química la OleA y de su metabolito HT (Palazzi et al.,2020)

La OleA es un glucósido secoiridoide fenólico que consiste en: un polifenol, que sería el HT, un secoiridoide llamado ácido enólico y una molécula de glucosa. Es uno de los componentes bioactivos más abundantes que contiene las hojas de olivo y el contenido de esta depende del clima, de la madurez de la aceituna en la cosecha y del sistema de proceso empleado (Hassen et al., 2014). Ejerce una potente actividad antioxidante que es ampliamente reconocida y revisada en la literatura (KarkovicMarkovic et al., 2019), debida a la presencia de grupos

hidroxilo, en particular la fracción de 1,2-dihidroxibenceno, capaces de evitar la oxidación donando los hidrógenos (Hassen et al., 2014).

Además de la OleA y el HT, los compuestos oleocantal y tirosol (TYR), otros polifenoles presentes en el AOVE, han demostrado poseer una potente actividad contra varias cepas de bacterias responsables de infecciones intestinales y respiratorias *in vitro*. Sin embargo, también se ha comprobado que también actúan contra las bacterias beneficiosas, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum*, por lo que en este caso estaría ocasionando un efecto perjudicial para la salud (Cicerale et al., 2012).

#### 1.4. Técnicas experimentales para analizar la agregación y toxicidad de la $\alpha$ -syn.

##### 1.4.1. Ensayo con Tioflavina T (ThT).

La ThT es un colorante de benzotiazol obtenido por la metilación de la deshidrotiotoluidina con metanol en presencia de ácido sulfúrico o ácido clorhídrico (Malmos et al., 2017) Está formada por un anillo de benzotiazol dimetilado conectado a otro anillo de bencildimetilamino a través de un único enlace C-C (a), permitiendo que los dos anillos giren entre sí, además poseen carga positiva en el anillo de benzotiazol (b), el grupo terciario dimetilamino en el anillo bencílico (c) y el carbono reactivo en el anillo de benzotiazol que se conecta al anillo bencílico (d) (figura 1.7) (Malmos et al., 2017).

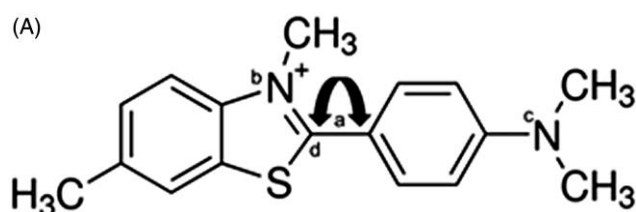
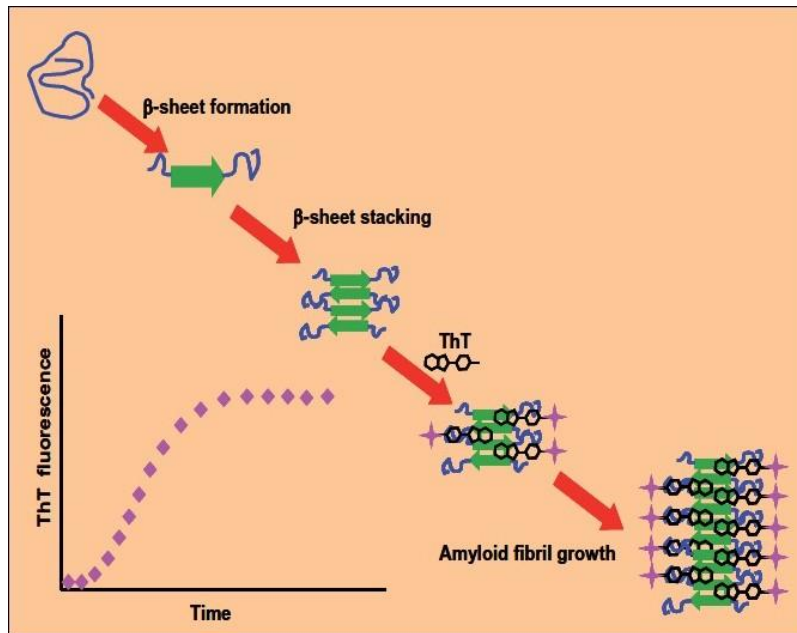


Figura 1.7. Molécula de ThT (Malmos et al., 2017)

El ensayo con ThT es una de las técnicas más utilizadas para determinar la formación de fibrillas amiloides, así como para analizar sus estructuras

(Sulastskava et al., 2018). Consiste en añadir ThT a la  $\alpha$ -syn *in vitro*, normalmente purificada previamente, y cuando ésta se une a la lámina  $\beta$  que adquiere la  $\alpha$ -syn cuando forma amiloides, cambia sus características espectrales, de manera que aumenta la intensidad de fluorescencia a medida que se van formando los agregados (Hornedo-Ortega et al., 2018; Sulastskava et al., 2018). A través de esta técnica, y utilizando un espectrómetro de fluorescencia con máximos de excitación y emisión en torno a 440 y 490 nm, respectivamente, podemos observar cómo se produce la agregación y observar la cinética de este proceso en tiempo real. Dado que la ThT y las fibrillas amiloides interaccionan estequiométricamente, la fluorescencia del complejo amiloide-ThT nos da una información muy precisa de la formación de fibrillas amiloides en función de la longitud de onda y el número de fibrillas amiloides (Hudson et al., 2009). La unión entre ThT y las fibrillas amiloides es sumamente específica, ni los agregados amorfos ni las proteínas solubles aunque estén en estado plegado, desplegado o parcialmente plegado aumentan la fluorescencia (Malmos et al., 2017). El mecanismo de interacción entre ThT y la lámina  $\beta$  de las fibrillas amiloides es aún desconocido, pero la teoría más aceptada y según algunos autores, la ThT se une a las fibrillas amiloides de forma que sus ejes largos son paralelos, proponiendo que la unión se produce en "canales" que recorren la longitud de la lámina  $\beta$  (figura 1.8) (Krebs et al., 2005). Las interacciones estéricas entre las moléculas de colorante y las cadenas laterales indican por qué la ThT emite una fluorescencia más intensa cuando se une a las fibrillas amiloides y pueden explicar por qué esta interacción con las fibrillas amiloides es específica (Hawe et al., 2007; Krebs et al., 2005).



**Figura 1.8.** Representación esquemática del principio del ensayo basado en la fluorescencia ThT para el seguimiento del ensamblaje de las estructuras de lámina  $\beta$  asociadas al crecimiento de las fibrillas amiloides (Jones et al., 2010)

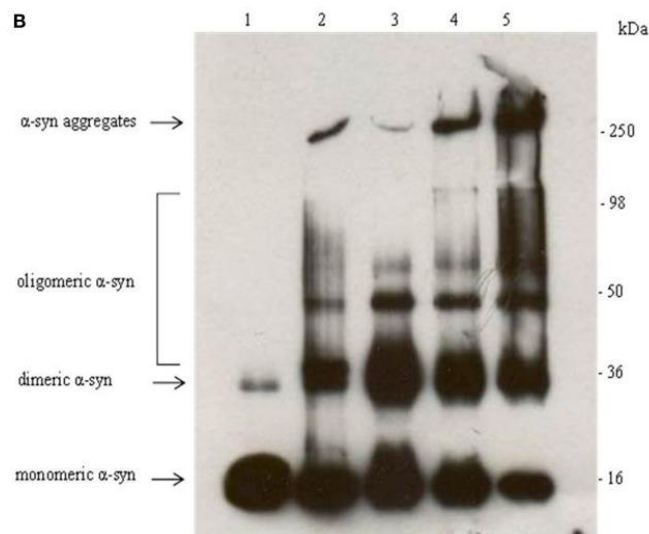
#### 1.4.2. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La MET es una técnica de imagen de alta resolución que nos permite identificar y catalogar los agregados, entre los que podemos incluir protofibrillas, fibrillas amiloides o agregados amorfos. En cambio, los métodos utilizados para cuantificar la producción de fibrillas, como la unión de ThT, la dispersión de la luz, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y la espectroscopia de dicroísmo circular, no pueden distinguir entre los distintos tipos de especies ricas en láminas  $\beta$ . Las imágenes que podemos observar mediante MET no proporcionan información cuantitativa sobre la cinética de agregación o sobre las concentraciones de las fibrillas observadas. Además, es posible que no se detecten las especies raras o los agregados que no se adhieren a las rejillas de la MET. Por lo tanto, la MET puede confirmar la presencia de un tipo concreto de agregados (Anderson et al., 2011).

#### 1.4.3. Electroforesis (SDS-PAGE) y western blot

La SDS-PAGE permite diferenciar entre monómeros, oligómeros y otros agregados de  $\alpha$ -syn a través del peso molecular. El peso molecular de los monómeros oscila entre 14,5 y 24 KDa, el de los dímeros en torno a 36KDa, de

36 a 98KDa podemos encontrar las formas oligoméricas mientras que a partir de 250KDa los agregados (Hornedo-Ortega et al., 2018). Una vez separadas estas proteínas mediante SDS-PAGE se realiza el *western blot*, se transfieren a membranas de celulosa y se bloquean. Se incuban estas membranas con un anticuerpo primario anti $\alpha$ -syn que reconoce a la  $\alpha$ -syn humana después con un anticuerpo secundario, y el revelado de la membrana hace que se observen las bandas de  $\alpha$ -syn (Ardah et al., 2014). Esta técnica permite identificar las bandas correspondientes a los oligómeros en relación a la  $\alpha$ -syn monomérica. Se utiliza mucho para estudios de compuestos que inhiban la agregación (Hornedo-Ortega et al., 2018; Palazzi et al., 2020). En la Figura 1.9 podemos observar como en la primera columna, la  $\alpha$ -syn recién incubada, no presenta bandas de agregados en comparación con la segunda columna que se trata de una  $\alpha$ -syn envejecida. Además, se observa que la concentración de agregados aumentan crecientemente en la columna 3, 4 y 5 al disminuir la cantidad del compuesto inhibidor (Ardah et al., 2014)



**Figura 1.9.** SDS-PAGE y *Western Blot* para observar la presencia de agregados de  $\alpha$ -syn y los efectos inhibitorios de formación de estos agregados que ofrecen algunos compuestos (Ardah et al., 2014).

#### 1.4.4. Ensayos de agregación y toxicidad *in vivo*

##### 1.4.4.1. Modelo experimental: *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*).

El nematodo *C. elegans* es un organismo con una estructura muy simple que además presenta varios tejidos y órganos similares a los de otros animales superiores, como músculos, sistema nervioso, una epidermis, tracto gastrointestinal y gónadas. Asimismo, aproximadamente la mitad del genoma humano que codifica proteínas posee ortólogos conocidos en esta especie (Brunetti et al., 2020). Por todo ello, *C. elegans* constituye un modelo óptimo para estudiar los efectos neuroprotectores de diversos compuestos así como para investigar los mecanismos que dan lugar a la neurodegeneración. Esto último se debe también a que *C. elegans* se caracteriza por tener un sistema nervioso muy simple y de fácil acceso, posee un corto tiempo de generación de aproximadamente 3 días, una vida útil de sólo unos 20 días y el cuerpo transparente durante toda su vida (Brunetti et al., 2020; Chen et al., 2015; Di Rosa et al., 2020). Para estudiar el progreso de la EP o los efectos que esta produce podemos diferenciar entre dos tipos de aproximaciones:

1) Inducción de los síntomas de la EP mediante el tratamiento con neurotoxinas como la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la rotenona y el paraquat (Chia et al., 2020).

2) Utilización de modelos transgénicos mediante la manipulación genética de genes relacionados con la EP, como la  $\alpha$ -syn, la quinasa 2 rica en leucina (LRRK2), la quinasa 1 inducida por Pten (PINK1), la Parkina (PRKN) y la proteína deglicasa (DJ-1) (Chia et al., 2020).

En este segundo caso, se dispone de numerosas cepas transgénicas y mutantes relacionadas con enfermedades neurodegenerativas en los nematodos como la cepa OW13 y UA44 que expresan la  $\alpha$ -syn humana en células musculares y en neuronas dopaminérgicas respectivamente (Brunetti et al., 2020; Di Rosa et al., 2020).

La acumulación de  $\alpha$ -syn en las neuronas dopaminérgicas causa neurodegeneración en la cepa transgénica UA44. Además, la GFP ligada al transportador de dopamina en las células nerviosas dopaminérgicas permite visualizar la cantidad y calidad de las seis neuronas dopaminérgicas anteriores

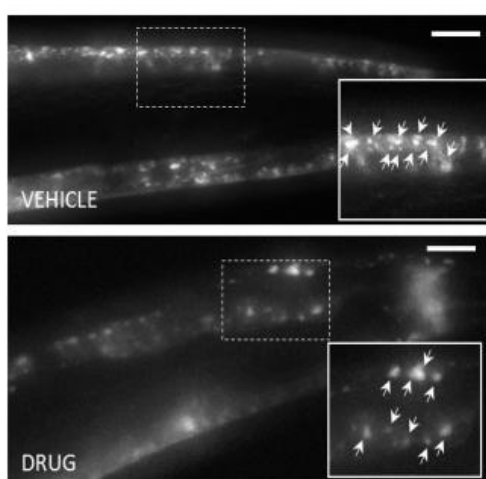
y dos posteriores dopaminérgicas tras el daño inducido por la  $\alpha$ -syn (Brunetti et al., 2020).

#### 1.4.4.2. Ensayo de movilidad en *C. elegans*.

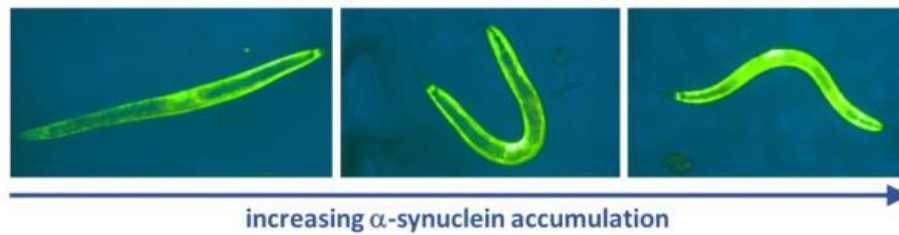
Tanto en el modelo con neurotoxinas como en las estirpes transgénicas OW13 y NL5901 en las que la  $\alpha$ -syn se expresa en células musculares, podemos medir los parámetros de motilidad de los nematodos a diferentes días de edad adulta y observar como disminuyen los movimientos por minuto, el numero de ondas del cuerpo y el índice de actividad en estas cepas (Brunetti et al., 2020).

#### 1.4.4.3. Ensayo de agregación de $\alpha$ -syn en *C. elegans*.

En las estirpes donde se sobreexpresa  $\alpha$ -syn humana unida a YFP en las células musculares como OW13 y NL5901, se puede observar y cuantificar la cantidad de agregados en las células musculares con la edad, debido a que *C. elegans* es transparente por naturaleza y al unirse a la proteína YFP le otorga características fluorescentes. Normalmente se suele observar mediante microscopía de fluorescencia (García-Moreno et al., 2019). (Figura 1.9.). En dicho ensayo, podemos contar el número de agregados o inclusiones fluorescentes una región de la cabeza del nematodo (figura 1.10) (Pujols et al., 2018) o también cuantificar la fluorescencia total (figura 1.11) (Di Rosa et al., 2020)



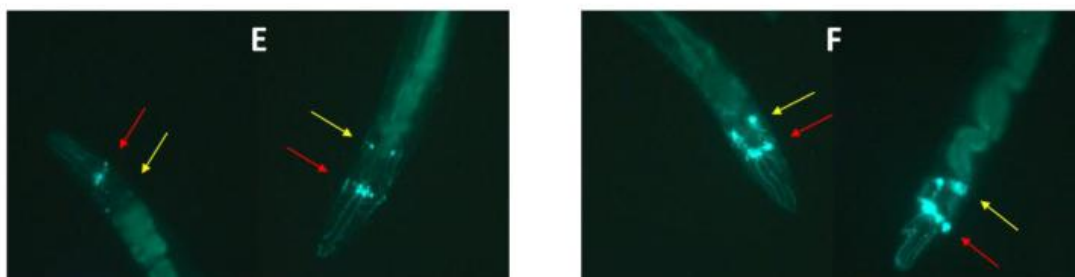
**Figura 1.10.** Mediante cuatificación de agregados , vemos en la primera imagen como hay un mayor número de agregados frente a la segunda imagen en la que han disminuido debido a la presencia de compuestos antiagregantes.



**Figura 1.11.** La microscopía de fluorescencia muestra un incremento de ésta en el nematodo al aumentar la cantidad de agregados (Di Rosa et al., 2020).

#### 1.4.4.4. Ensayo de neurodegeneración en *C. elegans* utilizando la estirpe UA44.

La estirpe transgénica UA44 expresa la  $\alpha$ -syn unida a GFP únicamente en sus ocho neuronas dopaminérgicas. Gracias a esta proteína fluorescente, podemos observar en los gusanos los procesos neuronales dopaminérgicos que ocurren en las 6 neuronas de la cabeza y las dos de la cola (Chen et al., 2015). En concreto, la expresión de  $\alpha$ -syn humana en estas neuronas provoca una degeneración progresiva de las mismas con la edad, que puede observarse fácilmente mediante microscopía de fluorescencia (García-Moreno et al., 2019) (Figura 1.12.).



**Figura 1.12.** Neurodegeneración en la estirpe UA44 de *C. elegans*. Disminución de la intensidad debido a la degeneración de las neuronas en la imagen E en comparación con las neuronas de los nematodos de la imagen F que presentan una apariencia neuronal intacta (Di Rosa et al., 2020)

## 2. DISCUSIÓN.

La agregación de la  $\alpha$ -syn ejerce un papel muy importante en el desarrollo de la EP. A partir de su descubrimiento e identificación como la proteína más abundante de los cuerpos de Lewis, ha demostrado su importancia en



numerosos procesos celulares. Por tanto, las estrategias que hay hoy en día para modificar y mitigar la patología en la EP resultan prometedoras (Pujols et al., 2018).

En la actualidad, los tratamientos disponibles para tratar la EP solamente mejoran los síntomas producidos por la enfermedad sin abordar los factores patogénicos que la causan (Singh et al., 2017). Por tanto, resulta de gran interés la identificación de nuevos agentes que inhiban la agregación y la toxicidad de la  $\alpha$ -syn y en este caso, las moléculas pequeñas, como los compuestos fenólicos, son algunas de las más estudiadas en los últimos años (Hornedo-Ortega et al., 2018)

#### Efectos del tratamiento con HT y OleA sobre la agregación de $\alpha$ -syn *in vitro*

Al investigar el efecto neuroprotector de los polifenoles del aceite de oliva como el ácido hidroxifenilacético (HPAA) el TRY y el HT, en la EP, autores como Hornedo-Ortega et al., observaron que únicamente mostró efectos notables el HT que, incluso a bajas concentraciones, consigue inhibir la agregación de la  $\alpha$ -syn *in vitro*. Sin embargo, para que el HT desestabilice las fibrillas ya formadas es necesaria una mayor concentración (Hornedo-Ortega et al., 2018). Al igual que Hornedo-Ortega et al., autores como Palazzi et al., observaron que el HT a diferentes proporciones de  $\alpha$ -syn/HT como 1:0,5; 1:1; 1:2; 1:4, es también capaz de inhibirla agregación en  $\alpha$ -syn *in vitro*. Además, estos autores mediante MET observaron la formación de especies oligoméricas no tóxicas inducidas por la presencia de HT bajo condiciones en las que se produce la agregación. La abundancia de esta especie parecía depender del tiempo de incubación y de la concentración de los polifenoles y no evolucionaba a fibrillas (Palazzi et al., 2018, 2020). En cuanto al otro compuesto principal del AOVE como es la OleA, existen estudios que demuestran su potencial inhibidor sobre la fibrilación de las proteínas propensas a la agregación. Así, al tratar la  $\alpha$ -syn recombinante con OleA según las proporciones 1:3 - 1:10 de  $\alpha$ -syn/OleA observaron una disminución de la intensidad en el ensayo con ThT y por tanto una disminución de los agregados, dando mejores resultados a mayor concentración de OleA (Palazzi et al., 2018). Además, la OleA redujo la toxicidad de los agregados de  $\alpha$ -syn al interferir en la unión de los

componentes de la membrana celular (Mohammad-Beigi et al., 2018). Estos mismos resultados también se obtuvieron al tratar los agregados del péptido  $\beta$  amiloide (componente principal de las placas seniles en la enfermedad del Alzheimer) y tau con OleA, ofreciendo un fuerte efecto neuroprotector en la enfermedad del Alzheimer (Hassen et al., 2014). Otros autores hicieron un estudio más profundo, basándose en el conocimiento de la dinámica conformacional del monómero de  $\alpha$ -syn en presencia de OleA y a partir del análisis de trayectorias de dinámica molecular. Mediante estos análisis, observaron que cuando OleA se une a la  $\alpha$ -syn, la distancia intramolecular entre el dominio NAC y el dominio C-terminal de la  $\alpha$ -syn se incrementó, mientras que las interacciones hidrofóbicas de largo alcance entre ambas regiones se redujeron. Además, descubrieron que la aglicona de oleuropeína interactuaba con el dominio N-terminal de la  $\alpha$ -syn, haciendo que esta región no estuviera disponible para la interacción con las membranas y los lípidos para la formación de agregados tóxicos celulares. De modo que resulta evidente el efecto inhibitorio de agregados (Borah et al., 2021). Una vez que establecieron que OleA interfiere con la agregación de  $\alpha$ -syn y que además produce agregados no tóxicos, analizaron el efecto de OleA en las fibrillas preformadas y vieron cómo, al igual que HT, los agregados disminuían empleando OleA ya que el compuesto puede interactuar con los residuos hidrofóbicos de la lámina  $\beta$  causando la disgregación de las fibrillas amiloides formadas (Palazzi et al., 2018). Por otra parte, dependiendo de la variedad de aceituna, ya sea Koroneiki, Arbequina y Picual, la OleA tendrá un mayor o menor efecto inhibitorio. Así, al comparar 15 variedades de aceituna, el extracto fenólico de la variedad Koroneiki fue el que presentó el mejor efecto inhibitorio de fibrillas y dentro de esta variedad de aceituna, la OleA, la aglicona de oleuropeína hidroxilada y la oleuropeína fueron los principales compuestos responsables de la inhibición. No obstante, en este estudio fue la OleA la que presentó un mayor potencial para inhibir la agregación (Mohammad-Beigi et al., 2018).

La EP también influye en la inflamación de los tejidos relacionada con la agregación patológica de la  $\alpha$ -syn en el cerebro. En este sentido, autores como Gallardo-Fernández observaron cómo en células B12 de la microglía incubadas con LPS y  $\alpha$ -syn recombinante, el tratamiento con HT consiguió reducir los

niveles de expresión de mediadores proinflamatorios inducidos por  $\alpha$ -syn (Gallardo-Fernández et al., 2019).

### Efectos del tratamiento con HT y OleA sobre la agregación y toxicidad de la $\alpha$ -syn *in vivo*

En cuanto a estudios en modelos de EP en *C. elegans*, se ha descrito que el deterioro en los parámetros de movimiento en la cepa OW13 mejora tras el tratamiento de los nematodos con HT, sobretodo en la edad adulta (Brunetti et al., 2020; Di Rosa et al., 2020). Por otra parte, también en modelos de *C. elegans*, estudiaron la capacidad de resistencia al estrés térmico y observaron que el HT muestra un efecto beneficioso sobre la supervivencia de los nematodos en estirpes silvestres (Brunetti et al., 2020). Continuando con los modelos *in vivo*, tanto la estirpe OW13 como la estirpe NL5901, que también expresa la  $\alpha$ -syn en células musculares, se usaron para estudiar el efecto de HT y TYR en la agregación de  $\alpha$ -syn obteniéndose como resultado una disminución de la intensidad de fluorescencia, lo que se asoció a una disminución de la acumulación de la  $\alpha$ -syn en las células musculares del nematodo, siendo el efecto más potente en la edad adulta (Brunetti et al., 2020; Di Rosa et al., 2020; García-Moreno et al., 2019). De este modo, vemos una relación con los estudios comentados anteriormente sobre la  $\alpha$ -syn *in vitro*, en los que el HT también disminuía la formación de agregados (Brunetti et al., 2020; Di Rosa et al., 2020; García-Moreno et al., 2019). Aunque en el estudio realizado por Hornedo-Ortega et al., no se obtenían resultados significativos al tratar con TYR la  $\alpha$ -syn *in vitro* a concentraciones crecientes (25, 50, 100 y 200  $\mu$ M) García-Moreno et al., si observaron una disminución de agregados de  $\alpha$ -syn en su estudio *in vivo* al tratar con TYR la estirpe NL590 de *C. elegans* (García-Moreno et al., 2019). En lo que respecta al otro polifenol más comentado en esta discusión, en la cepa OW13 se observó una reducción en el número de agregados al incubarla con una concentración mayor de OleA (500  $\mu$ g/ml) y sobre todo en la edad adulta (Brunetti et al., 2020) y estos mismos resultados también se obtuvieron en estudios *in vitro* (Palazzi et al., 2018). En la misma cepa, el tratamiento con OleA también mejoró los parámetros de movimiento, aunque los resultados más notables en este sentido se obtuvieron

con HT (Brunetti et al., 2020). Por otro lado, ambos compuestos demostraron disminuir la neurodegeneración de las neuronas dopaminérgicas en la cepa UA44 (Brunetti et al., 2020; Di Rosa et al., 2020). Para observar el efecto protector frente a la neurodegeneración de este compuesto, trataron la cepa UA44 con dichos polifenoles y observaron un retraso en el deterioro de las neuronas dopaminérgicas que expresan selectivamente la  $\alpha$ -syn humana (Brunetti et al., 2020; Di Rosa et al., 2020). A pesar de que estos dos compuestos parecen ser los más estudiados y los que mejores resultados muestran, también hay otros tales como la Cur, bicaléina, EGCG y reveratrol, que han demostrado inhibir la formación de agregados de  $\alpha$ -syn y desestabilizar las fibrillas de  $\alpha$ -syn (Ono et al., 2020).

#### Mecanismos de acción del HT y OleA sobre la agregación de la $\alpha$ -syn

En cuanto al mecanismo mediante el cual los compuestos fenólicos tienen la capacidad para inhibir y desestabilizar agregados de  $\alpha$ -syn, aún no está claro, aunque diversos estudios lo han correlacionado con el número de grupos hidroxilos presentes en un solo grupo fenilo (Singh et al., 2017). Además, la estructura tridimensional afecta en gran medida a la unión con los monómeros de  $\alpha$ -syn y/o a las fibrillas en actividad antiagregante y desestabilizadora de fibrillas. La estructura que poseen los polifenoles resulta ser la indicada para unir los monómeros de  $\alpha$ -syn y seguidamente inhibir la polimerización de péptidos en fibrillas o para unir las fibrillas ya preformadas de  $\alpha$ -syn y desestabilizar la conformación rica en láminas  $\beta$  característica de la agregación patológica (Ono et al., 2020). Además, se ha descrito que los compuestos fenólicos con grupos hidroxilo en dos posiciones consecutivas son inhibidores de  $\alpha$ -syn más potentes en comparación con los que tienen grupos hidroxilo en posiciones no consecutivas (Hornedo-Ortega et al., 2018). Aunque en cuanto al número de -OH son similares, Los estudios realizados con HT presentan mejores resultados en comparación con la OleA. De hecho, como el HT es la fracción fenólica activa y el principal metabolito de OleA *in vivo*, se puede reconocer que es el principal responsable de los efectos beneficiosos que produce la OleA (Palazzi et al., 2020).

### 3. CONCLUSIÓN.

Los polifenoles del olivo han demostrado tener un efecto neuroprotector al inhibir la agregación de proteínas amiloides o desestabilizar su estructura patológica tanto *in vitro* como *in vivo*. Por este motivo, incluir en nuestra dieta el consumo de AOVE, rico en HT y OleA podría contribuir a disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como la EP u otras sinucleinopatías o, en caso de padecer la enfermedad, retrasar la progresión de los síntomas. No obstante, es necesario seguir investigando estos efectos en modelos animales y mediante ensayos nutricionales para establecer las dosis adecuadas que permitan el uso de estos compuestos como potenciales nutracéuticos.

### 4. BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, V.L. y WEBB, W.W. (2011): "Transmission electron microscopy characterization of fluorescently labelled amyloid  $\beta$  1-40 and  $\alpha$ -synuclein aggregates", *BMC Biotechnol*, 11, pp. 125
- ANGELONI, C., MALAGUTI, M., BARBALACE, M.C. y HRELIA, S. (2017): "Bioactivity of Olive Oil Phenols in Neuroprotection", *Int J Mol Sci*, 18(11), pp. 2230.
- ARDAH, M.T., PALEOLOGOU, K.E., LV, L., ABUL KHAIR S.B., KAZIM, A.S., MINHAS, S.T., AL-TEL, T.H., AL-HAYANI, A.A., HAQUE, M.E., ELIEZER, D. y EL-AGNAF, M.A. (2014): "Structure activity relationship of phenolic acid inhibitors of  $\alpha$ -synuclein fibril formation and toxicity", *Front Aging Neurosci*, 6, pp. 197.
- ARYAL, S., SKINNER, T., BRIDGES, B. y WEBER, J.T. (2020): "The Pathology of Parkinson's Disease and Potential Benefit of Dietary Polyphenols", *Molecules*, 25(19), pp. 4382
- ATIK, A., STEWART, T. y ZHANG, J. (2016): "Alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease", *Brain Pathol*, 26(3), pp. 410-418
- BENSKEY, M.J., PEREZ R.G. y MANFREDSSON, F.P. (2016): "The contribution of alpha-synuclein to neuronal survival and function – Implications for Parkinson's disease", *J Neurochem*, 137(3), pp. 331-359.

- BORAH, P., SANJEEV, A. y MATTAPARTHI, V.S.K. (2021): “Computational investigation on the effect of Oleuropein aglycone on the  $\alpha$ -synuclein aggregation”, *J Biomol Struct Dyn*, 39(4), pp. 1259-1270
- BRUNETTI, G., DI ROSA, G., SCUTO, M., LERI, M., STEFANI, M., SCHMITZ-LINNEWEBER, C., CALABRESE, V. y SAUL, N. (2020): “Healthspan Maintenance and Prevention of Parkinson’s-like Phenotypes with Hydroxytyrosol and Oleuropein Aglycone in *C. elegans*”, *Int J Mol Sci*, 21(7), pp. 2588.
- BURRÉ, J. (2015): “The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein”, *J Parkinsons Dis.*, 5(4), pp. 699-713.
- CHEN, X., BARCLAY, J.W., BURGOYNE, R.D. y MORGAN, A. (2015): “Using *C. elegans* to discover therapeutic compounds for ageing-associated neurodegenerative disease”, *Int J Mol Sci*, 9, pp. 65
- CHIA S J, TAN E y CHAO Y. (2020): “Historical Perspective: Models of Parkinson’s Disease”, *Int J Mol Sci*, 21(7), pp. 2464.
- CICERALE, S., LUCAS, L.J. y KEAST, R.S.J. (2012): “Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil”, *Curr Opin Biotechnol*, 23(2), pp. 129-135.
- COON, E.A. y SINGER W. (2020): “Synucleinopathies”, *Continuum (Minneap Minn)*, 26(1), pp. 72-92.
- DHOUAFI, Z., CUANALO-CONTRERAS, K., HAYOUNI, E.A., MAYS, C.E., SOTO, C. y MORENO-GONZALEZ, I. (2018): “Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds”, *Cell Mol Life Sci*, 75(19), pp. 3521-3538.
- DI ROSA, G., BRUNETTI, G., SCUTO, M., SALINARO, A., CALABRESE, E.J., CREA, R., SCHMITZ-LINNEWEBER, C., CALABRESE, V. y SAUL, N. (2020): “Healthspan Enhancement by Olive Polyphenols in *C. elegans* Wild Type and Parkinson’s Models”, *Int J Mol Sci*, 21(11), pp. 3893.
- EMAMZADEH, F.N. y SURGUCHOV. (2018): “Parkinson’s Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors”, *Front Neurosci*, 12, pp.612.
- GALLARDO-FERNÁNDEZ, M., HORNEDO-ORTEGA, R., ALONSO-BELLIDO, I.M., RODRÍGUEZ-GÓMEZ, J.A., TRONCOSO, A.M., GARCÍA-PARRILLA, M.C. y VENERO, J.L., ESPINOSA-OLIVA, A.M. y PABLOS,

- R.M. (2019): "Hydroxytyrosol Decreases LPS-and  $\alpha$ -Synuclein-Induced Microglial Activation in Vitro", *Antioxidants (Basel)*, 9(1), pp. 36.
- GARCÍA-MORENO, J.C., PORTA DE LA RIVA, M., MARTÍNEZ-LARA, E., SILES, E. y CAÑUELO, A. (2019): "Tyrosol, a simple phenol from EVOO, targets multiple pathogenic mechanism of neurodegeneration in a *C. elegans* model of Parkinson's disease", *Neurobiol Aging*, 82, pp. 60-68.
  - GORZYNIK-DEBICKA, M., PRZYCHODZEN, P., CAPPELLO, F., KUBAN-JANKOWSKA, A., MARINO GAMMAZZA, A., KNAP, N., WOZNIAK, M. y GORSKA-PONIKOWSKA, M. (2018): "Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols", *Int J Mol Sci*, 19(3), pp. 686.
  - HASSEN, I., CASABIANCA, H. y HOSNI, K. (2014): "Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation", *Journal of Functional Foods*, 18, pp. 926-940.
  - HAWE, A., SUTTER, M. y JISKOOT, W. (2007): "Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization", *Pharm Res*, 25(7), pp. 1487-1499.
  - HERAS-GARVIN, A. y STEFANOVA N. (2020): "From Synaptic Protein to Prion: The Long and Controversial Journey of  $\alpha$ -synuclein", *Front Synaptic Neurosci*, 12, pp. 584536.
  - HORNEDO-ORTEGA, R., CEREZO, A.B., TRONCOSO, A.M. y GARCIA-PARRILLA, M.C. (2018): "Protective effects of hydroxytyrosol against  $\alpha$ -synuclein toxicity on PC 12 cells and fibril formation", *FoodChemToxicol*, 120, pp. 41-49.
  - HUDSON, S.A, ECROYD, H., KEE, T.W. y CARVER J.A. (2009): "The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds" *FEBS J.*, 276(20), pp, 5960-5972.
  - JANKOVIC, J. (2007): "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis" *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79(4), pp. 368-376.
  - JONES, L.N., SINCLAIR, R.D., CARVER, J., ECROYD, H., LUI, Y. y BENNETT, L.E. (2010): "Bioprospecting Keratinous Materials", *Int J Trichology*, 2(1), pp. 47-49.
  - KARKOVIC MARKOVIC, A., TORIC, J., BARBARIC, M. y BRALA JAKOBUSIC, C. (2019): "Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health", *Molecules*, 24(10), pp. 2001.

- KARPINAR, D.P., BALIJA, M.B., KUGLER, S., OPAZO, F., REZAEI-GHALEH, N., WENDER, N., KIM, H.Y., TASCHENBERGER, G., FALKENBURGER, B.H., HEISE, H., KUMAR, A., RIEDEL, D., FICHTNER, L., VOIGT, A., BRAUS, G.H., GILLER, K., BECKER, S., HERZIG, A., BALDUS, M., JACKLE, H., EIMER, S., SCHULZ, J.B., GRIESINGER, C. y ZWECKSTETTER, M. (2009): “Pre-fibrillar  $\alpha$ -synuclein variants with impaired  $\beta$ -structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models”, *EMBO J*, 28 (20) 3256–3268.
- KREBS, M.R., BROMLEY, E.H. y DONALD, A.M. (2005): “The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications”, *J Struct Biol*, 149(1), pp. 30-37.
- KUJAWSKA, M. y JODYNIS-LIEBERT, J. (2018): “Polyphenols in Parkinson's Disease: A Systematic Review of In Vivo Studies”, *Nutrients*, 10(5), pp. 642.
- LÜCKING, C.B. y BRICE, A. (2000): “Alpha-synuclein and Parkinson's disease”, *Cell Mol Life Sci*, 57(13-14), pp. 1894-1908.
- MALMOS, K.G, BLANCAS-MEJIA, L.M., WEBER, B., BUCHNNER, J., RAMIREZ-ALVARADO, M., NAIKI, H. y OTZEN, D. (2017): “ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation”, *Amyloid*, 24(1), pp. 1-16.
- MEHRA, S., SAHAY, S. y MAJI, S.K. (2019): “ $\alpha$ -synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis”, *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1867(10), pp. 890-908.
- MOHAMMAD-BEIGI, H., ALIAKBARI, F., SAHIN, C., LOMAX, C., TAWFIKE, A., SCHAFFER, N.P., AMIRI-NOWDIJEH, A., ESKANDARI, H., MAX MØLLER, I., HOSSEINI-MAZINANI, M., CHRISTIANSEN, G., WARD, J.L., MORSHEDI, D. y OTZEN, D.E. (2018): “Oleuropein derivatives from olive fruit extracts reduce  $\alpha$ -synuclein fibrillation and oligomer toxicity”, *J Biol Chem*, 294(11), pp. 4215-4232.
- ONO, K., TSUJI, M., YAMASAKI, T.R. y PASINETTI, G.M. (2020). “Anti-aggregation Effects of Phenolic Compounds on  $\alpha$ -synuclein”, *Molecules*, 25(10), pp. 2444.



- PALAZZI, L., BRUZZONE, E., BISELLO, G., LERI, M., STEFANI, M., BUCCIANTINI, M. y POLVERINO DE LAURETO, P. (2018): "Oleuropein aglycone stabilizes the monomeric  $\alpha$ -synuclein and favours the rowth of non-toxic aggregates", *Sci Rep*, 8(1), 8337.
- PALAZZI, L., LERI, M., CESARO, S., STEFANI, M., BUCCIANTINI, M. y POLVERINO DE LAURETO, P. (2020): "Insight into the molecular mechanism underlying the inhibition of alpha-synuclein aggregation by hydroxytyrosol", *Biochem Pharmacol*, 173, pp. 113722.
- PEYROL, J., RIVA, C. y AMIOT M.J. (2017): "Hydroxy tyrosol in the Prevention of the Metabolic Syndrome and Related Disorders", *Nutrients*, 9(3), pp. 306.
- PUJOLS, J., PEÑA-DÍAZ, S., LÁZARO, D.F., PECCATI, F., PINHEIRO, F., GONZÁLEZ, D., CARIJA, A., NAVARRO, S., CONDE-GIMÉNEZ, M., GARCÍA, J., GUARDIOLA, S., GIRALT, E., SALVATELLA, X., SANCHO, J., SODUPE, M., FLEMING OUTEIRO, T., DALFÓ, E. y VENTURA, S. (2018): "Small molecule inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregation disrupts amyloid fibrils, and prevents degeneration of dopaminergic neurons", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(41), pp. 10486.
- RIGACCI, S y STEFANI M. (2016): "Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animals Models to Humans", *Int J Mol Sci*, 17(6), pp. 843.
- ROCHA E.M., DE MIRANDA, B.y SANDERS, L.H. (2018): "Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease", *Neurobiol Dis*, 109 (Pt B), pp. 249-257.
- SAHAY, S., GHOSH, D., SINGH, P.K., MAJI, S.K. (2017): "Alteration of structure and aggregation of  $\alpha$ -synuclein by familial Parkinson's Disease Associated Muttations", *Curr Protein Pept Sci*, 18(7), 656-676.
- SCHAPIRA, A.H.V., EMRE, M., JENNER, P. y POEWE, W. (2009): "Levodopa in the treatment of Parkinson's disease", *Eur J Neurol*, 16(9), pp. 982-989.
- SINGH, S.K., DUTTA, A. y MODI, G. (2017): " $\alpha$ -Synuclein aggregation modulation: an emerging approach for the treatment of Parkinson's disease" *Future Med Chem*, 9(10), pp. 1039-1053.

- STEFANIS, L. (2012): “ $\alpha$ -Synuclein in Parkinson’s Disease”, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(2)
- SULASTSKAYA, A.I., RODINA, N.P., SULASTSKY, M.I., PAVAROVA, O.I., ANTIFEEVA, I.A., KUZNETSOVA I.M. y TUROVEROV, K.K. (2018): “Investigation of  $\alpha$ -Synuclein Amyloid Fibrils Using the Fluorescent Probe Thioflavin T”, *Int J Mol Sci*, 19(9), pp. 2486.
- VILLAR-PIQUÉ A, LOPES DA FONSECA T AND TIAGO FLEMING OUTERIRO. (2016.): “Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies”, *J Neurochem*, 139 Suppl 1, pp. 240-255.