



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Compuestos fenólicos
como inhibidores
amiloides en
enfermedades
neurodegenerativas.
Mecanismos de acción**

Alumno: María del Carmen Méndez Delgado

Junio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Compuestos fenólicos como inhibidores amiloides en enfermedades neurodegenerativas. Mecanismos de acción

Alumno: María del Carmen Méndez Delgado

Junio, 2019

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Enfermedades neurodegenerativas	3
1.1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	4
1.1.2. Enfermedad de Parkinson.....	8
1.2. Compuestos fenólicos como inhibidores amiloides	11
1.2.1. Apigenina	15
1.2.2. Quercetina	16
1.2.3. Curcumina.....	16
1.2.4. Resveratrol.....	17
1.3. Técnicas experimentales.....	18
1.3.1. Dicroísmo circular	18
1.3.2. Microscopía electrónica	21
1.3.3. Ensayos con Tioflavina T	23
1.3.4. Microscopía de fuerza atómica	24
1.3.5. Western Blot	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1. Apigenina	30
3.2. Quercetina.....	30
3.3. Curcumina	31
3.4. Resveratrol.....	32
4. CONCLUSIÓN.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	34

RESUMEN / ABSTRACT

Las enfermedades neurodegenerativas representan uno de los problemas médicos más importantes a nivel mundial debido al gran número de personas afectadas y a la poca información que se tiene respecto a su posible tratamiento o cura. Por tanto, las investigaciones recientes se han centrado en la búsqueda de compuestos naturales que ayuden a reducir los síntomas o retrasar su aparición. Diversos compuestos fenólicos, más concretamente los polifenoles, se postulan como candidatos idóneos para tratar este tipo de enfermedades.

En este trabajo de revisión bibliográfica, el objetivo principal es conocer los efectos *in vitro* e *in vivo* que tienen determinados polifenoles en la agregación amiloide específica en las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, los mecanismos de acción que subyacen a dichos efectos y las técnicas experimentales más utilizadas para estudiarlos.

Los resultados obtenidos de los polifenoles seleccionados han demostrado, en general, reducir la agregación de las proteínas que causan estas enfermedades neurodegenerativas además de tener numerosos efectos beneficiosos para la salud.

Neurodegenerative diseases constitute one of the most important medical problems worldwide because of the large number of affected people and the lack of information about their potential treatments or cure. Therefore, recent researches have focused on the search for natural compounds that may reduce symptoms or delay their onset. Diverse phenolic compounds, more specifically polyphenols, qualify as perfect candidates to treat this type of diseases.

The main aim in this revision work, was to ascertain the *in vitro* and *in vivo* effects of certain polyphenols in amyloid aggregation present in Alzheimer's and Parkinson's diseases, the mechanisms of action underlying these effects and the most frequently used experimental techniques to study them.

In general, results of selected polyphenols show significant effects in reducing the aggregation of proteins that cause these neurodegenerative diseases in addition to other beneficial effects for health.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades neurodegenerativas

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en todo el mundo, alrededor de 50 millones de personas tienen demencia y, cada año, hay casi 10 millones de casos nuevos. Se espera que el número total de personas con demencia aumente a 82 millones en 2030 y a 152 millones en 2050. Entre ellas, la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) son las más comunes y de gran preocupación, ya que son crónicas y progresivas y afectan a una parte significativa de la población de edad avanzada (Hornedo-Ortega et al., 2018).

Estas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disfunción selectiva y por la pérdida de neuronas asociada con trastornos del plegamiento de proteínas o proteinopatías que consisten en un plegamiento de proteínas alternativo que conduce a la formación, deposición y acumulación de agregados tóxicos mal plegados. Cada tipo de agregado es generalmente específico para una enfermedad, ya sea que ocurra en el sistema nervioso central (SNC) o en la periferia (G. Kovacs, 2016; Dhouafli et al., 2018). Para la EA los agregados específicos son los de la proteína beta amiloide ($A\beta$) y la proteína tau y para la EP la proteína alfa-sinucleína (α -syn).

La agregación de estas proteínas, aunque dan lugar a distintas enfermedades, siguen el mismo modelo cinético de siembra-nucleación, desde la formación de una especie intermedia soluble hasta la generación de protofibrillas y la posterior acumulación de agregados fibrilares insolubles que tienen en común una estructura rica en láminas β , insolubilidad en solventes fuertes y detergentes, resistencia a la proteasa y la capacidad de unirse a colorantes específicos de amiloide (rojo del Congo y tioflavina). La acumulación de estas proteínas causa disfunción celular y daño tisular que conduce a la aparición de los síntomas clínicos en pacientes a través de la inducción de inflamación, estrés oxidativo y muerte celular (Dhouafli et al., 2018).

1.1.1. Enfermedad de Alzheimer

La EA ha sido objeto de numerosos estudios en las últimas dos décadas. Los experimentos con animales han ayudado a comprender los mecanismos por los cuales se produce esta enfermedad (Duyckaerts et al., 2009).

Los síntomas característicos son la reducción de la memoria (para la nueva información), los trastornos de la memoria (de la información ya conocida) y la desorientación de la propia persona, así como el tiempo, el lugar y la situación. Además de estos síntomas, se pueden incluir cambios en la personalidad y en el estado de ánimo, síntomas físicos como la pérdida de peso o aumento del tono muscular y trastornos de funciones cognitivas específicas como las habilidades motoras y la percepción (Yilmaz, 2015)

Se puede deber a tres tipos de lesiones: las relacionadas con la acumulación, que son fáciles de detectar y representan la base del diagnóstico, aquellas debidas a pérdidas de neuronas y de sinapsis: difíciles de determinar y las que se deben a procesos reactivos como la inflamación (Duyckaerts et al., 2009).

Lesiones debidas a acumulación

Las lesiones por acumulación se deben a la deposición del péptido A β y la agregación de la proteína tau. Estas dos proteínas son constituyentes normales de las células pero en la EA adoptan una estructura fibrilar atípica que la hace poco soluble en disolución acuosa.

La deposición de péptidos A β está relacionada con un desequilibrio entre su producción y su eliminación. El péptido A β se escinde de su precursor, la proteína precursora amiloide (APP), que es una proteína transmembrana, mediante dos actividades enzimáticas secuenciales: la β -secretasa que escinde el APP en su dominio extracelular y deja un fragmento llamado C99 que se vuelve a escindir por el complejo transmembrana de gamma-secretasa que incluye presenilina (Duyckaerts et al., 2009). Los depósitos comprenden una mezcla de diferentes isoformas de A β , algunas pueden empezar en el aminoácido 3 o terminar en el 42. Ésta última tiene dos aminoácidos

adicionales en el carbono terminal del péptido, es más hidrófoba y tiende a precipitar en disolución acuosa (Duyckaerts et al., 2009; Liu et al., 2006).

Se han desarrollado muchos anticuerpos anti-A β . Utilizados como reactivos inmunohistoquímicos, han revelado diferentes aspectos de la patología. Algunos de ellos interactúan con los últimos aminoácidos ubicados en el C-terminal del péptido y permiten distinguir las isoformas A β 40 y A β 42, otros no reaccionan con las isoformas N-truncadas (Fig.1) (Duyckaerts et al., 2009).

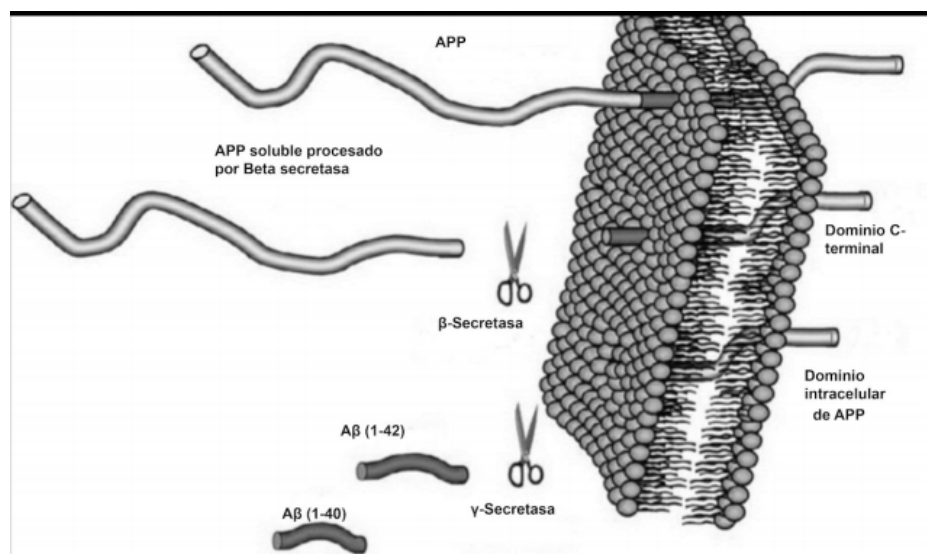


Fig.1: Escisión de la APP en las isoformas A β 40 y A β 42 (Estrada and Zomosa, 2017)

Tau es una fosfoproteína codificada por un solo gen que abarca 16 exones, pero se expresa en diferentes isoformas debido al empalme alternativo del ARN. Esta proteína contiene un dominio de unión a túbulos que comprende tres o cuatro dominios repetidos (tau 3R y 4R) conservados en la parte C-terminal por los cuales se diferencian las distintas isoformas. La expresión de diferentes isoformas de tau es específica del tejido y está regulada por el desarrollo. Las isoformas tau 3 y 4 R se encuentran en la EA (Duyckaerts et al., 2009; Arendt et al., 2016).

La acumulación de tau se observa solo en las neuronas, a diferencia de otras tauopatías, donde también se ven afectadas las células gliales. La acumulación neuronal de fibrillas tau tiene lugar en el soma neuronal como enredos neurofibrilares (NFT), en

dendritas como hilos de neuropilo y en axones como la corona neurítica de placas. Los NFT se encuentran principalmente en las neuronas piramidales del hipocampo, de la corteza entorrinal y de las capas III y V de la isocorteza, dejando a las interneuronas en gran parte sin afectar. Los "hilos de neuropilo" o "fibras de tortuga" consisten en filamentos helicoidales pareados que se acumulan en las dendritas de las neuronas que contienen enredos. Ocurren en etapas tempranas de la degeneración neurofibrilar y representan la carga más grande de la patología tau (Duyckaerts et al., 2009; Arendt et al., 2016).

Se ha sugerido que existe una interacción entre el péptido A β y la proteína tau en ambas direcciones, es decir, A β puede conducir a la formación de tau y tau puede conducir a la formación de A β . El resultado del cruce de ratones transgénicos (con APP y con tau humano) fue el incremento de la patología tau pero no la patología A β (Ittner and Götz, 2011; Bright et al., 2015).

La inyección intracerebral de agregados de A β en ratones transgénicos con tau humano aumenta el número de inclusiones de tau (Bolmont et al., 2007). El oligómero A β puede inducir una redistribución de tau al soma y a las dendritas (Zempel and Mandelkow, 2012) y podría contribuir a la disfunción sináptica (Tackenberg et al., 2013). La hiperexcitabilidad mediada por NMDAR (ácido N-metil-D-aspartico), un mecanismo que podría conllevar tau, parece ser importante por los efectos nocivos de A β en la sinapsis (Shankar et al., 2008; Tackenberg and Brandt, 2009; Busche et al., 2012; Tackenberg et al., 2013). Esta hiperexcitabilidad de las neuronas después de la exposición a A β se reduce en ausencia de tau, y tau parece ser necesaria para la neurotoxicidad inducida por A β (Roberson et al., 2007; Ittner et al., 2010; Vossel et al., 2010; Roberson et al., 2011; Shipton et al., 2011; Nussbaum et al., 2012), lo que apoya la opinión de que tau actúa hacia la formación de A β (Arendt et al., 2016). Sin embargo, un estudio reciente en ratones transgénicos que sobreexpresan formas mutantes de la APP humana y la presenilina 1 sugiere un mecanismo de retroalimentación con tau que también regula el A β porque, además de proteger de la pérdida neuronal y sináptica, la eliminación de tau produjo una menor carga de placa (Leroy et al., 2012).

El porqué las patologías A β y tau se asocian de forma tan íntima y regular todavía es una de las principales cuestiones sin resolver de la EA.

Lesiones debidas a pérdidas

La pérdida de neuronas durante la enfermedad es focal, es decir, afecta a un sitio específico del cerebro. Se ha documentado una pérdida neuronal grave en la capa II de la corteza entorrinal (de hasta el 90% del total en los casos más avanzados), en el sector CA1 del hipocampo (donde el número de neuronas se redujo tres veces), en el giro temporal superior y en el giro supramarginal (Duyckaerts et al., 2009).

Hay evidencias que apuntan que la muerte neuronal en la EA está causada por el proceso de apoptosis, relacionado este, a su vez, con la toxicidad por el péptido A β . La proteína C-Jun, que está asociada con la activación de la cascada apoptótica, se expresa en la EA y se encuentra ligada a los nudos neurofibrilares (NFT) (Pearson et al., 2006). Todavía no se ha podido determinar ni la prevalencia de células apoptóticas en el cerebro con Alzheimer ni la cinética de la muerte neuronal.

Las pérdidas sinápticas en la EA se caracterizan por dos aspectos: las sinapsis participan en las placas seniles (depósitos de amiloide) y el número total de sinapsis en el cerebro con Alzheimer disminuye con el tiempo (Duyckaerts et al., 2009).

Los marcadores presinápticos (como la sinaptofisina y SNAP-25) o los postsinápticos (como el PSD-95) se han utilizado para analizar las alteraciones sinápticas. En general, se produce una disminución de los marcadores vesiculares, como la sinaptofisina, mientras que los marcadores de membrana, como el SNAP-25, se mantienen (Duyckaerts et al., 2009). Se encontró que la proteína postsináptica PSD-95 se incrementaba en la corteza frontal (Leuba et al., 2008).

En conclusión, existen numerosas pruebas de que las sinapsis desempeñan un papel fisiopatológico importante en la EA.

Lesiones debidas a procesos reactivos

Las microglías activadas, los primeros componentes de la cascada del complemento, las citoquinas proinflamatorias son evidencias de un proceso inflamatorio en curso en la placa senil (Duyckaerts et al., 2009; Eikelenboom et al., 2008). La inmunización pasiva o activa contra varios epítomos del péptido amiloide reduce la carga

de amiloide aunque aumenta la atrofia y el volumen ventricular (Nicoll et al., 2006; Foz et al., 2005). La fagocitosis de A β por los macrófagos está asociada con la eliminación de péptido A β (Nicoll et al., 2006).

En la corteza de los pacientes con Alzheimer la densidad de empaquetamiento de los astrocitos fibrosos se incrementa. La astrogliosis está correlacionada con la densidad de nudos neurofibrilares y de depósitos de A β . Los astrocitos que se encuentran alrededor y en los depósitos difusos pueden contener gránulos marcados por anticuerpos anti-A β que proporcionan diferentes resultados debido a la heterogeneidad de las isoformas de A β que se encuentran en los astrocitos (Duyckaerts et al., 2009).

La EA se caracteriza por pérdida de estructuras normales y de procesos regenerativos. Ramón y Cajal pensó que la placa amiloide era la consecuencia de un proceso regenerativo alterado (Duyckaerts et al., 2009). Más recientemente, los signos de neurogénesis se han estudiado en la EA con resultados controvertidos: se ha encontrado que los marcadores de neurogénesis aumentan (Jin et al., 2004); sin embargo, se sospecha que las neuronas recién generadas no se convierten en neuronas funcionales (Li et al., 2008).

1.1.2. Enfermedad de Parkinson

La EP es un trastorno neurodegenerativo común y complejo. Es una enfermedad idiopática del sistema nervioso que representa la segunda enfermedad degenerativa más frecuente (Kalia and Lang, 2015; Beitz, 2014).

Este trastorno se manifiesta con una amplia gama de síntomas, es el resultado de una combinación de factores genéticos y ambientales e implica múltiples áreas neuroanatómicas y (Kalia and Lang, 2015).

La EP es un trastorno de movimiento con cuatro síntomas principales: bradicinesia (ralentización de los movimientos), rigidez, temblor y deterioro postural y de la marcha. La bradicinesia debe ocurrir en combinación con el temblor, rigidez o ambos. El último síntoma se desarrolla más con la progresión de la enfermedad con el tiempo (Kalia and Lang, 2015; Tysnes and Storstein, 2017). Otras manifestaciones motoras incluyen hipomimia (inexpresividad facial), disminución de la velocidad de parpadeo del ojo,

postura encorvada, escoliosis, andar arrastrando los pies, "congelamiento" (incapacidad para moverse), hipofonía (voz cada vez más suave) o palilalia (repetición de palabra o frase) (Beitz, 2014).

Los síntomas no motores preceden a los síntomas motores e incluyen cambios cognitivos, cambios conductuales/neuropsiquiátricos, hiposmia (sentido del olfato alterado), trastorno del sueño REM, depresión, incontinencia urinaria y disfunción eréctil. La psicosis y las alucinaciones también pueden ocurrir en pacientes con Parkinson (Beitz, 2014).

La edad es el mayor factor de riesgo para el desarrollo de la EP con una edad promedio de inicio de 50 a 60 años. La genética es otro factor de riesgo: los familiares de primer grado de los pacientes afectados tienen un riesgo 2 a 3 veces mayor de desarrollar la enfermedad (Savica et al. 2016). Otros factores de riesgo para la EP incluyen las exposiciones ambientales como el consumo de agua de pozo, el consumo de cigarrillos y alcohol, el exceso de peso corporal, la exposición a cobre, manganeso y plomo, la alta ingesta dietética de hierro y la exposición a pesticidas (Kalia and Lang, 2015; Beitz, 2014; Tysnes and Storstein, 2017). El riesgo de desarrollar la enfermedad es claramente multifactorial (Lee et al., 2011).

La EP se caracteriza por la pérdida o degeneración de las neuronas dopaminérgicas (productoras de dopamina) en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) que da como resultado un marcado deterioro del control motor y el desarrollo de cuerpos de Lewy o agregados intracelulares anormales que contienen la proteína α -syn que afecta al funcionamiento óptimo de las neuronas. Otra característica de esta enfermedad es la neuroinflamación (Kalia and Lang, 2015; Beitz, 2014).

La degeneración neuronal está causada, entre otros factores, por especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen disfunción mitocondrial o estrés oxidativo (Beitz, 2014). La pérdida de neuronas ocurre en otras regiones cerebrales como el núcleo basal de Meynert, el núcleo de rafe, la amígdala y el hipotálamo (Dickson, 2012).

Las mutaciones genéticas de la proteína α -syn hace que ésta se vuelva anormal, insoluble y se auto-agregue. Esta agregación es un componente de los cuerpos de Lewy, inclusiones celulares características de la EP (Beitz, 2014). La patología de Lewy,

además de en el cerebro, también se puede encontrar en la médula espinal y el sistema nervioso periférico (Fumimura et al., 2007; Beach et al., 2010; Del Tredici et al., 2010).

La proteína α -syn forma varios tipos de agregados como estructuras pequeñas de tipo hilo delgado, depósitos presinápticos muy finos y oligómeros solubles compuestos de varios monómeros de α -syn. Algunos de estos oligómeros de α -syn podrían ser tóxicos para las neuronas (Kovacs et al., 2012; Schulz-Schaeffer, 2010; Kalia et al., 2013). Las incorporaciones de proteínas características de la EA se pueden encontrar en los cerebros de pacientes con Parkinson en proporciones comparables como en los cerebros de pacientes con Alzheimer (Kalia and Lang, 2015). Esto se asocia con una mayor carga de la patología de Lewy que contribuye a la expresión clínica de la EP (Irwin et al., 2012; Compta et al., 2011).

Las terapias disponibles para la EP solo tratan los síntomas de la enfermedad. La estimulación cerebral profunda es la terapia quirúrgica que se realiza con mayor frecuencia. En ella se implanta quirúrgicamente un electrodo y se proporciona una estimulación eléctrica continua de alta frecuencia. Si es eficaz, la estimulación cerebral profunda puede ayudar a reducir el temblor, la rigidez y la bradicinesia, y también permite disminuir las dosis de medicamentos. Esta terapia no implica la destrucción del tejido cerebral, es reversible y puede ajustarse para la progresión de la enfermedad (Beitz, 2014).

Uno de los principales objetivos de la investigación de la EP es el desarrollo de medicamentos modificadores de la enfermedad que retardan o detienen el proceso neurodegenerativo mientras que la depresión puede tratarse con antidepresivos (Kalia and Lang, 2015).

Existen alternativas a la terapia farmacológica y quirúrgica que ofrecen esperanza y una opción de tratamiento. Estas terapias están basadas en células madre (Loewenbrück and Storch, 2011), terapia génica (Berry and Foltynie, 2011) y terapia de luz brillante para tratar los trastornos del sueño (Rutten et al., 2012).

La EP en sí no causa la muerte, pero se asocia con un aumento de la morbilidad y la mortalidad ya que afecta a 1–2 personas por 1000 de la población. El aumento del conocimiento sobre las manifestaciones de la enfermedad, los tratamientos, el curso progresivo a largo plazo y los factores de riesgo genéticos y ambientales probablemente

aumentará la comprensión de la causa de la enfermedad y será esencial para una atención óptima y una mejor calidad de vida para las personas con EP (Beitz, 2014; Tysnes and Storstein, 2017).

1.2. Compuestos fenólicos como inhibidores amiloides

Una estrategia terapéutica eficaz para la prevención o tratamiento de las enfermedades debidas a la acumulación de agregados tóxicos mal plegados es el uso de inhibidores de la agregación amiloide que puedan reducir la toxicidad de los agregados, inducir la eliminación de estas especies, recuperar su función original o evitar la formación de nuevos agregados (Ladiwala et al., 2011; Estrada and Soto, 2006).

Los inhibidores de amiloide interactúan con agregados amiloidogénicos en diferentes etapas, al inhibir, bloquear o deteriorar el autoensamblaje o la agregación de amiloide, o incluso eliminar los agregados ya formados (Soto, 2001; Estrada and Soto, 2006; Ladiwala et al., 2011) (Fig.2).

La conformación nativa de una proteína está en equilibrio con muchas otras conformaciones posibles. Entre ellas, las formas parcialmente plegadas pueden conducir a estructuras alternativas asociadas con los trastornos de plegamiento incorrecto de proteínas. La formación de proteínas mal plegadas es un evento desfavorable y las especies intermedias no son tan estables como las contrapartes plegadas nativas (flechas naranjas de dos cabezas). Aunque las células tienen diferentes mecanismos para deshacerse de los agregados mal plegados, cuando se generan las primeras semillas, la cinética de la polimerización es más rápida, generando pequeños oligómeros, protofibras y fibras (flecha naranja). Los inhibidores del plegamiento y la agregación de amiloide pueden interactuar en diferentes etapas del proceso de polimerización para bloquear la formación de especies tóxicas (líneas verdes). Pueden actuar inhibiendo los cambios conformacionales de la conformación nativa a la plegada incorrectamente; bloqueo o deterioro del autoensamblaje y producción de especies oligoméricas; inhibiendo la polimerización de pequeño-intermedio en especies más grandes; induciendo la formación de agregados fuera de ruta; y desestabilizar, desmontar o remodelar agregados ya formados. Además, algunos de ellos pueden desencadenar una

polimerización más rápida de la conformación mal plegada en fibrillas más grandes, evitando la formación de conjuntos oligoméricos solubles más tóxicos (Dhouafli et al., 2018).

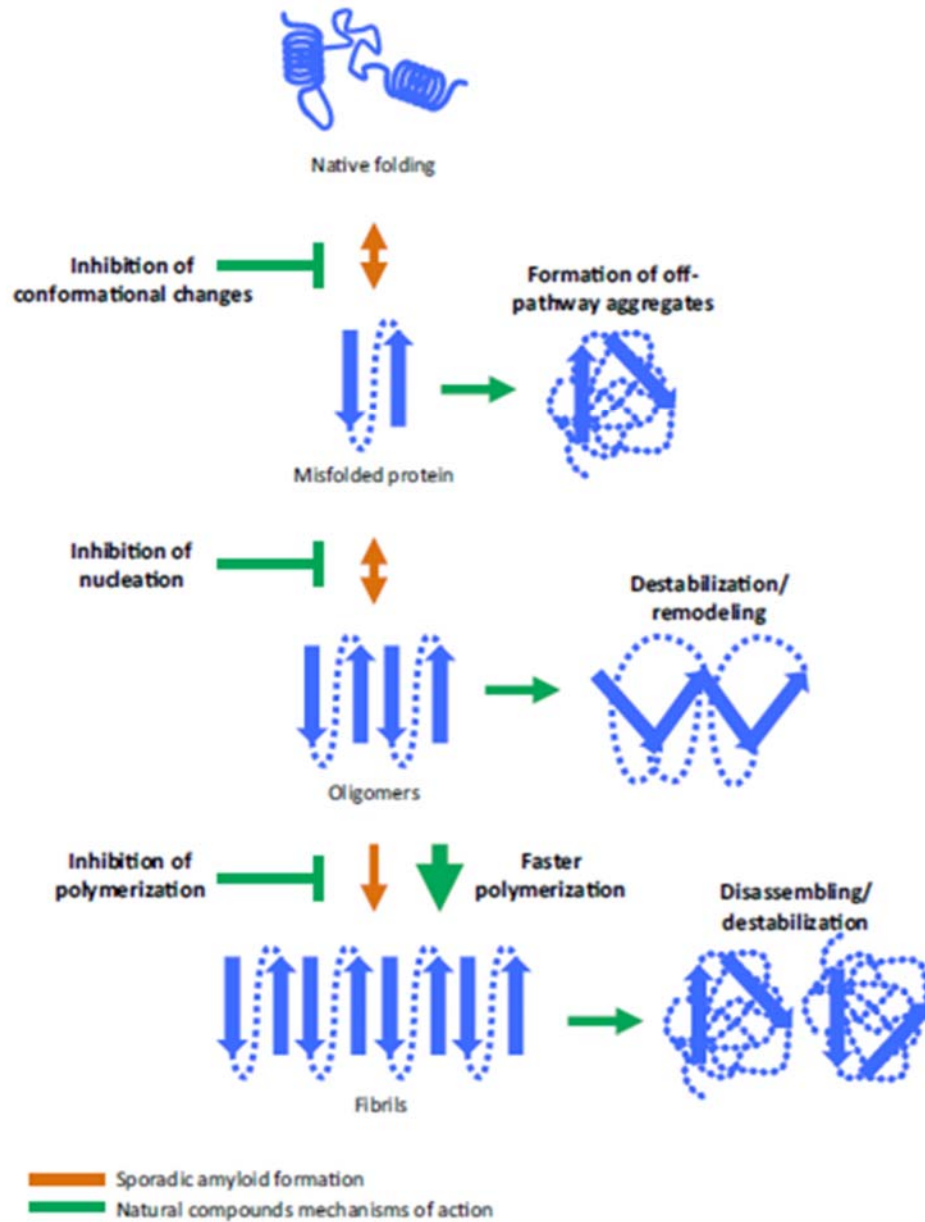


Fig.2: Etapas de interacción de diferentes inhibidores de amiloide (Dhouafli et al., 2018).

Se ha puesto interés en sustancias naturales no tóxicas provenientes de alimentos o hierbas que sean capaces de reducir o inhibir la acumulación de agregados mal plegados y que tengan baja toxicidad y coste y reservas globales.

Sus mecanismos de acción son variables y, en algunos casos, parecen implicar una interacción directa con los agregados, pudiendo interferir en la agregación amiloide bloqueando la nucleación primaria, inhibiendo la formación de agregados fibrilares, modificando la conformación de las especies citotóxicas formadas en agregados no tóxicos o desmontando agregados preformados (Dhouafli et al., 2018).

Estas sustancias son los polifenoles o compuestos fenólicos. Los polifenoles son moléculas biológicas ricas en grupos aromáticos cuya estructura puede ir desde ácidos fenólicos simples hasta estructuras muy polimerizadas.

Son metabolitos secundarios sintetizados por plantas, hongos y microorganismos que se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hidroxilo en un anillo de benceno. Se clasifican según la estructura química en flavonoides y no flavonoides.

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común difenilpirano (C6 -C3 -C6'), compuesto por dos anillos fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano heterocíclico (Quiñones et al., 2012) (Fig.3).

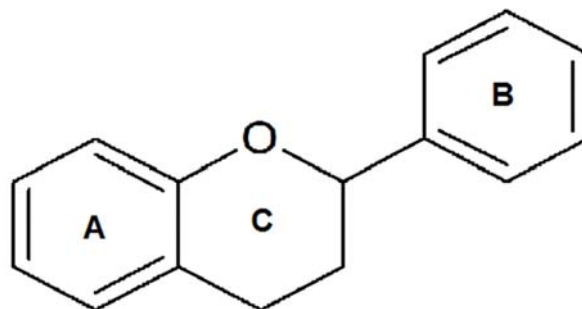


Fig.3: Estructura básica de los flavonoides (referencia propia).

Se clasifican como flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonas, flavanoles y antocianidinas con respecto al patrón de hidroxilación en el anillo C (Tabla 1).

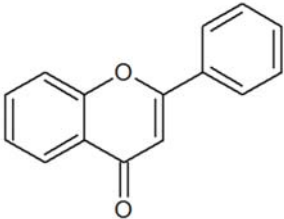
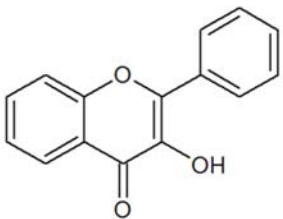
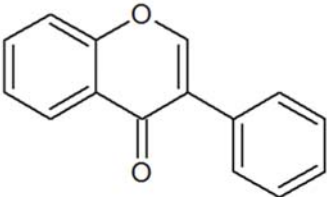
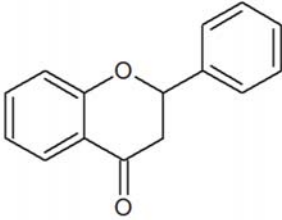
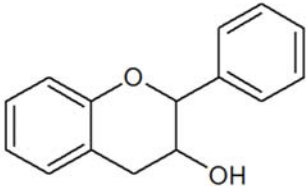
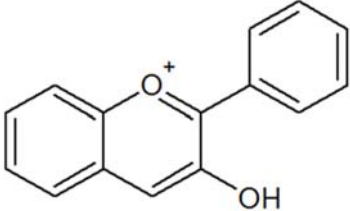
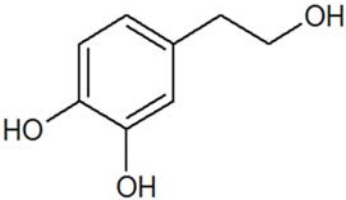
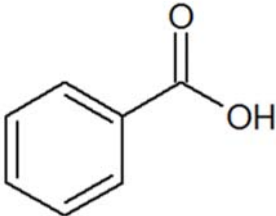
Flavona		Flavonol	
Isoflavona		Flavanona	
Flavanol		Antocianidina	

Tabla 1: Estructura de los polifenoles flavonoides (referencia propia).

Los no flavonoides comprenden alcoholes mono-fenólicos, ácidos fenólicos simples y estilbenos. En el caso de los ácidos fenólicos simples, que constituyen la mayor parte de los polifenoles no flavonoides, se encuentran los derivados del ácido benzoico y los del ácido cinámico (Tabla 2).

Alcohol mono-fenólico		Ácido benzoico	
-----------------------	---	----------------	---

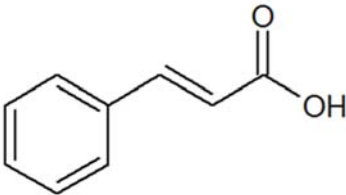
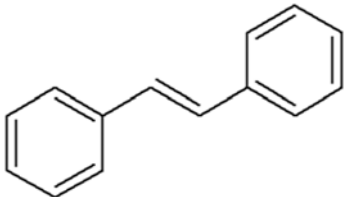
Ácido cinámico		Estilbeno	
-------------------	---	-----------	--

Tabla 2: Estructura de los polifenoles no flavonoides (referencia propia).

Este trabajo se centra en las experiencias realizadas con cuatro de estos compuestos: dos flavonoides, apigenina y quercetina, y dos no flavonoides, curcumina y resveratrol.

1.2.1. Apigenina

La apigenina (4',5,7-trihidroxi flavona) (Fig.4), es una flavona natural no mutagénica con baja toxicidad, que se encuentra en varios alimentos como el perejil, el apio, y las cáscaras de naranja y en hierbas medicinales como la *Carduus crispus*. Se ha utilizado por sus efectos ansiolíticos, sedantes y antidepresivos.

La apigenina tiene una gran variedad de efectos biológicos, incluyendo actividades anticancerígenas, antiinflamatorias y de eliminación de radicales libres. Se ha descubierto que alivia los déficits de aprendizaje y de memoria, disminuye el daño oxidativo, mejora la transmisión neuronal colinérgica y preserva la integridad de la barrera hematoencefálica (Dhouafli et al., 2018; Zhao et al., 2011; Zhao et al., 2013).

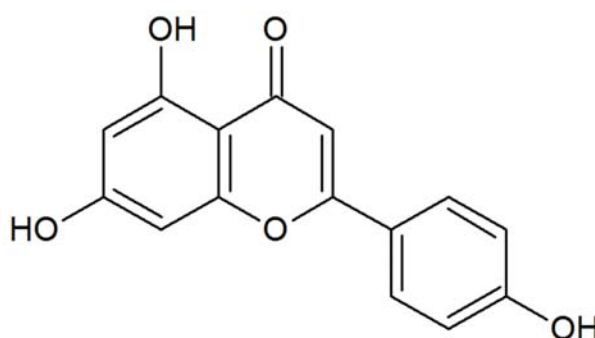


Fig.3: Estructura química de la Apigenina (referencia propia).

1.2.2. Quercetina

La quercetina (3,5,7,30,40-pentahidroxi flavona) (Fig.5) es un flavonol natural que se encuentra en alimentos comunes como las cebollas, las manzanas, las bayas, el té y el vino tinto. Se ha utilizado como antioxidante debido a su alta actividad de eliminación de radicales de oxígeno, y para alergias, trastornos inflamatorios, enfermedades cardiovasculares y cánceres.

La quercetina ejerce numerosos efectos beneficiosos sobre la salud humana, incluyendo antiinflamación, antiisquemia y protección cardiovascular. También ejerce efectos neuroprotectores contra la toxicidad inducida por el agente, aumenta la resistencia de las neuronas al estrés oxidativo y la excitotoxicidad al modular los mecanismos de la muerte celular (Zhu et al., 2013; Li et al., 2015; Sabogal-Guáqueta et al., 2015).

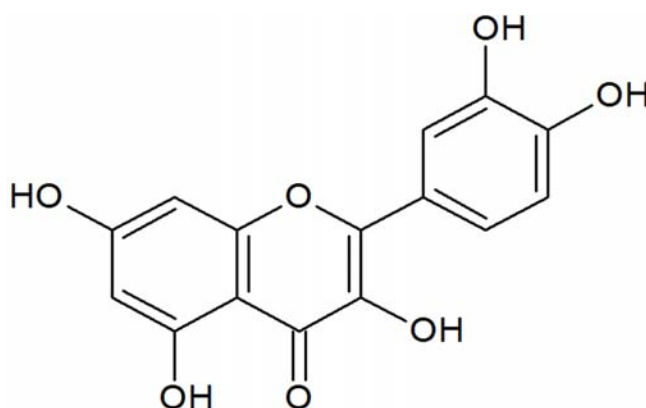


Fig.5: Estructura química de la Quercetina (referencia propia).

1.2.3. Curcumina

La curcumina (1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dieno-3,5-diona) (Fig.6) es el principal pigmento amarillo extraído de la raíz de la planta *Cúrcuma longa* una planta de la familia del jengibre. La cúrcuma se ha utilizado con fines medicinales durante años, ya que presentan una amplia gama de propiedades biológicas, incluyendo antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacterianas, antivirales, y antifúngicas. La

curcumina es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y el hecho de que los humanos consumen cantidades significativas de esta sin toxicidad aparente, hace que se muestre prometedora para las enfermedades neurodegenerativas ya que alivia la muerte celular y la pérdida neuronal en modelos celulares y animales de la EA y la EP.

Previene la agregación amiloide ya que es capaz de eliminar las ROS que se sabe que desempeñan un papel en el daño cerebral. La curcumina previene la agregación de las proteínas A β y tau mediante la unión directa para prevenir su ensamblaje en especies neurotóxicas en el SNC. También inhibe la acumulación de proteínas priónicas resistentes a la proteasa actuando como un rompedor de amiloide general (Ghosh et al., 2015; Lin et al., 2013; Spinelli et al., 2015; Rao et al., 2015; Pandey et al., 2008).

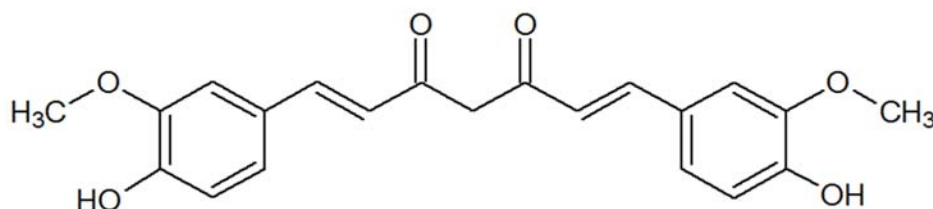


Fig.6: Estructura química de la Curcumina (referencia propia).

1.2.4. Resveratrol

El resveratrol (trans-3,4,5-trihidroxiestilbeno) (Fig.7) es un polifenol que se encuentra principalmente en uvas y vino tinto y tiene diversas actividades biológicas y farmacológicas beneficiosas que incluyen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, quimiopreventivas y cardioprotectoras, así como efectos neuroprotectores contra enfermedades neurodegenerativas.

Los primeros estudios demostraron que el consumo moderado de vino tinto que contiene este polifenol podría mejorar la demencia clínica en pacientes con EA y atenuar la neuropatología amiloide y el deterioro cognitivo similar a EA en modelos animales. Estudios recientes muestran que el resveratrol aumenta la longevidad y retrasa la aparición del envejecimiento de una manera similar a la de la restricción calórica.

Hasta la fecha, solo unos pocos informes han descrito sistemáticamente los efectos del resveratrol en la autoagregación de A β , y queda por determinar si podría

interactuar directamente con A β (Ge et al., 2012; He et al., 2017; Karuppagounder et al., 2009; Marambaund et al., 2005; Wang et al., 2017).

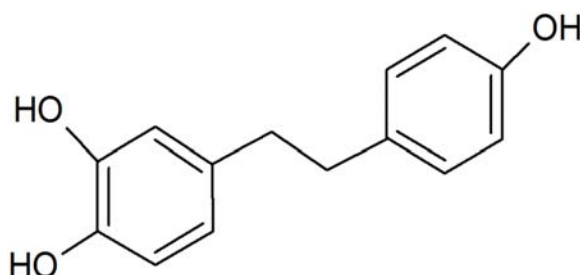


Fig.7: Estructura química del Resveratrol (referencia propia)

1.3. Técnicas experimentales

Las técnicas más empleadas para la investigación de los compuestos fenólicos como inhibidores de agregación amiloide fueron:

1.3.1. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (CD) es una técnica espectroscópica no destructiva que se utiliza para obtener información estructural de baja resolución sobre macromoléculas biológicas, como proteínas o ácidos nucleicos. Debido a su asimetría intrínseca, estas moléculas muestran una absorción diferente de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha en el UV cercano y lejano. En el rango UV lejano (190–250 nm), el enlace peptídico sirve como cromóforo y las mediciones en esta parte del espectro proporcionan información sobre la estructura secundaria de la proteína (Yao et al., 2018).

El CD se ha convertido cada vez más en una técnica estructural valiosa para abordar la realización de estudios estructurales en las condiciones en que las proteínas realmente operan (generalmente en solución), así como en otras condiciones y para proporcionar medidas de las tasas de cambios estructurales de las proteínas, que son esenciales para su función biológica.

Se puede considerar que la luz polarizada plana está formada por dos componentes polarizados circularmente de igual magnitud, uno que gira en sentido

contrario a las agujas del reloj (zurdos, L) y otro que gira en el mismo sentido a las agujas del reloj (diestros, R). El CD se refiere a la absorción diferencial de estos dos componentes. Si los componentes L y R no se absorben o se absorben en las mismas extensiones, la recombinación de L y R regeneraría la radiación polarizada en el plano original. Sin embargo, si L y R se absorben en diferentes grados, se diría que la radiación resultante posee polarización elíptica (Fig.8) (Kelly et al., 2005).

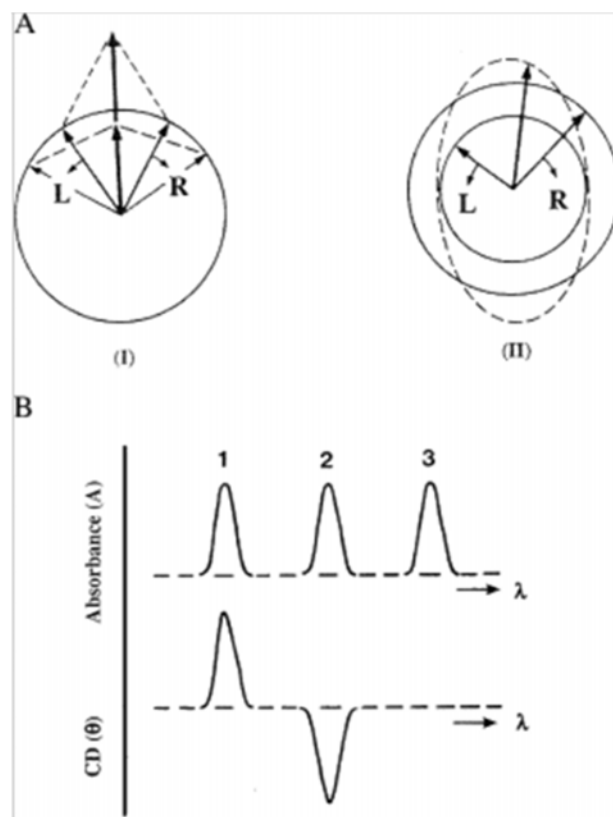


Fig.8: Origen del efecto CD. (A) Las componentes polarizadas circularmente a la izquierda (L) y derecha (R) de la radiación polarizada plana: (I) las dos componentes tienen la misma amplitud y cuando se combinan generan radiación polarizada plana; (II) los componentes son de diferente magnitud y la resultante (línea discontinua) está polarizada elípticamente. (B) La relación entre absorción y espectros de CD. La banda 1 tiene un espectro de CD positivo con L más absorbido que R; la banda 2 tiene un espectro de CD negativo con R más absorbido que L; La banda 3 se debe a un cromóforo aquiral (Kelly et al., 2005).

Los instrumentos de CD (conocidos como espectropolarímetros) miden la diferencia de absorbancia entre los componentes polarizados circularmente L y R ($\Delta A =$

AL - AR), pero generalmente informarán esto también en términos de la elipticidad (θ) en grados (Kelly et al., 2005). El espectro de CD se obtiene cuando el dicroísmo se mide en función de la longitud de onda.

Existen varios métodos mediante los cuales se puede medir el efecto CD en un espectropolarímetro: (1) modulación, en la cual la radiación incidente se cambia continuamente entre las componentes L y R, (2) sustracción directa, en la que las absorbancias de las dos componentes se miden por separado y se restan entre sí, y (3) elipsométrico, en el que se mide la elipticidad de la radiación transmitida (Kelly et al., 2005). El método más utilizado es el de modulación. En él, la luz polarizada del plano se divide en luces L y R al pasar a través de un modulador, sometidas a un campo eléctrico alternativo. El modulador generalmente se compone de un cristal de cuarzo piezoeléctrico y una placa delgada de material isotrópico. El campo eléctrico alterno induce cambios estructurales en el cristal de cuarzo, lo que hace que la placa transmita luz polarizada circularmente en los extremos del campo. A medida que la luz transmitida se cambia entre las luces L y R, éstas son detectadas a su vez por el fotomultiplicador. Si una de las luces es absorbida por la muestra en mayor medida que la otra, las luces resultantes estarían polarizadas de forma elíptica, es decir, las resultantes trazarían una elipse como se observa en la Fig.8 (Kessenbrock and Groth, 2017).

Los cambios estructurales en las proteínas causados por la unión de ligandos son una parte esencial del mecanismo de acción y la regulación de la actividad biológica. El CD proporciona un medio experimental muy conveniente para detectar tales cambios que pueden examinarse en diferentes regiones espectrales (Kelly et al., 2005).

CD se relaciona con la agregación amiloide en este sentido, ya que es capaz de detectar los cambios que se producen en las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas. Por ejemplo, para la proteína α -syn se detecta un cambio en los espectros de CD lo que se relaciona con un cambio conformacional pasando de una estructura de bobina aleatoria a una estructura típica de lámina β , lo cual es característico de la capacidad de agregación de las proteínas mal plegadas o amorfas (Fig.9) (Hu et al., 2001; Lin et al., 2006).

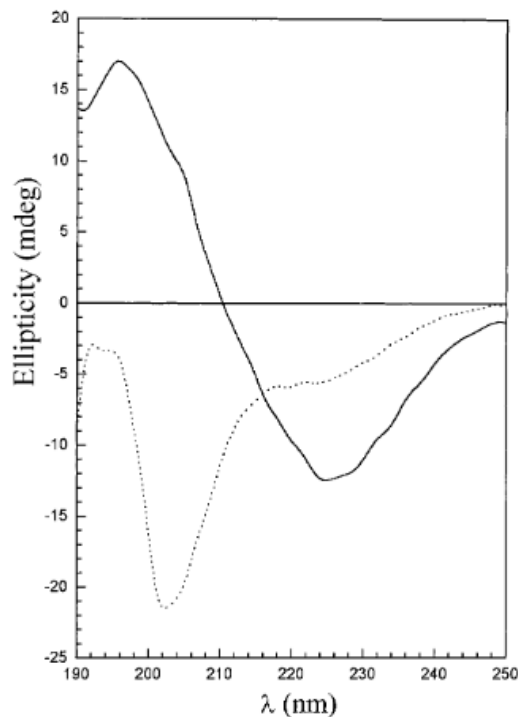


Fig.9: Espectro de CD de la proteína α -syn. La línea punteada (···) representa el espectro característico de una estructura de bobina aleatoria. La línea continua (—) representa el espectro de una estructura de lámina β (Hu et al., 2001).

1.3.2. Microscopía electrónica

En los últimos 40 años, la microscopía electrónica (ME) se ha convertido en una técnica valiosa para determinar la forma y tamaño de proteínas individuales. Se pueden usar dos técnicas disponibles en la mayoría de los laboratorios de ME para obtener imágenes de moléculas individuales, el sombreado giratorio y la tinción negativa (Erickson, 2009). Éstas proporcionan la información estructural esencial.

Para el sombreado giratorio, se pulveriza una solución diluida de proteína con glicerol sobre la mica, el líquido se evapora en alto vacío y el platino metálico se evapora sobre la mica en un ángulo poco profundo. La mica se gira durante este proceso, por lo que el platino se acumula en todos los lados de la proteína. El glicerol ayuda a la difusión de la proteína como moléculas individuales (Fig.10) (Erickson, 2009).



Fig.10: Sombreado giratorio de la proteína Hexabrachion (Erickson, 2009).

La tinción negativa es otra técnica de ME que puede generar imágenes de proteínas individuales. Es muy eficaz para obtener imágenes de proteínas más grandes con una estructura interna compleja, que aparecen como una gran mancha en el sombreado giratorio. Los enlaces proteína-proteína no covalentes a veces se interrumpen en la técnica de sombreado giratorio, pero el acetato de uranilo, además de proporcionar un contraste de alta resolución, fija las estructuras proteicas oligoméricas en unos pocos milisegundos (Fig.11) (Erickson, 2009).

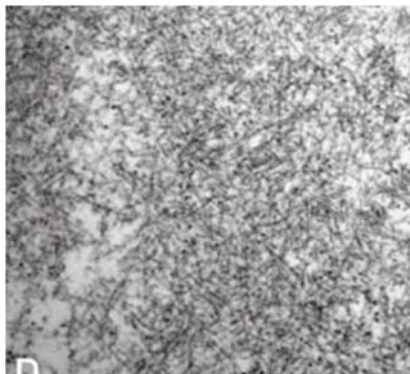


Fig.11: Micrografía electrónica de fibrilla amiloide (tinción negativa) (Cho et al., 2016).

Mediante la ME se pueden detectar partículas esféricas que aparecen en tiempos tempranos de incubación del péptido A β y que desaparecen cuando se forman las fibrillas maduras. Estos oligómeros esféricos solubles representan los intermediarios pre-

fibrilares del proceso de agregación amiloide y son las principales especies tóxicas en las enfermedades neurodegenerativas amiloides. Por tanto, se puede observar la cantidad de agregados que se van a producir (Estrada and Zomosa, 2017).

1.3.3. Ensayos con Tioflavina T

La detección de las fibrillas amiloides se ve facilitada por varios colorantes con propiedades tintóricas específicas de amiloide que surgen cuando los colorantes interactúan con el núcleo de fibrilla β . La tioflavina T (ThT) (Fig.12), es un colorante de benzotiazol obtenido por la metilación de la deshidotiotoluidina con metanol en presencia de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico a 160~170 °C bajo presión. Primero se determinó espectrofotométricamente la existencia de una relación lineal entre la concentración de fibrillas amiloides y la intensidad de emisión de fluorescencia de ThT. Desde entonces se ha convertido en el ejemplo más comúnmente usado para analizar e identificar la formación de fibrillas de amiloide en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Esta técnica se usa combinada con la de CD y ME (Lindberg et al., 2017; Malmos et al., 2017).

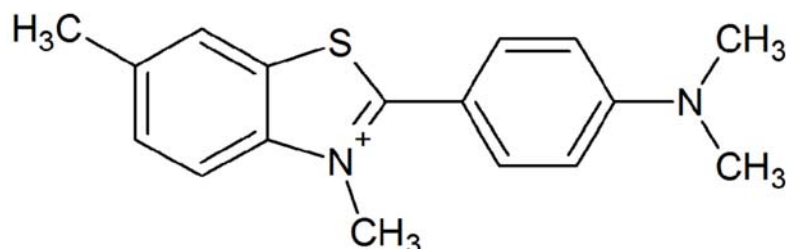


Fig.12: Estructura química de la Tioflavina T (Lindberg et al., 2017).

Cuando se une a estructuras ricas en hojas β , como las fibrillas de amiloide, ThT muestra una fluorescencia mejorada y un desplazamiento azul característico en el espectro de emisión desde aproximadamente 510 nm en estado libre a 480 nm cuando se une a fibrillas de amiloide (Malmos et al., 2017). La interacción de ThT con las fibrillas amiloides es muy específica si se tratan de soluciones que solo contienen la proteína que interesa. Sin embargo, ThT también interactúa con otras moléculas biológicas

provocando una reducción en su utilidad para identificar los depósitos de amiloide por lo que se ha impulsado el desarrollo de derivados de ThT.

Las fibrillas de amiloide maduras muestran una morfología altamente homogénea y, a menudo, se retuercen con periodicidad regular (Fig.13). En general, el nivel de punto final de la intensidad de la fluorescencia ThT informa sobre fibrillas maduras. El número creciente de modelos estructurales para fibrillas de amiloide sugiere que ThT se une al alinearse en paralelo al eje largo de la fibra, intercalando las interacciones de cadena lateral que se repiten en las cadenas β dentro de una capa de lámina β . Por lo tanto, el gran tamaño y la rigidez de las fibrillas permiten la unión de una gran cantidad de ThT, al tiempo que proporcionan un entorno con movilidad restringida, lo que aumenta la emisión de fluorescencia de ThT (Malmos et al., 2017).

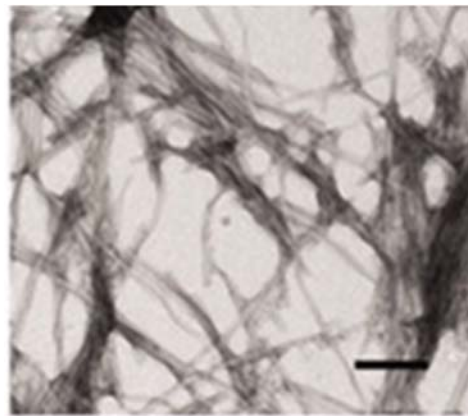


Fig.13: Fibrillas de amiloide maduras unidas a ThT observadas por microscopía electrónica de transmisión (Malmos et al., 2017).

1.3.4. Microscopía de fuerza atómica

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una herramienta de caracterización que mide la formación, la topografía, la estructura, la dinámica y la acción molecular de los materiales biológicos de las superficies al registrar la desviación de una sonda metálica (o "punta") cuando se mueve sobre la superficie del objetivo (Ozkan et al., 2016).

Puede operar de tres modos: (1) en el modo de contacto, la punta se arrastra directamente sobre la superficie y se desvía debido a una interacción coulombica

repulsiva; (2) en el modo sin contacto, la punta se mantiene a una distancia corta (generalmente <100 nm) sobre la muestra y oscila a una frecuencia que depende de las fuerzas de van der Waals atractivas que actúan sobre ella; (3) en el modo de toque o de contacto intermitente, la punta se mantiene oscilando por encima de la muestra, y la frecuencia de oscilación cambia a medida que la punta se aproxima a la superficie a intervalos regulares (Ozkan et al., 2016).

La principal ventaja de esta técnica es su capacidad para determinar estas propiedades en un entorno líquido, sin fijación, a una resolución lateral y vertical sub-nanométrica. Esto permite la obtención de imágenes celulares en un entorno nativo (o pseudo nativo) y la investigación directa de cambios mecánicos en la superficie de una célula viva en respuesta a un estímulo introducido. Además, es posible utilizar la punta de AFM como un estímulo para provocar una respuesta de la célula diana, y la propia sonda puede funcionalizarse con moléculas de ligando para determinar la afinidad de la membrana celular a un resto biológico particular (Fig.13) (Ozkan et al., 2016; Danino, 2008).

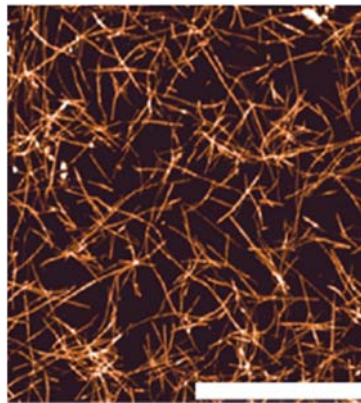


Fig.13: Imagen de AFM de fibrillas de insulina depositadas en mica (Lindberg et al., 2017).

Se aplica un desplazamiento calibrado a la base de la sonda o a la muestra, y este movimiento se transduce en fuerza mediante una flexión del haz en voladizo que sostiene la punta de la sonda. El grado de flexión se mide, generalmente por medios ópticos, y la fuerza se obtiene con el conocimiento de la rigidez del voladizo y del grado de flexión medido. El movimiento de muestra-punta es accionado por elementos piezoeléctricos,

que pueden ser linealizados por control de bucle cerrado. El haz en voladizo generalmente está orientado en ángulo con respecto a la superficie, lo que resulta en que se aplique alguna fuerza tangencial además de la fuerza normal (Fig.14) (Cohen and Kalfon-Cohen, 2013).

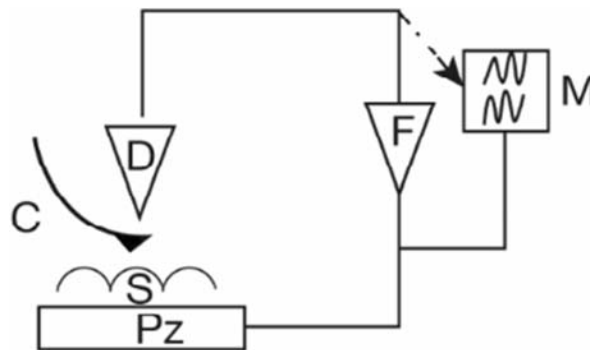


Fig.14: Esquema de microscopio de AFM que muestra Pz-transductor de movimiento piezoeléctrico; S-muestra; C-voladizo y punta integrados; D-detector de movimiento en voladizo; F-retroalimentación; M-monitor para la visualización (Cohen and Kalfon-Cohen, 2013).

Mediante esta técnica es posible obtener información sobre la estructura de los agregados de $A\beta_{1-42}$ y la disposición de estos agregados que conduce a conformaciones que se modifican según la superficie en la que se estudian, siendo estas conformaciones compatibles con el modelo de conformación de monómeros antiparalelo, que se postula para explicar el proceso de agregación. La AFM se considera como una técnica adecuada para estudiar la interacción de cualquier inhibidor con agregados de $A\beta_{1-42}$, ya que esta técnica permite recrear una interfase superficie-líquido, similar a la que ocurre en tejido de cerebro de pacientes que padecen la EA (Morales, 2008).

1.3.5. Western Blot

El Western blot es una de las técnicas de laboratorio más comunes y eficaces para la detección inmunológica de proteínas. La técnica combina la separación de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE) y la capacidad que tienen las inmunoglobulinas

(anticuerpos) de reconocer y unirse específicamente a una determinada proteína (Laemmli, 1970).

La separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida se basa en el tamaño, su posterior transferencia e inmovilización a un soporte de membrana. Esta técnica se usa para identificar cualitativamente una proteína específica de una muestra biológica compleja y proporcionar información sobre su peso molecular (Hnasko and Hnasko, 2015).

La muestra de proteína soluble se diluye con un concentrado de tampón de carga de muestra que contiene un colorante indicador, el detergente aniónico desnaturalizante dodecil sulfato de sodio (SDS) y glicerol. La muestra de carga se puede desnaturalizar calentando durante 5 a 10 minutos entre 70 y 100 °C. Este proceso despliega las proteínas que causan la pérdida de estructuras conformacionales secundarias y las rodea con moléculas de SDS que imparten una carga negativa para que todas las proteínas migren hacia el polo positivo durante la electroforesis. Las muestras de proteínas preparadas se cargan en los pocillos del gel, se aplica la corriente y las proteínas migran a través del gel y están separados por carga (que es proporcional al tamaño). Un estándar de proteína compuesto por un conjunto de proteínas de pesos moleculares conocidos se incluye en un pozo/carril. Se prefieren estándares de proteínas de color, ya que se separan visualmente en el gel durante la electroforesis y proporcionan una medida de la distancia recorrida, el grado de separación y una métrica visual de la eficacia de la transferencia de proteínas a la membrana (Fig.15) (Hnasko and Hnasko, 2015).



Fig.15: Configuración de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). (a) Se extrae cuidadosamente el peine de la parte superior del gel prefabricado. (b) Se monta el tanque para crear un depósito ajustado superior e inferior, se sujeta y se llenan los depósitos con el tampón de funcionamiento. (c) Se cargan las muestras que contengan colorante indicador en los pozos. (d) Se pone la tapa, se enciende la fuente de alimentación y se controla el progreso mediante la visualización del tinte indicador (Hnasko and Hnasko, 2015).

Las proteínas separadas son transferidas e inmovilizadas a una lámina de nitrocelulosa que contiene en su superficie, tras la transferencia, las proteínas con la misma distribución que ocupaban en el gel (Hnasko and Hnasko, 2015; Laemmli, 1970).

La detección inmunológica de la proteína objeto de análisis se lleva a cabo en varias etapas. La membrana se incuba en una solución que contiene un anticuerpo que se sabe que se une a la proteína que se desea detectar en la muestra objeto de análisis. Después de la incubación, el anticuerpo no unido se lava, dejando solo el anticuerpo unido a la proteína objetivo en la membrana. Posteriormente, se sumerge la membrana en otra disolución con un segundo anticuerpo que se unirá específicamente al anticuerpo anteriormente empleado. El segundo anticuerpo lleva unido una enzima que va a

contribuir en la detección de la proteína de interés. Los anticuerpos forman un complejo proteína-anticuerpo-anticuerpo-HRP que puede detectarse con quimioluminiscencia. Por tanto, se va a colorear el sitio de la membrana donde se encuentra la enzima, que es donde se encuentran fijados los anticuerpos y donde se encuentra fijada la proteína de interés. Un dispositivo de imágenes revela la presencia del complejo proteína-anticuerpo en forma de una "banda" en un peso molecular particular. Las bandas en la membrana se comparan con los marcadores de peso molecular para determinar si la proteína de interés está presente en la muestra (Kim, 2017; Laemmli, 1970).

Los agregados de A β se disocian fácilmente en monómeros y oligómeros pequeños (dímeros y trímeros) en presencia de tampones que contienen SDS. Por tanto, mediante esta técnica se analizan las diferencias entre las bandas de monómeros unidos al anticuerpo específico que indican cambios en los niveles de proteína de los agregados precipitados de A β y se correlaciona con la cantidad de agregados de A β . Esto permite una evaluación semicuantitativa de los agregados del péptido amiloide (Upadhaya et al., 2014).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para obtener la información sobre los distintos aspectos de los que trata el trabajo se han empleado las bases de datos PubMed y Google Scholar que han permitido el acceso a los distintos artículos y libros científicos empleados.

Los filtros de búsqueda que se han utilizado para limitar los documentos han sido mediante palabras clave como "Phenolic compounds as amyloid inhibitors", "Neurodegenerative diseases" o "flavonoids and non-flavonoids" además de otros términos. También se ha usado como criterio de selección el tiempo ya que se han seleccionado documentos que no sobrepasen veinte años de antigüedad (desde 2000 hasta 2019) a excepción del estudio de la técnica de Western Blot de Laemmli de 1970.

Todas las referencias bibliográficas de artículos y libros científicos empleados vienen incluidas en el apartado de Bibliografía.

Se ha empleado el programa ChemSketch para dibujar los diferentes compuestos sobre los que se habla en este trabajo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han realizado numerosos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre las capacidades de los polifenoles descritos anteriormente para reducir los síntomas asociados a las proteínas que causan la EA y la EP.

3.1. Apigenina

Los experimentos realizados con la apigenina han demostrado que es capaz de inhibir varias proteínas mal plegadas amiloidogénicas del sistema nervioso central ($A\beta$, α -syn) al extender el tiempo de demora del proceso de fibrilación y reducir la cantidad de estructuras fibrilares producidas, es decir, la carga de placa. Esta función se ha atribuido principalmente a su capacidad para estabilizar estructuras desplegadas a través de interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno y se ha podido determinar mediante ensayos de microscopía electrónica, donde se ha podido observar que la apigenina estabiliza una conformación intermedia de $A\beta_{42}$ ayudando a la formación de oligómeros de esta isoforma pero hace imposible el proceso de formación de fibrillas. Sin embargo, parece que no es capaz de desestabilizar o lo hace muy débilmente las fibrillas de amiloide preformadas ni inhibir el proceso de oligomerización una vez que ha comenzado (Necula et al., 2007;.Dhouafli et al., 2018; Zhao et al., 2011; Zhao et al., 2013).

3.2. Quercetina

Para la quercetina, los estudios realizados informan que debido a su capacidad para penetrar la barrera hematoencefálica retrasa la progresión de las enfermedades degenerativas. Además, se demostró que la quercetina reduce la maduración de la APP en células del neuroblastoma SH-SY5Y humanas reduciendo los niveles de $A\beta$. Los ensayos con quercetina han demostrado reducir las tauopatías pues producen una disminución significativa de los NFT en ratones transgénicos. Inhibe la formación de fibrillas de α -syn, esto pudo ser demostrado mediante AFM ya que se observó la

formación de estructuras fibrilares en ausencia de quercetina pero al incubarse con ella se apreciaron oligómeros globulares que aunque se asociaban entre sí no formaban fibrillas. Desagrega las fibrillas preformadas al inhibir la etapa de crecimiento de las fibrillas y actúa de neuroprotector al mitigar el aumento de los niveles de ROS que pueden acelerar el progreso de la EA y EP (Zhu et al., 2013; Li et al., 2015; Sabogal-Guáqueta et al., 2015).

A pesar de que la apigenina y la quercetina son unos candidatos prometedores, no se tiene conocimiento de la existencia de ningún ensayo clínico con humanos con estos polifenoles en los trastornos de plegamiento incorrecto de proteínas.

3.3. Curcumina

Los experimentos con curcumina han demostrado que ésta puede revertir la neurodegeneración al bloquear la disfunción mitocondrial y la apoptosis consiguiendo reducir la carga de placa de A β , promueve la salud mitocondrial y reduce el estrés oxidativo. Puede ser beneficiosa en EP y demencia con cuerpos de Lewy (DCL) al modular directamente la agregación de la proteína α -syn, proteger contra la muerte celular inducida por α -syn mediante la inhibición de la toxicidad mitocondrial. Además, se une directamente a la proteína α -syn, y puede inhibir y revertir la formación de especies de agregados de α -syn tóxicas. También podría desagregar formas oligoméricas y fibrilares de orden superior de la proteína, que se cree que son las especies tóxicas. Esto se comprobó mediante un ensayo de Western blot donde se observó que la curcumina era capaz de aumentar la solubilidad de los monómeros y disminuir la agregación de la proteína α -syn. Debido a que la curcumina puede desagregar agregados de α -syn preformados, esto sugiere que podría usarse terapéuticamente, de manera preventiva, para detener o revertir el proceso de la enfermedad después de que ya haya causado síntomas clínicos (Ghosh et al., 2015; Lin et al., 2013; Spinelli et al., 2015; Rao et al., 2015; Pandey et al., 2008).

3.4. Resveratrol

Los experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el resveratrol ejerce sus efectos neuroprotectores sobre los marcadores patológicos de la EA a través de varios mecanismos, como la promoción de la eliminación de péptidos A β anormales y la escisión anti-amiloidogénica de la APP, así como reduciendo el estrés oxidativo. El resveratrol actúa promoviendo la degradación intracelular de A β por un mecanismo que implica al proteasoma. Se ha probado que es capaz de inhibir la agregación de A β ya que convierte los oligómeros tóxicos en productos que no se pueden agregar (es decir, en agregados fuera de ruta) que han podido ser determinados mediante CD ya que en los espectros de la proteína amiloide con resveratrol se observaron los picos característicos de una estructura de bobina aleatoria que daban lugar a oligómeros que no se asociaban entre sí para formar fibrillas (Ladiwala et al., 2010; Feng et al., 2009; Ge et al., 2012; He et al., 2017; Karuppagounder et al., 2009; Marambaund et al., 2005; Wang et al., 2017).

Estos polifenoles si han podido ser probados en ensayos clínicos con humanos, además de en ensayos *in vitro* e *in vivo*, y han proporcionado resultados prometedores en pacientes con EA y EP aunque en algunas ocasiones no se han mostrado los resultados esperados debido a que tienen una biodisponibilidad deficiente para desempeñar su acción.

Compuesto	Objetivo amiloide	Mecanismo de acción	Efectividad terapéutica
Apigenina	A β , α -syn	Prevención de cambios conformacionales	Reduce la carga de A β en ratones
Quercetina	A β , tau, α -syn	Prevención de cambios conformacionales. Inhibición de la fibrillogénesis	Reduce los NFT y los niveles de A β en ratones
Curcumina	A β , α -syn	Prevención de cambios conformacionales Inhibición de la fibrillogénesis Desagregación de agregados preformados.	Reduce la carga de placa en ratones con EA Reducciones de p- α -syn en ratones EP Variedad de resultados en ensayos clínicos para EA
Resveratrol	A β	Formación de agregados fuera de ruta Inhibición de la fibrillogénesis Desagregación de agregados preformados	Reduce la carga de A β en ratones Mejora el deterioro de la memoria en pacientes con MCI

Tabla 3: Tabla resumen de los mecanismos de acción de compuestos fenólicos y los efectos que ejercen (Dhouafli et al.,2018).

4. CONCLUSIÓN

En conclusión, los polifenoles han demostrado tener numerosos efectos beneficiosos en las enfermedades neurodegenerativas en estudios *in vitro* e *in vivo* mediante la inhibición de la agregación de proteínas amiloides. Sin embargo, aún no se han podido probar estos efectos en ensayos con humanos. Una posible línea de investigación futura sería el desarrollo de fármacos a base de estos compuestos naturales y de sus derivados o posibles combinaciones que puedan ayudar a reducir los síntomas de estas enfermedades.

Además, deberían de estudiarse los posibles efectos adversos y el riesgo que puedan tener los polifenoles para los seres humanos.

BIBLIOGRAFÍA

Arendt T., Stieler J.T., Holzer M. (2016) Tau and tauopathies. Brain Research Bulletin. 126:238-292.

Beach T.G., Adler C.H., Sue L.I., Vedders L., Lue L., White III C.L., Akiyama H., Caviness J.N., Shill H.A., Sabbagh M.N., Walker D.G. (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated α -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathologica. 119: 689–702.

Beitz J.M. (2014) Parkinson's disease: a review. Frontiers in Bioscience. 6:65-74.

Berry A.L., Foltynie T. (2011) Gene therapy: a viable therapeutic strategy for Parkinson's disease? Journal of Neurology. 258:179–188.

Bolmont T., Clavaguera F., Meyer-Luehmann M., Herzig M.C., Radde R., Staufenbiel M., Lewis J., Hutton M., Tolnay M., Jucker M. (2007) Induction of tau pathology by intracerebral infusion of amyloid- β -containing brain extract and by amyloid- β deposition in APP x Tau transgenic mice. The American Journal of Pathology. 171:2012-2020.

Bright J., Hussain S., Dang V., Wright S., Cooper B., Byun T., Ramos C., Singh A., Parry G., Stagliano N., Griswold-Prenner I. (2015) Human secreted tau increases amyloid-beta production. Neurobiology of Aging. 36:693-709.

Busche M.A., Chen X., Henning H.A., Reichwald J., Staufenbiel M., Sakmann B., Konnerth A. (2012) Critical role of soluble amyloid- β for early hippocampal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PNAS*. 109:870-8745.

Cho Y.J., Chun Y.S., Rhyu K.H., Park Y.K., Ryu K.N., Park J.S., Liang H., Jung G.Y., Shin W.J. (2016) Amyloid Arthropathy of the Hip Joint Associated with Multiple Myeloma: A Case Report. *Hip & Pelvis*. 28:127–131.

Cohen S.R., Kalfon-Cohen E. (2013) Dynamic nanoindentation by instrumented nanoindentation and force microscopy: a comparative review. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 4:815-833.

Compta Y., Parkkinen L., O'Sullivan S.S., Vandrovcova J., Holton J.L., Collins C., Lashley T., Kallis C., Williams D.R., De Silva R., Lees A.J., Revesz T. (2011) Lewy- and Alzheimer-type pathologies in Parkinson's disease dementia: which is more important? *Brain*. 134: 1493–1505.

Danino D. (2008) Advances in atomic force microscopy investigations of biomolecules. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 13:315.

Del Tredici K., Hawkes C.H., Ghebremedhin E., Braak H. (2010) Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*. 119:703–713.

Dhouafli Z., Cuanalo-Contreras K., Hayouni E.A., Mays C.E., Soto C., Moreno-Gonzalez I. (2018) Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 75:3521–3538.

Dickson D.W. (2012) Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2:a009258.

Duyckaerts C., Delatour B., Potier M.C. (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*. 118:5–36.

Eikelenboom P., Veerhuis R., Familian A., Hoozemans J.J., van Gool W.A., Rozemuller A.J. (2008) Neuroinflammation in plaque and vascular beta-amyloid disorders: clinical and therapeutic implications. *Neurodegenerative Diseases*. 5:190–193.

Erickson H.P. (2009) Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*. 11:32-51.

Estrada L.D., Soto C. (2006) Inhibition of Protein Misfolding and Aggregation by Small Rationally-Designed Peptides. *Current Pharmaceutical Design*. 12: 2557-2567.

Estrada A.E., Zomosa V.C. (2017) Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Educación Bioquímica*. 36:2-11.

Feng Y., Wanga X.-P., Yang S.-G., Wangc Y.-J., Zhang X., Du X.-T., Sun X.-X., Zhao M., Huang L., Liu R.-T. (2009) Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *NeuroToxicology*. 30:986-995.

Fox N.C., Black R.S., Gilman S., Rossor M.N., Griffith S.G., Jenkins L., Koller M. (2005) Effects of A β immunization (AN1792) on MRI measures of cerebral volume in Alzheimer disease. *Neurology*. 64:1563–1572.

Fumimura Y., Ikemura M., Saito Y., Sengoku R., Kanemaru K., Sawabe M., Arai T., Ito G., Iwatsubo T., Fukayama M., Mizusawa H., Murayama, S. (2007) Analysis of the Adrenal Gland Is Useful for Evaluating Pathology of the Peripheral Autonomic Nervous System in Lewy Body Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 66: 354Y362.

Ge J.F., Qiao J.P., Qi C.C., Wang C.W., Zhou J.N. (2012) The binding of resveratrol to monomer and fibril amyloid beta. *Neurochemistry International*. 61:1192-1201.

Ghosh S., Banerjee S., Sil P.C. (2015) The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and Chemical Toxicology*. 83:111-124.

He X., Li Z., Rizak J.D., Wu S., Wang Z., He R., Su M., Qin D., Wang J., Hu X. (2017) Resveratrol Attenuates Formaldehyde Induced Hyperphosphorylation of Tau Protein and Cytotoxicity in N2a Cells. *Frontiers in Neuroscience*. 10:598.

Hnasko T.S., Hnasko R.M. (2015) ELISA: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 1318:87-96.

Hornedo-Ortega R., Cerezo A.B., De Pablos R.M., Krisa S., Richard T., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. (2018) Phenolic Compounds Characteristic of the Mediterranean Diet in Mitigating Microglia-Mediated Neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 12:373.

Hu H.-Y., Li Q., Cheng H.-C., Du H.-N. (2001) β -Sheet Structure Formation of Proteins in Solid State as Revealed by Circular Dichroism Spectroscopy. *Biopolymers*. 62: 15–21.

Irwin D.J., White M.T., Toledo J.B., Xie S.X., Robinson J.L., Van Deerlin V., Lee V. M.-Y., Leverenz J.B., Montine T.J., Duda J.E., Hurtig H.I., Trojanowski J.Q. (2012) Neuropathologic substrates of Parkinson's disease dementia. *Annals of Neurology*. 72: 587–598.

Ittner L.M., Götz J. (2011) Amyloid- β and tau-a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 12:67-72.

Ittner L.M., Ke Y.D., Delerue F., Bi M., Gladbach A., Van Eersel J., Wölfling H., Chieng B.C., Christie MD. J., Napier I.A., Eckert A., Staufenbiel M., Hardeman E., Götz J. (2010) Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- β Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell*. 142:387-397.

Jin K., Peel A.L., Mao X.O., Xie L., Cottrell B.A., Henshall D.C., Greenberg D.A. (2004) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *PNAS*. 101:343–347.

Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J., Lozano A.M., Lang A.E. (2013) α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of Neurology*. 73: 155–169.

Kalia L.V., Lang A.E. (2015) Parkinson's disease. *The Lancet*. 386:896-912.

Karuppagounder S.S., Pinto J.T., Xu H., Chen H.L., Beal M.F., Gibson GE (2009) Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 54:111-118.

Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C. (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1751:119-139.

Kessenbrock M., Groth G. (2017) Circular Dichroism and Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure and Protein–Protein Interactions in Ethylene Signaling. *Methods in Molecular Biology*. 1753:141-159.

Kim B. (2017) Molecular Profiling: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 1606:133-140.

Kovacs G.G. (2016) Molecular Pathological Classification of Neurodegenerative Diseases: Turning towards Precision Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 17:189.

Kovacs G.G., Wagner U., Dumont B., Pikkarainen M., Osman A.A., Streichenberger N., Leisser I., Verchère J., Baron T., Alafuzoff I., Budka H., Perret-Liaudet A., Lachmann I. (2012) An antibody with high reactivity for disease-associated α -synuclein reveals extensive brain pathology. *Acta Neuropathologica*. 124:37–50.

Ladiwala A.R.A., Dordick J.S., Tessier P.M. (2011) Aromatic Small Molecules Remodel Toxic Soluble Oligomers of Amyloid β through Three Independent Pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 286: 3209–3218.

Ladiwala A.R.A., Lin J.C., Bale S.S., Marcelino-Cruz A.M., Bhattacharya M., Dordick J.S., Tessier P.M. (2010) Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid $\alpha\beta$ into off-pathway conformers. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:24228–24237.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.

Lee P.-C., Bordelon Y., Bronstein J., Ritz B. (2012) Traumatic brain injury, paraquat exposure, and their relationship to Parkinson disease. *Neurology*. 79: 2061–2066.

Leroy K., Ando K., Laporte V., Dedeker R., Suain V., Authalet M., Héraud C., Pierrot N., Yilmaz Z., Octave J.-N., Brion J.-P. (2012) Lack of Tau Proteins Rescues Neuronal Cell Death and Decreases Amyloidogenic Processing of APP in APP/PS1 Mice. *The American Journal of Pathology*. 181:1928–1940.

Leuba G., Savioz A., Vernay A., Carnal B., Kraftsik R., Tardif E., Riederer I., Riederer B.M. (2008) Differential changes in synaptic proteins in the Alzheimer frontal cortex with marked increase in PSD-95 postsynaptic protein. *Journal of Alzheimer's Disease*. 15:139–151.

Li B., Yamamori H., Tatebayashi Y., Shafit-Zagardo B., Tanimukai H., Chen S., Iqbal K., Grundke-Iqbal I. (2008) Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 67:78–84.

Li Y., Zhou S., Li J., Sun Y., Hasimu H., Liu R., Zhang T. (2015) Quercetin protects human brain microvascular endothelial cells from fibrillar β -amyloid1–40-induced toxicity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 5:47-54.

Lin C.F., Yu K.H., Jheng C.P., Chung R., Lee C.I. (2013) Curcumin Reduces Amyloid Fibrillation of Prion Protein and Decreases Reactive Oxidative Stress. *Pathogens*. 2:506-519.

Lin X.-J., Zhang F., Xie Y.-Y., Bao W.-J., He J.-H., Hu H.-Y. (2006) Secondary Structural Formation of α -Synuclein Amyloids as Revealed by g-Factor of Solid-State Circular Dichroism. *Biopolymers*. 83: 226–232.

Lindberg D.J., Wenger A., Sundin E., Wesén E., Westerlund F., Esbjörner E.K. (2017) Binding of Thioflavin-T to Amyloid Fibrils Leads to Fluorescence Self-Quenching and Fibril Compaction. *Biochemistry*. 56:2170-2174.

Liu K., Solano I., Mann D., Lemere C., Mercken M., Trojanowski J.Q., Lee V.M.-Y. (2006) Characterization of A β 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 112:163-174.

Loewenbrück K., Storch A. (2011) Stem cell-based therapies in Parkinson's disease: future hope or current treatment option? *Journal of Neurology*. 258:S346–S353.

Malmos K.G., Blancas-Mejia L.M., Weber B., Buchner J., Ramirez-Alvarado M., Naiki H., Otzen D. (2017) ThT 101: a primer on the use of thioflavin T to investigate amyloid formation. *Amyloid*. 24:1-16.

Marambaud P., Zhao H., Davies P. (2005) Resveratrol Promotes Clearance of Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:37377-37382.

Morales A.N. (2008) Estudio de la Agregación de la Proteína Beta Amiloide a través de Técnicas de Microscopía de Fuerza Atómica Empleando el Péptido Disruptor LPFFD y Nanopartículas de Oro. Universidad de Chile.

Necula M., Kaye R., Milton S., Glabe C.G. (2007) Small Molecule Inhibitors of Aggregation Indicate That Amyloid β Oligomerization and Fibrillization Pathways Are Independent and Distinct. *The Journal of Biological Chemistry*. 282:10311-10324.

Nicoll J.A., Barton E., Boche D., Neal J.W., Ferrer I., Thompson P., Vlachouli C., Wilkinson D., Bayer A., Games D., Seubert P., Schenk D., Holmes C. (2006) A β species removal after A β_{42} immunization. *Journal of Neuropathology Experimental Neurology*. 65:1040–1048.

Nussbaum J.M., Schilling S., Cynis H., Silva A., Swanson E., Wangsanut T., Tayler K., Wiltgen B., Hatami A., Röncke R., Reymann K., Hutter-Paier B., Alexandru A., Jagla W., Graubner S., Glabe C.G., Demuth H.-U., Bloom G.S. (2012) Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β . *Nature*. 485:651-655.

Ozkan A.D., Topal A.E., Dana A., Guler M.O., Tekinay A.B. (2016) Atomic force microscopy for the investigation of molecular and cellular behavior. *Micron*. 89:60-76.

Pandey N., Strider J., Nolan W.C., Yan S.X., Galvin J.E. (2008) Curcumin inhibits aggregation of α -synuclein. *Acta Neuropathologica*. 115:479-489.

Pearson A.G., Byrne U.T., MacGibbon G.A., Faull R.L., Dragunow M. (2006) Activated c-Jun is present in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brains. *Neuroscience Letters*. 398:246-250.

Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. (2012) Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*. 27:76-89.

Rao P.P.N., Mohamed T., Teckwani K., Tin G. (2015) Curcumin Binding to Beta Amyloid: A Computational Study. *Chemical Biology & Drug Design*. 86:813-820.

Roberson E.D., Halabisky B., Yoo J.W., Yao J., Chin J., Yan F., Wu T., Hamto P., Devidze N., Yu G.-Q., Palop J.J., Noebels J.L., Mucke L. (2011) Amyloid- β /Fyn-Induced Synaptic, Network, and Cognitive Impairments Depend on Tau Levels in Multiple Mouse Models of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*. 31:700-711.

Roberson E.D., Searce-Levie K., Palop J.J., Yan F., Cheng I.H., Wu T., Gerstein H., Yu G.-Q., Mucke L. (2007) Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science*. 316:750-754.

Rutten S., Vriend C., Van den Heuvel O.A., Smit J.H., Berendse H.W., Van der Werf Y.D. (2012) Bright Light Therapy in Parkinson's Disease: An Overview of the Background and Evidence. *Parkinson's Disease*. 2012:1-9.

Sabogal-Guáqueta A.M., Muñoz-Manco J.I., Ramírez-Pineda J.R., Lamprea-Rodriguez M., Osorio E., Cardona-Gómez G.P. (2015) The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*. 93:134-145.

Savica R., Cannon-Albright L.A., Pulst, S. (2016) Familial aggregation of Parkinson disease in Utah. *Neurology*. 2: e65.

Schulz-Schaeffer W.J. (2010) The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathologica*. 120:131–143.

Shankar G.M., Li S., Mehta T.H., Garcia-Muñoz A., Shepardson N.E., Smith I., Brett F.M., Farrell M.A., Rowan M.J., Lemere C.A., Regan C.M., Walsh D.M., Sabatini B.L., Selkoe D.J. (2008) Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*. 14:837-842.

Shipton O.A., Leitz J.R., Dworzak J., Acton C.E.J., Tunbridge E.M., Denk F., Dawson H.N., Vitek M.P., Wade-Martins R., Paulsen O., Vargas-Caballero M. (2011) Tau Protein Is Required for Amyloid β -Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*. 31:1688-1692.

Soto C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett*. 498:204–207.

Spinelli K.J., Osterberg V.R., Meshul C.K., Soumyanath A., Unni V.K. (2015) Curcumin Treatment Improves Motor Behavior in α -Synuclein Transgenic Mice. *Plos One*. 10:e0128510.

Trackenberg C., Brandt R. (2009) Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid- β , wild-type tau, and R406W tau. *The Journal of Neuroscience*. 29:14439-14450.

Trackenberg C., Grinschgl S., Trutzel A., Santucci A.C., Frey M.C., Konietzko U., Grimm J., Brandt R., Nitsch R.M. (2013) NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. *Cell Death and Disease*. 4:e608.

Tysnes O.B., Storstein A. (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 124:901-905.

Upadhaya A.R., Kosterin I., Kumar S., Von Arnim C.A.F., Yamaguchi H., Fändrich M., Walter J., Rudolf D. (2014) Biochemical stages of amyloid- β peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain*. 137: 887–903.

Vossel K.A., Zhang K., Brodbeck J., Daub A.C., Sharma P., Finkbeiner S., Cui B., Mucke L. (2010) Tau Reduction Prevents A β -Induced Defects in Axonal Transport. *Science*. 330:198.

Wang R., Zhang Y., Li J., Zhang C. (2017) Resveratrol ameliorates spatial learning memory impairment induced by A β 1–42 in rats. *Neuroscience*. 344:39-47.

Yao H., Wynendaele E., Xu X., Kosgei A., De Spiegeleer B. (2018) Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 147:50-64.

Yilmaz U. (2015) Alzheimer-Demenz. *Der Radiologe*. 55:386-388.

Zempel H., Mandelkow E.-M. (2012) Linking Amyloid- β and Tau: Amyloid- β induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton. *Neurodegenerative Disease*. 10:64-72.

Zhao L., Hou L., Sun H., Yan X., Sun X., Li J., Bian Y., Chu Y., Liu Q. (2011) Apigenin Isolated from the Medicinal Plant *Elsholtzia rugulosa* Prevents β -Amyloid 25–35-Induces Toxicity in Rat Cerebral Microvascular Endothelial Cells. *Molecules*. 16:4005-4019.

Zhao L., Wang J.-L., Liu R., Li X.-X., Li J.-F., Zhang L. (2013) Neuroprotective, Anti-Amyloidogenic and Neurotrophic Effects of Apigenin in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Molecules*. 18:9949-9965.

Zhu M., Han S., Fink A.L. (2013) Oxidized quercetin inhibits α -synuclein fibrillization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830:2872-2881.