



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

# **EFFECTO NEUROPROTECTOR DE ANTOCIANOS DE UVA TINTA**



Pablo Morillo Roca



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**TRABAJO FIN DE GRADO. GRADO EN FARMACIA**

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE ANTOCIANOS DE UVA TINTA**

**-Pablo Morillo Roca-**

Presentación: septiembre 2022, Facultad de Farmacia, Sevilla.

Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina legal.

Tutora: Ruth Hornedo Ortega

Proyecto de carácter experimental

## **RESUMEN**

El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por una pérdida lenta y progresiva de memoria y otras habilidades cognitivas que resultan en una disminución de la calidad de vida del enfermo. Desde un punto de vista fisiopatológico, la causa principal de esta enfermedad es la deposición anormal y excesiva del péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ) que da lugar a la formación de placas amiloideas que desembocan en la muerte neuronal.

Las antocianidinas y antocianos son compuestos polifenólicos derivados del metabolismo secundario de las plantas y son responsables de aportar el color rojo, violeta y azul a las mismas. Además, numerosos estudios han demostrado que el consumo a través de la dieta de estos compuestos es capaz de prevenir la aparición de numerosas patologías, entre ellas, la enfermedad de Alzheimer.

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar las propiedades neuroprotectoras frente a la toxicidad causada por el péptido  $A\beta_{25-35}$  en células neuronales (línea celular PC12) de la antocianidina malvidina (MV) y de tres antocianos: malvidina-3-*O*-glucósido (MV3G), malvidina-3-*O*-(6"-*p*-acetil)-glucósido (MV3A) y malvidina-3-*O*-(6"-*p*-cumaroil)-glucósido (MV3C) aislados de hollejos de uva tinta (variedad Cabernet Sauvignon).

Ninguno de los cuatro compuestos resultó ser tóxico para el modelo celular. Con respecto al efecto neuroprotector frente a la toxicidad inducida por el péptido  $A\beta_{25-35}$ , tres de los cuatro compuestos fueron capaces de prevenir en diferente medida la muerte neuronal (MV>MV3C>MV3). Esta neuroprotección puede explicarse en parte a la capacidad de estos compuestos para disminuir las especies reactivas de oxígeno (EROs) y aumentar la expresión génica de varios vitagenes (sirtuína-1 (SIRT-1), hemoxygenasa-1 (HO-1) y la proteína de choque térmico 70 (HSP70)), los cuales están relacionados con la supervivencia celular.

### **Palabras clave**

antocianos / péptido  $A\beta_{25-35}$  / neuroprotección / EROs / Alzheimer

## ÍNDICE

### 1 INTRODUCCIÓN

- 1.1 Los compuestos fenólicos
- 1.2 Flavonoides: antocianidinas y antocianos
- 1.3 Antocianos en la uva tinta (*Vitis vinifera*)
- 1.4 Enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer

### 2 OBJETIVOS

### 3 MATERIALES Y MÉTODOS

- 3.1 Estándares y reactivos
- 3.2 Extracción, fraccionamiento y purificación de antocianos de uva
- 3.3 Cultivo y pase celular
- 3.4 Ensayo MTT
- 3.5 Medida de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs)
- 3.6 PCR a tiempo real (RT-PCR)
- 3.7 Análisis estadístico

### 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 4.1 Evaluación de la citotoxicidad y efecto neuroprotector de la MV, MV3G, MV3A y M3VC frente a la toxicidad inducida por el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>
- 4.2 Evaluación del efecto de la MV, MV3G, MV3A Y M3VC sobre la producción de EROs inducidos por el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>
- 4.3 Efecto de la MV, MV3G, MV3A y MV3C en la expresión génica de vitagenes

### 5 CONCLUSIONES

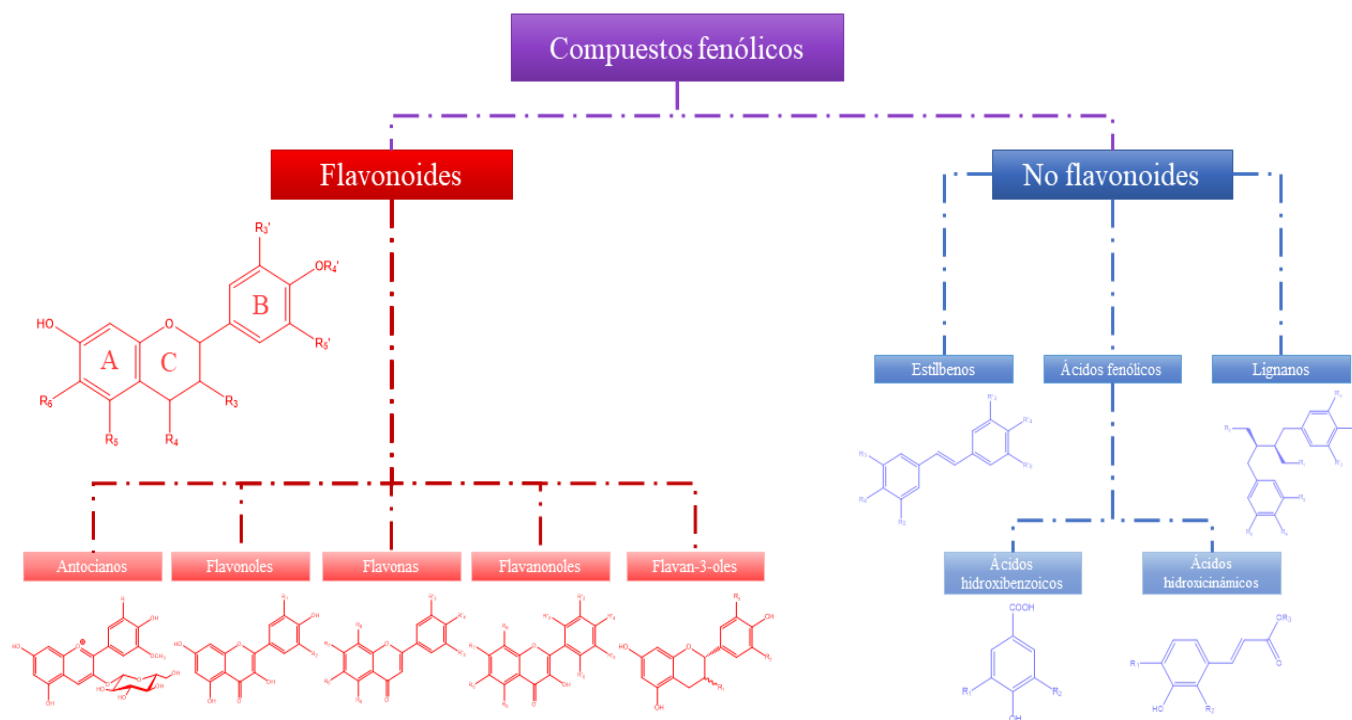
### 6 BIBLIOGRAFÍA

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Los compuestos fenólicos

El término polifenoles se utiliza para definir a un grupo de compuestos sintetizados exclusivamente por plantas, y que, por lo tanto, están presentes en nuestra alimentación gracias al consumo de frutas y verduras y sus derivados. Estos compuestos son metabolitos secundarios que presentan en su estructura uno o varios grupos hidroxilo (-OH) unidos a varios anillos aromáticos, concretamente anillos de benceno (Vermerris y Nicholson, 2006). Estos compuestos tienen la capacidad de aportar protección frente a diversos agentes que pueden causar algún tipo de daño a las plantas, como por ejemplo patógenos, radicales libres o la radiación ultravioleta (Naczki y Shahidi, 2004).

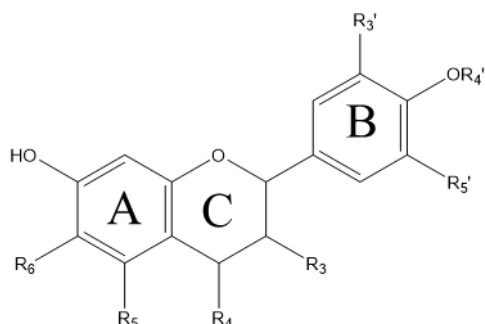
Los polifenoles componen un enorme grupo heterogéneo de sustancias, ya que se conocen multitud de compuestos diferentes (Li et al., 2014). Estos compuestos se dividen en dos familias principales: flavonoides y no flavonoides. Estas dos familias se pueden dividir a su vez en otras subfamilias en función del número de fenoles dentro de su estructura, sustituyentes, enlaces entre los grupos fenólicos, etc. (Figura 1) (Truzzi et al., 2021). Así podemos encontrar los ácidos fenólicos, los estilbenos y los lignanos en la subfamilia de los no flavonoides y los antocianos, flavonoles, flavonas, flavanonoles y flavan-3-oles en la subfamilia de los flavonoides.



**Figura 1:** Clasificación de los compuestos polifenólicos.

## 1.2 Flavonoides: antocianidinas y antocianos

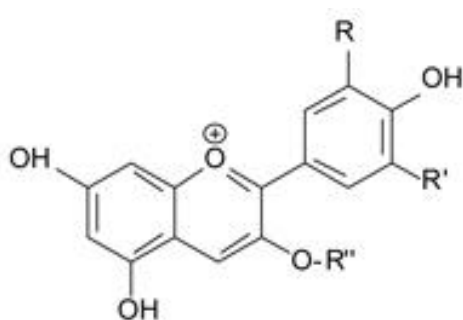
La familia de los compuestos polifenólicos flavonoides comparten químicamente una misma estructura de difenilpropano, compuesta por 15 carbonos dispuestos en configuración C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Esta estructura consiste en dos anillos aromáticos, A y B, unidos por un anillo heterocíclico, C (Figura 2) (Merken y Beecher, 2000).



**Figura 2:** Estructura general de un flavonoide

La gran diversidad estructural de los flavonoides se debe al grado de insaturación de los anillos, el patrón de hidroxilación y/o metilación y al tipo de azúcar como sustituyente en el anillo central, dando lugar a un amplio abanico de compuestos (Lunte, 1987).

Dentro de esta familia encontramos los compuestos antocianínicos, los cuales son solubles en agua (Prior et al., 1998) y ampliamente conocidos por ser los compuestos responsables de la pigmentación natural roja, azul y violeta de muchas frutas, tales como la uva o la fresa, y verduras como la berenjena o remolacha, así como de sus productos derivados como el vino tinto (Kong et al., 2003). La estructura de estos compuestos está basada en la estructura básica del 2-fenil-benzopirilo o ión flavilio (Figura 3).



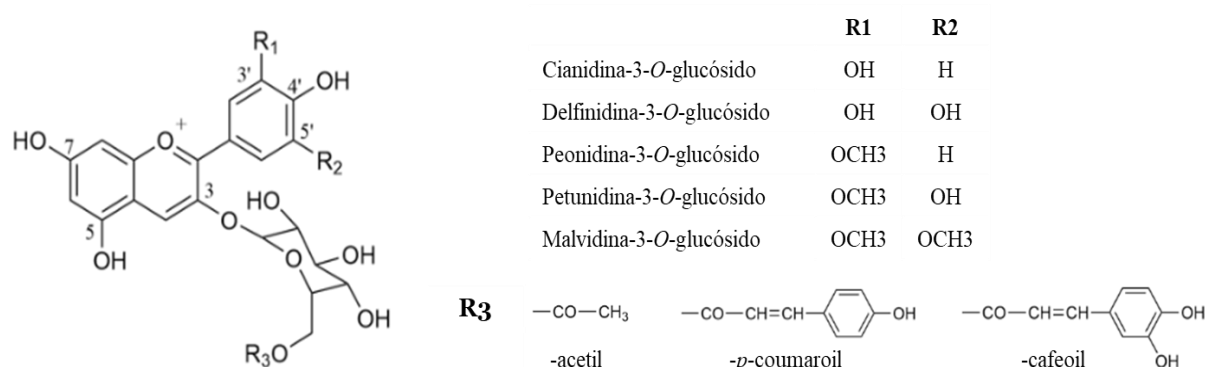
**Figura 3:** Estructura básica de las antocianidinas

Dentro de este grupo cabe resaltar la diferencia entre antocianidina y antociano. Desde el punto de vista químico, los antocianos (también llamados antocianinas) son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico.

En la naturaleza podemos encontrar diferentes tipos de antocianidinas (aglicona), pero las más abundantes en los vegetales son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina,

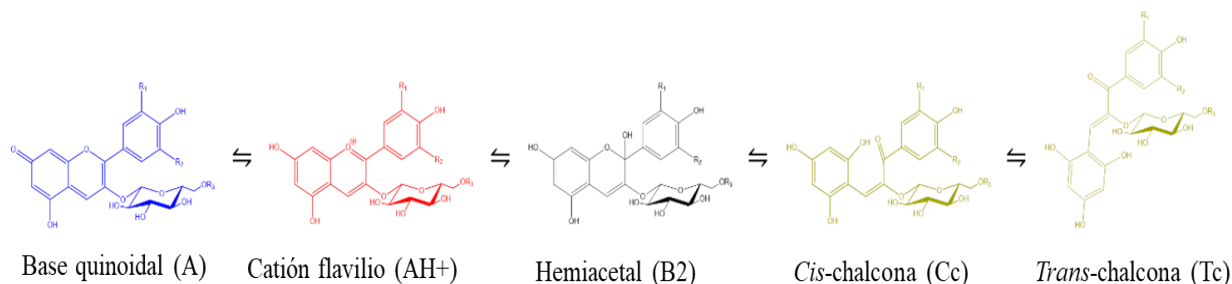
petunidina y malvidina (Del Valle et al., 2005). Estas antocianidinas pueden presentar diferentes patrones de hidroxilación y metilación en las posiciones 3' y 5', las cuales corresponden a R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 4) (Winkel-Shirley, 2001). Estas antocianidinas suelen presentar un grupo azucarado unido en la posición 3. El azúcar más común suele ser la glucosa, sin embargo, se pueden encontrar también unidos a esta posición otros azúcares como la galactosa, la xilosa, la L-arabinosa y la ramnosa.

Asimismo, estas formas monoglucosiladas pueden estar aciladas en la posición C6'' (R<sub>3</sub>) de la glucosa por ácidos aromáticos como el ácido caféico o alifáticos como el ácido acético (Figura 4) (Konczak et Zhang, 2004; Andersen et Jordheim, 2006).



**Figura 4.** Estructura básica de un antociano y tipos según las sustituciones en los radicales (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>).

Las antocianinas son compuestos muy inestables y se ven afectados por diversos factores tales como el incremento del pH, el aumento de temperatura y la concentración de oxígeno. El pH es el factor que más afecta a la estabilidad de estos compuestos, así su estructura y color dependen del pH al que se encuentren. A pH muy ácido (pH 0-1) la forma predominante es el catión flavilio (AH<sup>+</sup>) que presenta un color rojizo y es la forma más estable de un antociano. A medida que el pH va aumentando por el efecto de una base, por ejemplo, se producen dos reacciones paralelas: una desprotonación del ion flavilio para dar lugar a la base quinoidal de color azul (A) (pH=2-4) o bien una hidratación en posición 2 originando el hemiacetal incoloro (B2). A pH más básico la forma hemiacetal puede sufrir una tautomerización para dar lugar a *cis*-chalcona (Cc), que a su vez puede formar la *trans*-chalcona (Tc) mediante un proceso de isomerización (Figura 5) (Brouillard et al., 1978).



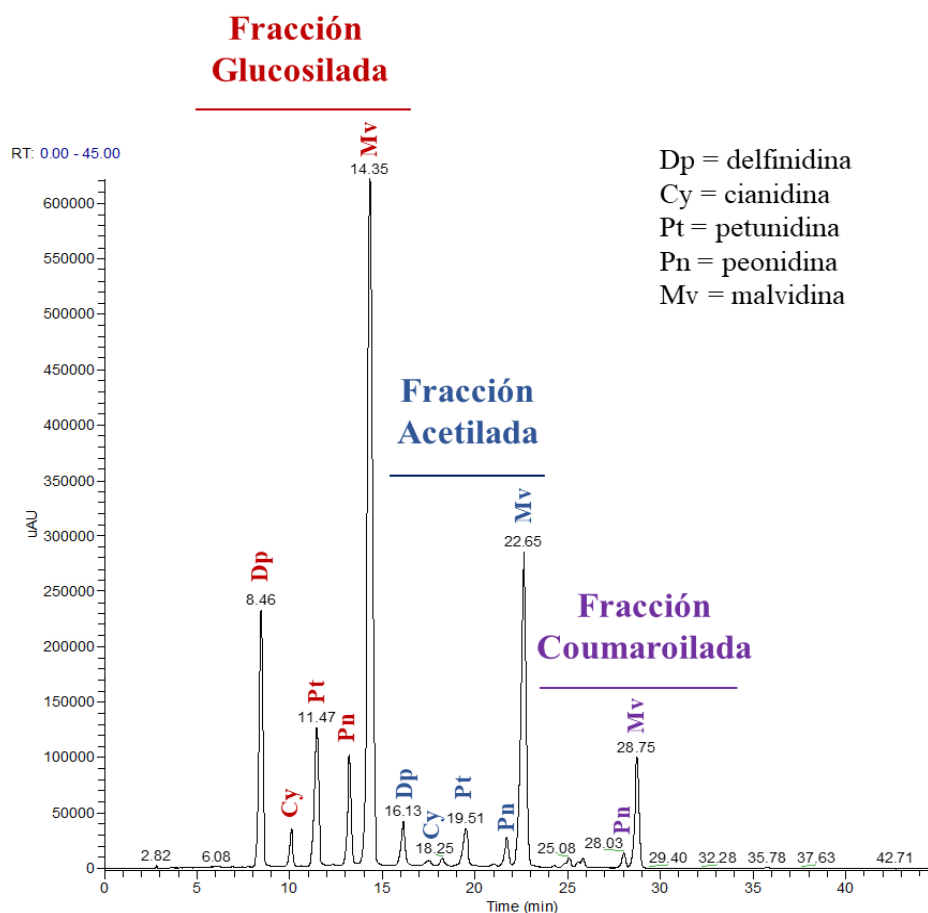
**Figura 5:** Reacciones de una antocianina en medio ácido.

El interés mayoritario de estos compuestos siempre ha residido en su utilización como pigmentos en la industria alimentaria (Delgado-Vargas et al., 2003), no obstante, son poseedores de otras propiedades más orientadas a la salud ya que numerosos estudios han demostrado que el consumo de alimentos ricos en estos compuestos puede prevenir la aparición de patologías como cardiovasculares o neurodegenerativas (Konczak et al., 2004; Isaak et al., 2017).

### 1.3 Antocianos en la uva tinta (*Vitis vinifera*)

Los compuestos antociánicos se encuentran principalmente en la piel u hollejo de la uva tinta en su estado de maduración. También podemos encontrar esta familia de sustancias en las uvas denominadas “teinturier”, las cuales presentan una pulpa coloreada (Burns et al., 2002). Estos compuestos gracias a su naturaleza hidrosoluble, pasan al vino mediante el proceso de maceración en presencia de hollejos llevado a cabo para la elaboración del vino tinto. El contenido aproximado de antocianos en la piel de la uva oscila entre 11,47 y 29,83 g/kg de materia seca (Pinelo et al., 2006). En el vino tinto estas cantidades pueden llegar a alcanzar los 700 mg/L (Nemzer et al; 2022). En las variedades de uva *Vitis vinifera* encontramos principalmente 15 antocianos siendo los principales los 3-*O*-monoglucósidos de la delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Figura 6). De entre ellos la malvidina-3-*O*-glucósido es generalmente el más abundante con valores que oscilan alrededor de los 5,42 mg/g de materia seca (Acevedo et al., 2012). Además, podemos encontrar las formas aciladas 3-*O*-(6"-*p*-cumaroil)-glucósido y 3-*O*-(6"-acetil)-glucósido de la delfinidina, petunidina, peonidina y malvidina.





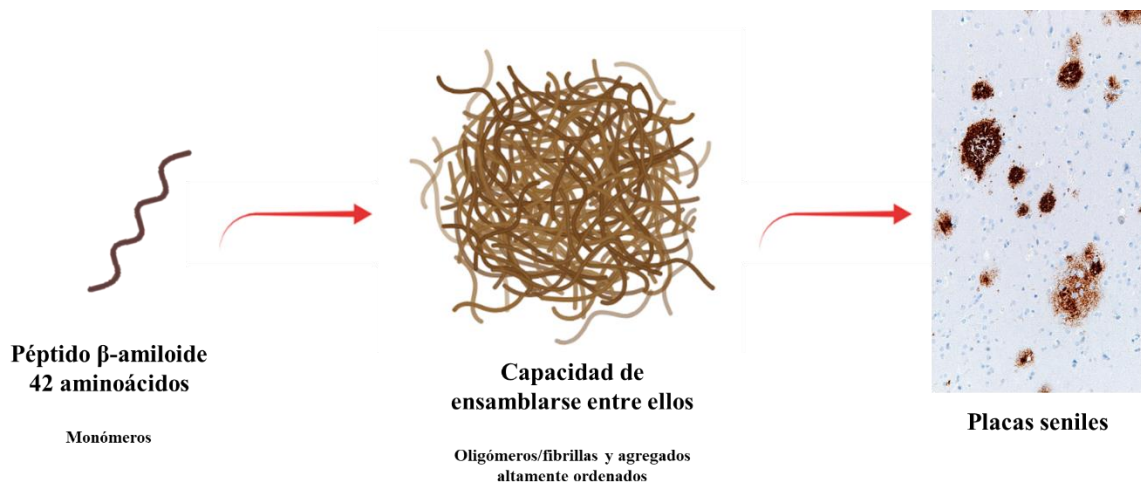
**Figura 6:** Cromatograma (HPLC-DAD) de antocianos del extracto de piel de uva (*Cabernet sauvignon*) (Trabajo de Fin de Master realizado por Maël Durant: *Etude des composés phénoliques du raisin & du vin en lien avec l'astringence*, 2020-2021).

#### 1.4 Enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer

Las enfermedades neurodegenerativas representan hoy día un devastador problema de salud pública. La enfermedad de Alzheimer es el trastorno más común ocasionando el 65-70% de las demencias en personas mayores de 65 años (Gálvez et al., 2001). Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria a corto y largo plazo que desemboca en un déficit cognitivo empeorando la calidad de vida de la persona (Scheltens et al., 2016). En 2018 el número total de casos en el mundo fue de aproximadamente 50 millones de personas, y se cree que para el año 2050 estas cifras alcanzarán los 82 millones (Patterson, 2018).

La fisiopatología del Alzheimer está caracterizada por una agregación anormal del péptido beta-amiloide ( $A\beta$ ), el cual se acumula formando agregados que conforman las denominadas placas seniles que se encuentran en el cerebro de pacientes, principal característica de esta enfermedad (Kawahara y Kuroda., 2000) (Figura 7).

El proceso de agregación de este péptido se desarrolla en una serie de pasos consecutivos que comienza cuando las formas solubles de estas (las cuales tienen la capacidad de autoensamblarse) dan lugar a agregados tóxicos de protofibrillas y fibrillas, los cuales son los responsables de los efectos neurotóxicos (Pike et al., 1993; Lashuel et al., 2002; Volles y Lansbury., 2003; Outeiro et al., 2008). Fisiológicamente podemos encontrar dos tipos de péptidos A $\beta$ , el A $\beta_{1-42}$  (formado por 42 aminoácidos) y el péptido A $\beta_{1-40}$  (40 aminoácidos). El primero de estos es más hidrófobo y propenso a la formación de oligómeros y fibrillas. La neurotoxicidad, el estrés oxidativo (producción de especies reactivas de oxígeno (EROs)) y la neuroinflamación inducidas por el péptido A $\beta$  son consideradas las principales causas de la muerte neuronal ocurrida en pacientes de Alzheimer (Cummings et al., 1998; Kelly y Ferreira., 2006).



**Figura 7:** Formación de placas seniles a partir del péptido  $\beta$ -amiloide.

El elevado número de casos existentes de esta enfermedad conduce a la siguiente reflexión: “La prevención del Alzheimer es la vía más segura para evitar su propagación” (Guzman-Martinez et al., 2021). Diversos estudios han demostrado la efectividad de los estilos de vida saludables y otras acciones no farmacológicas como la estimulación sensorial, el mindfulness y especialmente la nutrición a la hora de prevenir esta enfermedad y reducir los síntomas de aquellas personas ya diagnosticadas (Krivanek et al., 2021). Tanto es así que numerosos estudios indican que la dieta Mediterránea es un patrón alimentario que se ha asociado con la prevención de la enfermedad de Alzheimer (Scarmeas et al., 2006, Scarmeas et al., 2009, Gardener et al., 2012, Casamenti et al., 2015 Gardener y Caunca., 2018). El elevado consumo de frutas y vegetales junto con el consumo moderado de aceite de oliva y vino tinto característicos de dieta, todos ellos

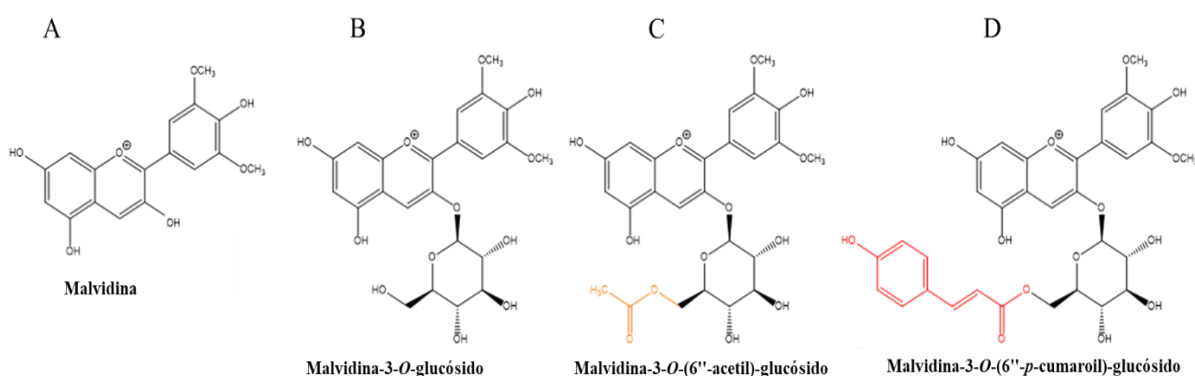
excelentes fuentes de polifenoles, han sido asociados a estos efectos preventivos (Kelsey et al., 2010)

Los antocianos han demostrado mediante diversos estudios ser compuestos capaces de prevenir enfermedades neurodegenerativas al poseer propiedades neuroprotectoras. El efecto neuroprotector de estos compuestos puede relacionarse con su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y disminuir así las concentraciones de EROs reduciendo la apoptosis y mejorando la memoria, así como la capacidad de aprendizaje y funciones cognitivas (Aquilano et al., 2008; Kovacsova et al., 2010; Angeloni et al., 2012). Recientemente se ha observado una reducción de la agregación del péptido A $\beta$  y una prevención del estrés oxidativo por parte de un extracto de fresa cuyo antociano mayoritario es la pelargonidina-3-*O*-glucósido en *Caenorhabditis elegans* (Navarro-Hortal et al., 2022). Por otro lado, diferentes extractos enriquecidos en antocianos procedentes de bayas como la grosella negra y el arándano han demostrado ser capaces de reducir significativamente los niveles de péptido A $\beta$ <sub>1-40</sub> y A $\beta$ <sub>1-42</sub> en ratones transgénicos con Alzheimer. Esta reducción se ha relacionado con la capacidad de estos extractos para disminuir los niveles de la proteína precursora amiloidea (APP) en la corteza cerebral (Afzal et al., 2019). Además de extractos enriquecidos en antocianos, numerosos estudios se han realizado con objeto de evaluar las propiedades neuroprotectoras de antocianos puros. Ullah y sus colaboradores realizaron ensayos *in vitro* en células neuronales del hipocampo de ratón (HT22) demostrando que la delphinidina-3-*O*-glucósido, la cianidina-3-*O*-glucósido y la petunidina-3-*O*-glucósido presentan actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo y la apoptosis inducida por el ácido kaínico (Ullah et al., 2014). Otros estudios realizados con la cianidina-3-*O*-glucósido han probado que este antociano es capaz de evitar la agregación del péptido A $\beta$  y disminuir las EROs en las células neuronales SK-N-SH y SH-SY5Y frente a la toxicidad y al estrés oxidativo inducidos por el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> y A $\beta$ <sub>1-40</sub> (Tarozzi et al., 2008; Thummayot et al., 2014). En otro estudio en el cual se evaluaron las propiedades neuroprotectoras de varios antocianos puros (pelargonidina-3-*O*-glucósido, la cianidina-3-*O*-glucósido y la malvidina-3-*O*-glucósido) frente a la toxicidad inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células gliales, se demostró que la cianidina-3-*O*-glucósido es el antociano que presenta una actividad protectora más potente seguido de la malvidina-3-*O*-glucósido (Ereminas et al., 2017). Otro trabajo publicado más recientemente y en el que se realizó un co-cultivo compuesto por las células microgliales BV2 y neuronales PC12 demostró que la

cianidina-3-*O*-glucósido tienen capacidad para disminuir la activación de células BV2 por parte del lipopolisacárido (LPS), y evitando por consiguiente la liberación de sustancias pro-inflamatorias (prostaglandinas e interleucinas) y la muerte de las neuronas (Kaewmool et al., 2020). Además, en el estudio realizado por Shih et al. con la antocianidina malvidina y el antociano malvidina-3-*O*-glucósido se puso de manifiesto que ambos compuestos disminuyen la producción de EROs inducidas por la combinación del péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> y A $\beta$ <sub>1-40</sub> en células de neuroblastoma de ratón (Neuro-2A) (Shih et al., 2011). En la mayoría de estos estudios se han evaluado los efectos de antocianidinas o antocianos que están disponibles comercialmente, sin embargo y como se ha explicado anteriormente, estos compuestos pueden acilarse dando lugar a formas químicas más complejas. La problemática reside en que estos últimos no se encuentran disponibles en el mercado requiriéndose por tanto su aislamiento y purificación.

## 2 OBJETIVO

Basado en todo lo explicado anteriormente el objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto neuroprotector y el posible mecanismo de acción de la malvidina (antocianidina) (MV) (A) y tres antocianos aislados de hollejos de uva tinta: malvidina-3-*O*-glucósido (MV3G) (B), malvidina-3-*O*-(6''-acetil)-glucósido (MV3A) (C) y malvidina-3-*O*-(6''-*p*-cumaroil)-glucósido (MV3C) (D) (Figura 8) frente a la toxicidad inducida por el péptido A $\beta$  (fragmento 25-35) en una línea celular modelo neuronal (células PC12).



**Figura 8:** Estructura química de los compuestos objeto de estudio.

### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Estándares y reactivos**

Los estándares y reactivos utilizados fueron adquiridos de los siguientes proveedores: Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania (dimetilsulfóxido (DMSO), medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)-Glutamax, tripsina-EDTA, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), solución salina tamponada con fosfato (PBS), L-glutamina, suero de caballo, suero fetal bovino, penicilina, estreptomicina, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), alcohol isopropílico y cloroformo y péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>); Panreac Applichem, Castellar del Vallès, Barcelona, España (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, agua de calidad para biología molecular, etanol); Invitrogen, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos (azul de tripano); Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos (Kit de síntesis de ADNc); Meridian Bioscience, Cincinnati, Ohio, Estados Unidos (kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX, TRIsure™); American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, Estados Unidos (células PC12). Extrasynthese, Genay, Francia (malvidina). La malvidina-3-*O*-glucósido, la malvidina-3-*O*-(6"-acetil)-glucósido y la malvidina-3-*O*-(6"-*p*-cumaroil)-glucósido fueron aisladas de hollejos de uva en el Instituto de Ciencias de la Viña y del Vino (Universidad de Burdeos, Francia) por la Dra. Hornedo-Ortega.

#### **3.2 Extracción, fraccionamiento y purificación de antocianos de uva**

La malvidina-3-*O*-glucósido, la malvidina-3-*O*-(6"-acetil)-glucósido y la malvidina-3-*O*-(6"-*p*-cumaroil)-glucósido fueron aisladas de hollejos de uva de la variedad Cabernet Sauvignon. Para ello la piel de la uva fue separada de la pulpa, posteriormente lavada y liofilizada para eliminar el agua. Posteriormente se realizó una doble extracción con metanol y 0,1 % de ácido trifluoroacético (2 litros) en agitación a temperatura ambiente. A continuación, el disolvente conteniendo los antocianos se evaporó y se liofilizó. A fin de eliminar los azúcares y otros compuestos polares el extracto bruto obtenido se prepurificó con la resina Amberlite XAD-16. Este extracto enriquecido en antocianos y libre de azúcar fue inyectado en un sistema HPLC semipreparativa que permitió el aislamiento de los tres antocianos a una pureza superior al 99%.

#### **3.3 Cultivo y pase celular**

Las células PC12 (línea celular derivada de feocromocitoma de médula adrenal de rata) fueron obtenidas de la ATCC. Previamente a la introducción de todos los materiales necesarios en la campana de flujo laminar para mantener la esterilidad, se procede a su

limpieza con etanol al 70%. Las células se cultivaron en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>, conteniendo este 20 ml de medio DMEM-Glutamax, suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, suponiendo un 1% (v/v) total de antibiótico, un 15% (v/v) de suero de caballo y un 2,5% (v/v) de suero fetal bovino. Las células deben mantenerse en incubadores a una temperatura y humedad controlada (37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>).

Cada 3-4 días (al observar al microscopio una confluencia elevada, en torno al 85-90%), el medio de cultivo se retira y se añaden 5 ml de PBS con objeto de retirar las posibles células muertas. Una vez realizado esto, se procede a la tripsinización de las células, ya que, al tratarse de células adherentes, necesitan ser despegadas del fondo del frasco usando 5 ml de tripsina-EDTA e incubando de nuevo durante 5 minutos a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, se añaden 10 ml de PBS y el contenido del frasco se pasa a un tubo tipo falcon para su posterior centrifugación durante 5 minutos a 1200 rpm y temperatura ambiente (21°C).

Una vez terminada la centrifugación se descarta el sobrenadante y el pellet (las células) se resuspenden con 5 ml de DMEM-Glutamax. De esta solución de células se pipetea 10 µl a un tubo eppendorf a los que se le añaden 90 µl de azul de tripano para su posterior contaje con la cámara de Neubauer. Una vez contadas, se subcultivan (2-3 millones) las células en un nuevo frasco de 75 cm<sup>2</sup>.

### **3.4 Ensayo MTT**

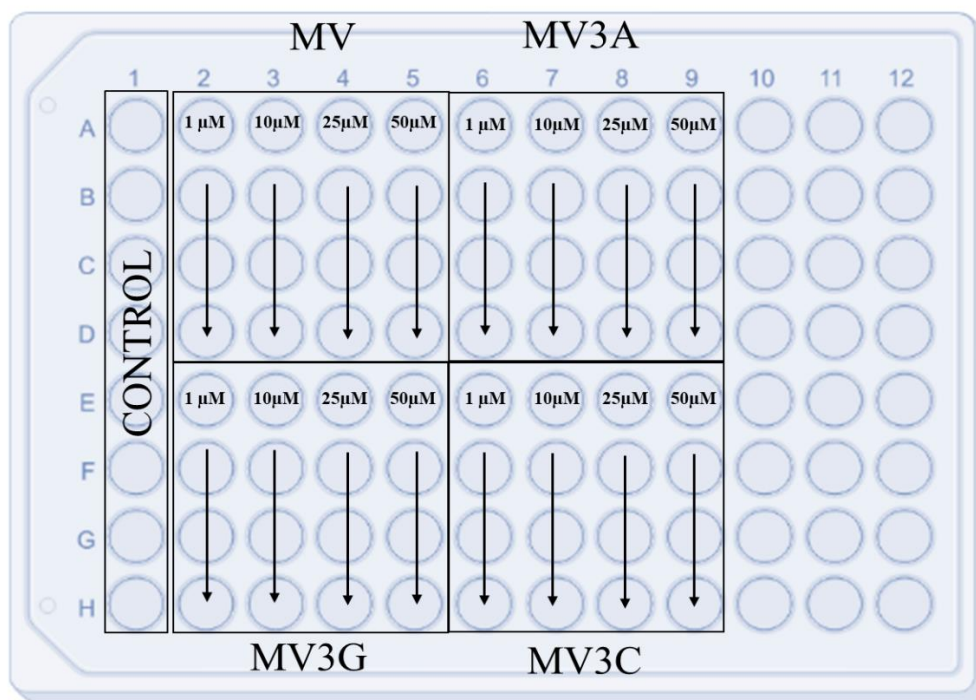
Para evaluar tanto la citotoxicidad como la neuroprotección de los compuestos frente a la toxicidad inducida por el péptido Aβ<sub>25-35</sub> se utilizó el ensayo MTT. Este ensayo se fundamenta en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas (Mosmann, 1983). Para ello se subcultivaron las células PC12 en placas de 96 pocillos (Figura 8) a una densidad de 30.000 células/pocillo en 200 µl de DMEM-Glutamax durante 24 horas.

Para determinar la citotoxicidad se prepararon diluciones de los 4 compuestos: malvidina, malvidina-3-*O*-glucósido, la malvidina-3-*O*-(6"-acetil)-glucósido y la malvidina-3-*O*-(6"-*p*-cumaroil)-glucósido a 4 concentraciones (1, 10, 25 y 50 µM) con DMEM

suplementado con glutamina (20 mM) a partir de soluciones stock de cada compuesto a 40 mM.

Posteriormente se añadieron los compuestos (cada concentración por cuadruplicado) en las placas. De la misma forma se añadió solo medio de cultivo a varios pocillos como control (Figura 9). La placa fue incubada durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez pasado el tiempo de tratamiento se determinó la viabilidad celular añadiendo 200 µl de una solución de MTT (0,5 mg/ml) en medio DMEM suplementado con glutamina (20 mM) a cada pocillo. Seguidamente, la placa se incubó durante 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, los cristales de formazan de color azul formados en el fondo de cada pocillo se solubilizaron con 100 µL/pocillo de DMSO durante 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 540 nm mediante la utilización de un lector de placas (Synergy HT, Biotek). Los resultados fueron expresados en porcentajes con respecto a la absorbancia de las células control ( $n=3$ ).

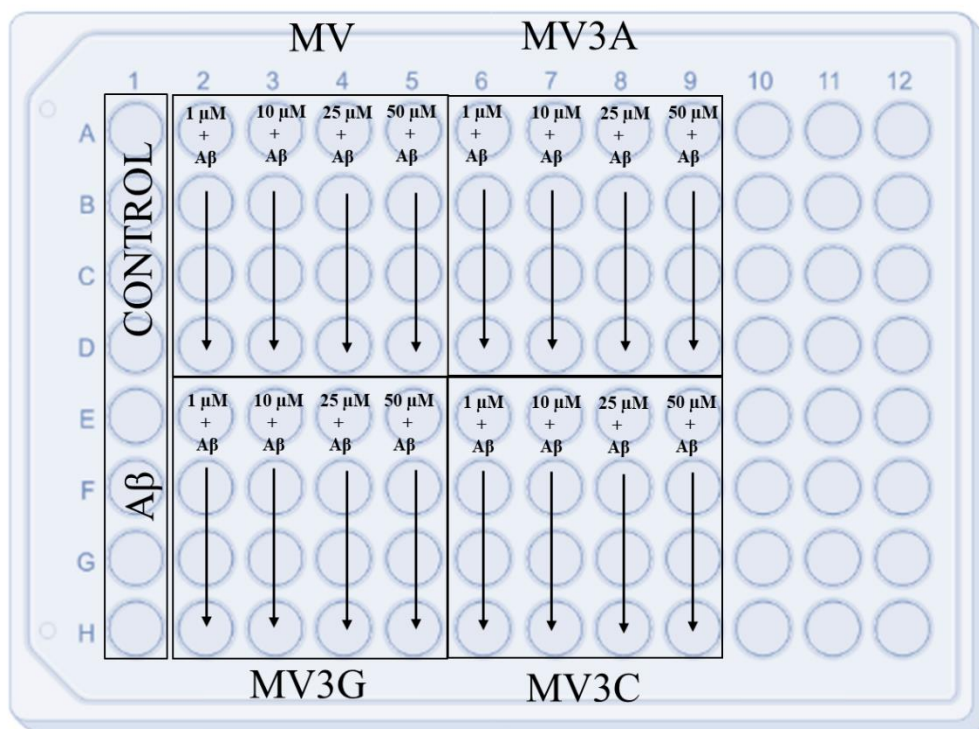


**Figura 9:** Diseño de las placas para citotoxicidad. Malvidina (MV), malvidina-3-O-glucósido (MV3G), malvidina-3-O-(6''-p-acetil)-glucósido (MV3A) y malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil)-glucósido (MV3C). Las concentraciones ensayadas fueron 1, 10, 25 y 50 µM.

Para evaluar la neuroprotección frente a la toxicidad inducida por el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub>, se trataron las células con los cuatro compuestos a las cuatro concentraciones evaluadas,



pero fueron co-tratadas al mismo tiempo con el péptido A $\beta_{25-35}$  (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ). Además del control (sólo células y medio), se incubaron 4 pocillos con péptido A $\beta_{25-35}$  sirviendo este como control positivo (Figura 10). Al igual que para la evaluación de la citotoxicidad, el co-tratamiento tuvo una duración de 24 horas. Pasado este tiempo se repitió el ensayo MTT anteriormente descrito y se midió la absorbancia a 540 nm en el lector de placas (Synergy HT, Biotek). Los resultados fueron presentados como porcentajes con respecto a la absorbancia de las células control ( $n=3$ ).



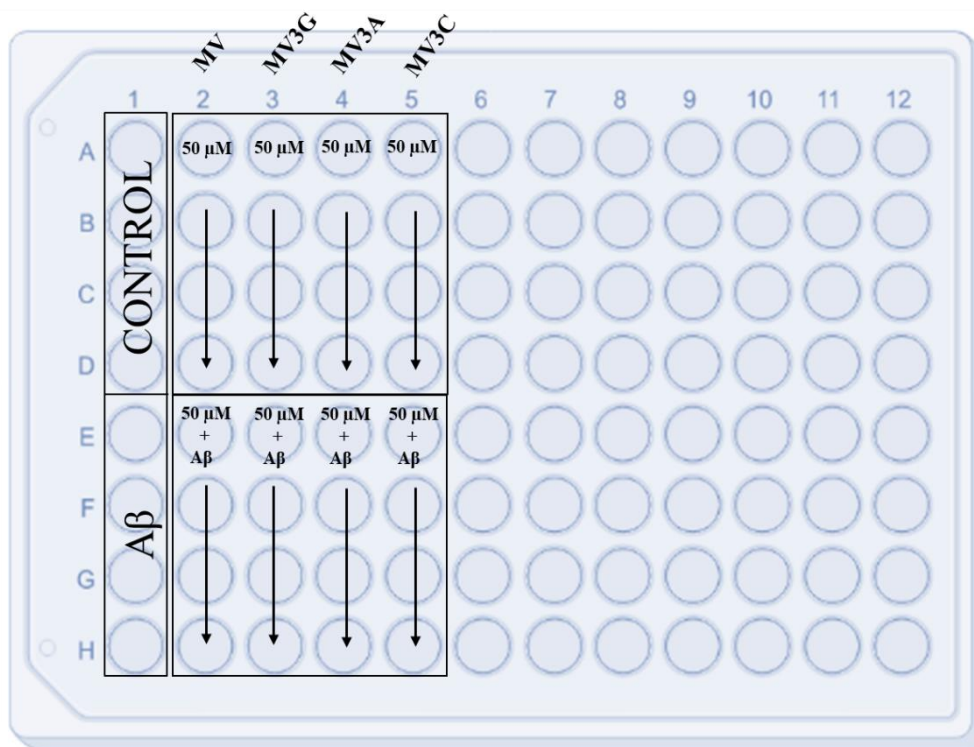
**Figura 10:** Diseño de las placas para evaluar la neuroprotección de los compuestos objeto de estudio frente a la toxicidad inducida por el péptido A $\beta_{25-35}$ . Malvidina (MV), malvidina-3-O-glucósido (MV3G), malvidina-3-O-(6''-p-acetil)-glucósido (MV3A) y malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil)-glucósido (MV3C). Las concentraciones ensayadas fueron 1, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$  junto con el péptido A $\beta_{25-35}$  (10  $\mu\text{M}$ ).

### 3.5 Medida de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (EROs)

Para determinar el efecto antioxidante de la MV y de los tres antocianos objeto de estudio frente al estrés oxidativo inducido por el péptido A $\beta_{25-35}$  se utilizó la sonda fluorescente DCFH-DA. El DCFH-DA es capaz de atravesar la membrana de las células y emitir fluorescencia cuando hay presencia de EROs en el citoplasma celular (Wardman, 2007). Para la realización de este ensayo se sembraron las células PC12 a una densidad de 30.000



células/pocillo en placas de 96 pocillos negras con fondo negro y fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo se realizó un co-tratamiento de los compuestos (concentración final de 50 µM) junto al péptido Aβ<sub>25-35</sub> (10 µM) y se incubó la placa durante 24 horas (Figura 11). Finalizado el co-tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y se añadió a cada pocillo 100 µl de una solución de DCFH-DA (5 µM en PBS). La placa se introdujo en el incubador durante 30 minutos y la intensidad de fluorescencia fue medida inmediatamente después en un lector de placas (Synergy HT, Biotek) a las longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. Los resultados fueron expresados en fluorescencia (unidades arbitrarias) con respecto a las células control (*n*=3).

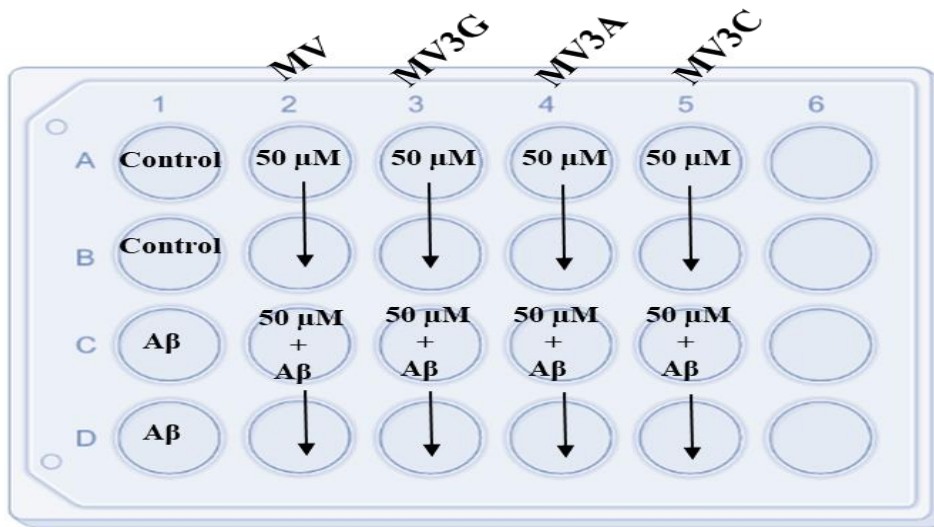


**Figura 11:** Diseño de las placas para evaluar la producción de EROs inducida por el péptido Aβ<sub>25-35</sub>: malvidina (MV), malvidina-3-O-glucósido (MV3G), malvidina-3-O-(6"-p-acetil)-glucósido y malvidina-3-O-(6"-p-cumaroil)-glucósido (MV3C). La concentración ensayada fue 50 µM con y sin el péptido Aβ<sub>25-35</sub> (10 µM).

### 3.6 PCR a tiempo real (RT-PCR)

Las células PC12 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 450.000 células/pocillo durante 24 horas a 37°C. Al día siguiente se trataron las células de la

siguiente manera por duplicado: las muestras control solo con medio, un control positivo con péptido A $\beta_{25-35}$ , los compuestos (malvidina, malvidina-3-*O*-glucósido, malvidina-3-*O*-(6''-acetil)-glucósido y malvidina-3-*O*-(6''-*p*-cumaroil) a una concentración de 50  $\mu$ M junto con péptido A $\beta_{25-35}$  y sin la presencia de este (volumen final de cada pocillo 500  $\mu$ L) durante 24 horas (Figura 12). Finalizado el tratamiento las células se recogieron con TRIsure™ y el ARN se extrajo de las células siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad de ARN se cuantificó con un espectrofotómetro (NanoDrop™, Thermo Fisher Scientific).



**Figura 12:** Diseño de las placas para la extracción del material genético (ARN) necesario para la RT-PCR. Células solo con medio (Control, C-), células con péptido A $\beta_{25-35}$ , (A $\beta$ , C+), malvidina (MV), Malvidina-3-*O*-glucósido (MV3G), Malvidina-3-*O*-(6''-*p*-acetil)-glucósido (MV3A) y Malvidina-3-*O*-(6''-*p*-cumaroil)-glucósido (MV3C) (50  $\mu$ M) con y sin el péptido A $\beta_{25-35}$  (10  $\mu$ M).

El ADNc se obtuvo utilizando el Kit de síntesis de ADNc a partir de 180  $\mu$ g de ARN en un termociclador (TC-5000, Thermo Fisher Scientific) en tres ciclos: 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 70°C. Posteriormente a cada muestra se le añadieron 180  $\mu$ L de agua de calidad para biología molecular. La RT-PCR se realizó utilizando el kit SensiFAST™ SYBR® No-ROX y usando como cebadores: SIRT-1, Hsp70, HO-1. La  $\beta$ -actina se utilizó como gen housekeeping (Tabla 2). Los resultados se calcularon a partir de los valores umbrales del número de ciclos (Ct, *cycle threshold*). Se normalizaron los datos utilizando como referencia los valores Ct de la  $\beta$ -actina.

**Tabla 2:** Cebadores empleados en la RT-PCR

<i>ARNm</i>	<i>Cebadores</i>
<i>β-actina</i>	<i>Forward: 5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCA-3'</i> <i>Reverse: 5'-TTTGATGTCACGCACGATTTC-3'</i>
<i>SIRT-1</i>	<i>Forward: 5'TCATTCTGTGAAAGTGATGACGA-3'</i> <i>Reverse: 5'-GCCAATCATGAGGTGTTGCTG-3'</i>
<i>Hsp70</i>	<i>Forward: 5'- GGGCTCTGAGGAACCGAGC-3'</i> <i>Reverse: 5'-CAGCCATTGGCGTCTCTC-3'</i>
<i>HO-1</i>	<i>Forward: 5'-ACTTTCAGAAGGGTCAGGTGTCC-3'</i> <i>Reverse: 5'-TTGAGCAGGAAGGCGGTCTTAG-3'</i>

### **3.7 Análisis estadístico**

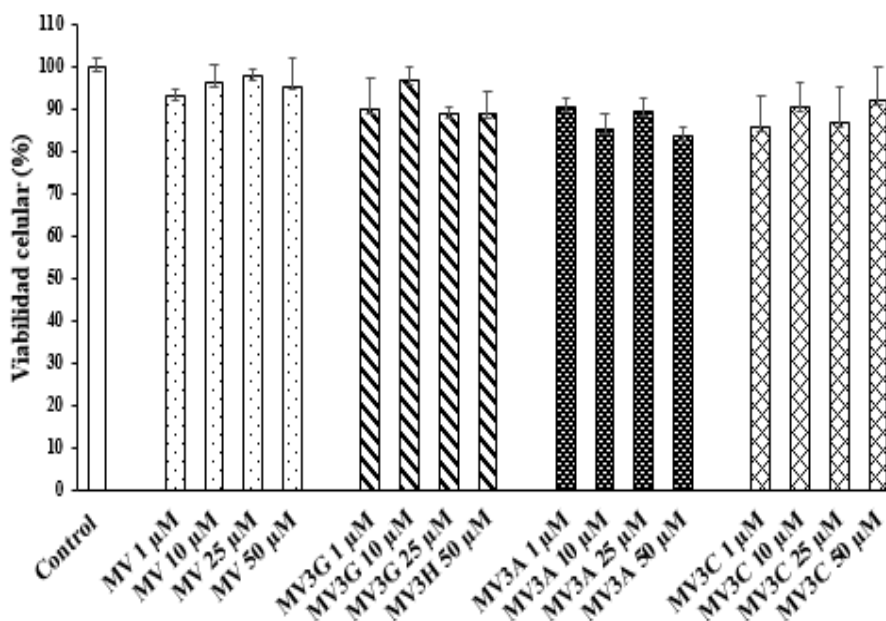
Para la exploración de diferencias significativas en los ensayos de neuroprotección, producción de EROs y expresión de los genes SIRT-1, HSP70 y HO-1 se utilizó un análisis estadístico unidireccional (ANOVA) usando el software Statistica versión 14.0.0.15. La significancia se fijó en un valor alfa  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Evaluación de la citotoxicidad y efecto neuroprotector de la MV, MV3G, MV3A y M3VC frente a la toxicidad inducida por el péptido Aβ<sub>25-35</sub>**

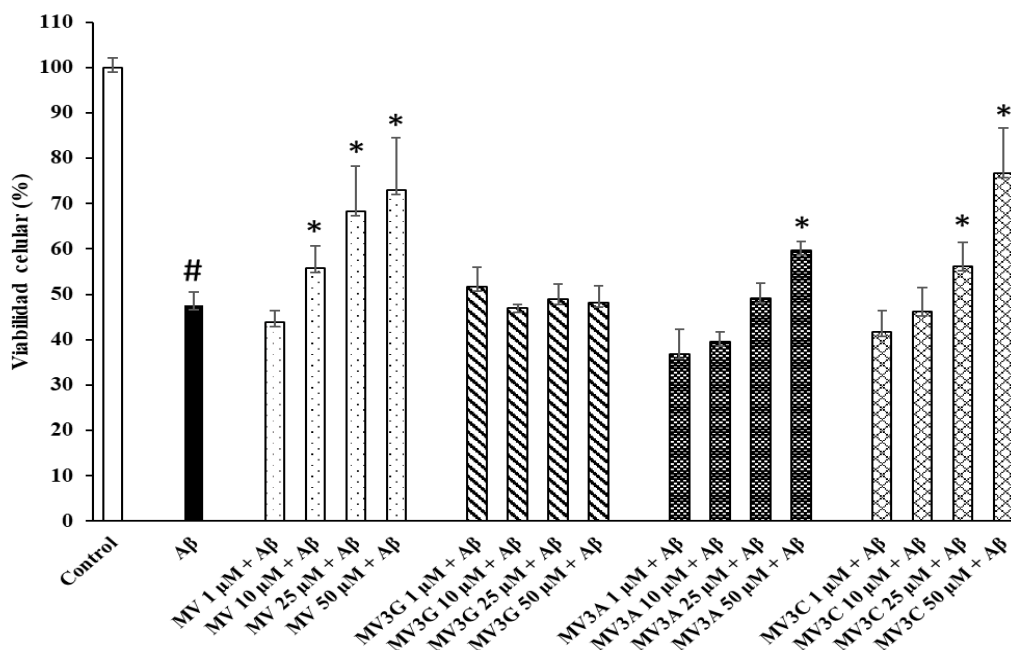
El Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva carente de un remedio eficaz para su tratamiento (Suttisansanee et al., 2020). El ensamblaje anómalo del péptido Aβ es la causa de la formación de agregados insolubles en cerebros los cuales son los principales causantes de la muerte neuronal en pacientes del Alzheimer (Pike et al., 1993). Conseguir evitar esta agregación evitándose por consiguiente la neurotoxicidad asociada, puede constituir la base para prevenir esta enfermedad (Pike et al., 1993; Lashuel et al., 2002; Volles y Lansbury., 2003; Outeiro et al., 2008). Partiendo de esto, y cómo se ha indicado anteriormente, los antocianos y antocianidinas son compuestos que pueden evitar la neurotoxicidad inducida por estos péptidos gracias a la modulación de diferentes mecanismo y vías de señalización (Espín et al., 2000; Cheplick et al., 2007; Vitaglione et al., 2007; Aquilano et al., 2008; Kovacsova et al., 2010; Shih et al., 2011; Angeloni et al., 2012; Ullah et al., 2014; Thummayot et al., 2014; Ereminas et al., 2017; Kaewmool et al., 2019; Afzal et al., 2019).

El primer objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad de la MV, la MV3G, la MV3A y la M3VC en las células PC12 a fin de establecer las concentraciones no citotóxicas. Como se puede observar en la Figura 13, ninguna de las concentraciones ensayadas resultó tóxica para las células manteniéndose la viabilidad celular por encima del 85% para todos los compuestos a todas las concentraciones ensayadas.



**Figura 13:** Citotoxicidad de los compuestos: Malvidina (MV), Malvidina-3-O-glucósido (MV3G), Malvidina-3-O-(6''-p-acetil)-glucósido (MV3A) y Malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil)-glucósido (MV3C).

Seguidamente se llevó a cabo el ensayo de neuroprotección de los cuatro compuestos a las cuatro concentraciones no citotóxicas frente a la toxicidad inducida por el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> (fragmento responsable de la toxicidad) (Figura 14). Como se puede observar, la incubación de las células con el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> (control positivo) resultó en un descenso significativo de la viabilidad celular. De hecho, el tratamiento con el péptido A $\beta$ <sub>25-35</sub> provocó la muerte de aproximadamente el 50% de las células (Figura 14).



**Figura 14:** Neuroprotección de los compuestos frente a la toxicidad inducida por el péptido Aβ<sub>25-35</sub>: Malvidina (MV), Malvidina-3-O-glucósido (MV3G), Malvidina-3-O-(6"-p-acetil)-glucósido (MV3A) y Malvidina-3-O-(6"-p-cumaroil)-glucósido (MV3C).

Sin embargo, cuando el péptido Aβ<sub>25-35</sub> fue co-incubado con los compuestos se observó que tres de los cuatro compuestos son capaces de disminuir significativamente la toxicidad inducida por este péptido. En general se observa que los tres compuestos activos siguen una tendencia dosis-dependiente, es decir a mayor concentración ensayada mayor efecto neuroprotector. La MV (aglicona) es capaz de ejercer un efecto neuroprotector significativo ( $p < 0,05$ ) a partir de la concentración de 10 μM observándose un aumento de la viabilidad celular de un 8% a 10 μM, un 20% a 25 μM y un 25% a 50 μM. En el caso de la MV3C se encontraron diferencias significativas a partir de la concentración 25 μM y efectos neuroprotectores similares a la antocianidina MV con un incremento de la viabilidad de un 29% a 50 μM. La MV3A demostró efectos neuroprotectores a partir de 50 μM (Figura 13), siendo el antociano con menor efecto neuroprotector ya que solo aumenta la viabilidad celular en un 12% a la concentración más elevada ensayada (50 μM). Por último, la MV3G no resultó neuroprotectora a ninguna de las concentraciones ensayadas.

Otros estudios han analizado el efecto neuroprotector de la MV y de la MV3G frente a la toxicidad inducida por una mezcla del péptido Aβ<sub>25-35</sub> (0,5 μM) y Aβ<sub>1-40</sub> (5 μM) en células neuronales (Neuro-2A). En este caso, los autores observaron que ninguno de estos

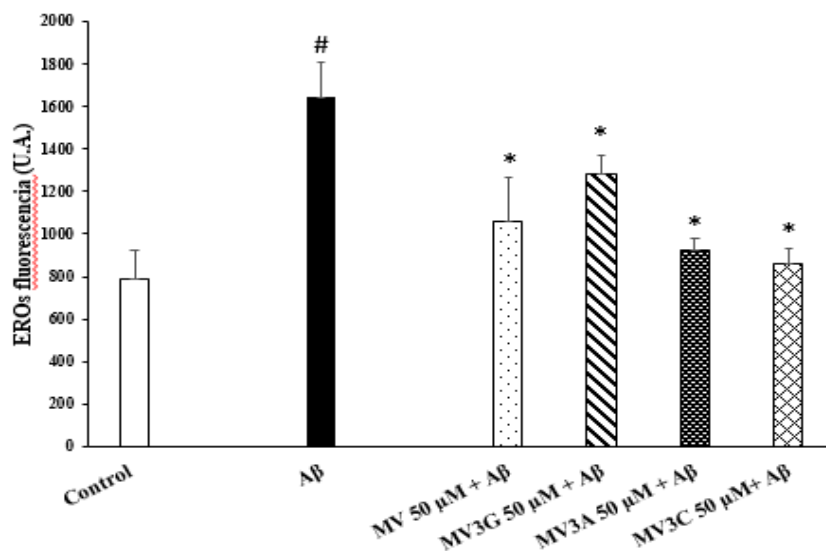
compuestos (a 50  $\mu\text{M}$ ) fue capaz de aumentar la viabilidad celular, resultado que concuerda en parte con nuestros resultados (para el caso de la MV3G) (Shih et al., 2011). Sin embargo, otro ensayo *in vitro* en el que se evaluó el papel neuroprotector de la MV3G frente a la toxicidad inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células gliales de rata (C6) demostró que este antociano a 10 y 20  $\mu\text{M}$  es capaz de proteger a las células de la muerte con un aumento de la viabilidad de un 16% y un 36%, respectivamente (Ereminas et al., 2017). El efecto neuroprotector de la cianidina-3-*O*-glucósido, uno de los antocianos más estudiados y que difiere de la MV3G en la presencia de un  $-\text{OH}$  en  $\text{R}_1$  en lugar de un  $-\text{OCH}_3$  y un  $-\text{H}$  en  $\text{R}_2$  en lugar de un  $-\text{OCH}_3$ , también se analizó en células neuronales SK-N-SH. Las concentraciones 0,2, 2 y 20  $\mu\text{M}$  de este antociano demostraron ser efectivas frente a la toxicidad neuronal inducida por el péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$ , aumentando la supervivencia de las células en un 5%, 14% y 19%, respectivamente (Thummayot et al., 2014).

Una de las posibles explicaciones a las diferencias observadas entre este trabajo y los descritos anteriormente para la malvidina y sus derivados glucosilados es que el modelo celular y los agentes inductores de la neurotoxicidad son diferentes a los utilizados en este trabajo. Asimismo, las concentraciones de péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$  son menores que las utilizadas en nuestro ensayo experimental.

#### **4.2 Evaluación del efecto de la MV, MV3G, MV3A y M3VC sobre la producción de EROs inducidos por el péptido $\text{A}\beta_{25-35}$**

Una de las propiedades más evaluadas de los compuestos antociánicos es su capacidad antioxidante (Shih et al., 2011; Ullah et al., 2014; Thummayot et al., 2014; Ereminas et al., 2017; Afzal et al., 2019). El péptido  $\text{A}\beta$ , tal y como se ha mencionado anteriormente, es un potente inductor de la apoptosis celular la cual está relacionada con el estrés oxidativo generado por este péptido y sus agregados (Thummayot et al., 2014; Pinkaew et al., 2015). Por ello, el segundo objetivo de este estudio fue analizar la capacidad de la MV, la MV3G, la MV3A y la MV3C para inhibir la producción intracelular de EROs inducida por el péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$ . En base a los resultados anteriormente obtenidos, se seleccionó la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , ya que es la concentración ensayada que presenta una mayor actividad. Según se puede comprobar en la Figura 15, la incubación de las células con el péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$  se traduce en un aumento significativo de la fluorescencia (de 800 a más de 1600 U.A) en comparación con el control, indicando que este péptido genera un importante estrés oxidativo a nivel intracelular. Se observa sin embargo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de EROs cuando las células son co-incubadas con el

péptido y los cuatro compuestos objetos de estudio. La MV3C y la MV3A son los compuestos que presentaron un efecto antioxidante mayor reduciendo la producción de EROs en un 48% y un 44%, respectivamente. La MV y la MV3G también produjeron una disminución en la producción de EROs, aunque en menor medida que los dos compuestos anteriores.



**Figura 15:** Efecto en la producción intracelular de EROs inducida por el péptido  $A\beta_{25-35}$  (fluorescencia) de Malvidina (MV), Malvidina-3-O-glucósido (MV3G), Malvidina-3-O-(6''-p-acetil)-glucósido (MV3A) y Malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil)-glucósido (MV3C)

Otros autores han estudiado la capacidad antioxidante de la MV y la MV3G frente al estrés oxidativo inducido por una mezcla del péptido  $A\beta_{25-35}$  (0,5  $\mu$ M) y  $A\beta_{1-40}$  (5  $\mu$ M) en otro modelo de células neuronales (Neuro-2A). La co-incubación de las células con la mezcla de ambos péptidos durante 24 horas y su posterior tratamiento con los compuestos por separado a una concentración de 50  $\mu$ M durante 12 horas resultó en una disminución en la producción de EROs de un 82% y de un 67% para la MV y la MV3G, respectivamente (Shih et al., 2011).

Otro estudio realizado por Ereminas y sus colaboradores mediante ensayos *in vitro* evaluó la capacidad antioxidante de la MV3G frente al estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$  en células gliales de rata (C6). Este estudio demostró que este antociano a 5, 10 y 20  $\mu$ M es capaz de producir un leve descenso en la producción de EROs, concretamente entre un 5% y un 10%, en comparación al control tratado solamente con  $H_2O_2$  (50  $\mu$ M) (Ereminas et al., 2017).

Como ya se mencionó anteriormente, existen estudios con otros compuestos antociánicos, siendo la cianidina-3-*O*-glucósido el antociano más estudiado. La investigación llevada a cabo por Yang et al. demostró que este compuesto a una concentración de 10 µg/ml (20,6 µM) reduce en más de un 50% los niveles de EROs producidos por el péptido Aβ<sub>25-35</sub> a 20 µM (Yang et al., 2018). En otro estudio, pero utilizando células neuronales SK-N-SH se demostró que la cianidina-3-*O*-glucósido fue capaz de reducir la producción de EROs inducida por el Aβ<sub>25-35</sub> (10 µM) en un 46%, 67% y 85% para 0,2, 2 y 20 µM, respectivamente (Thummayot et al., 2014).

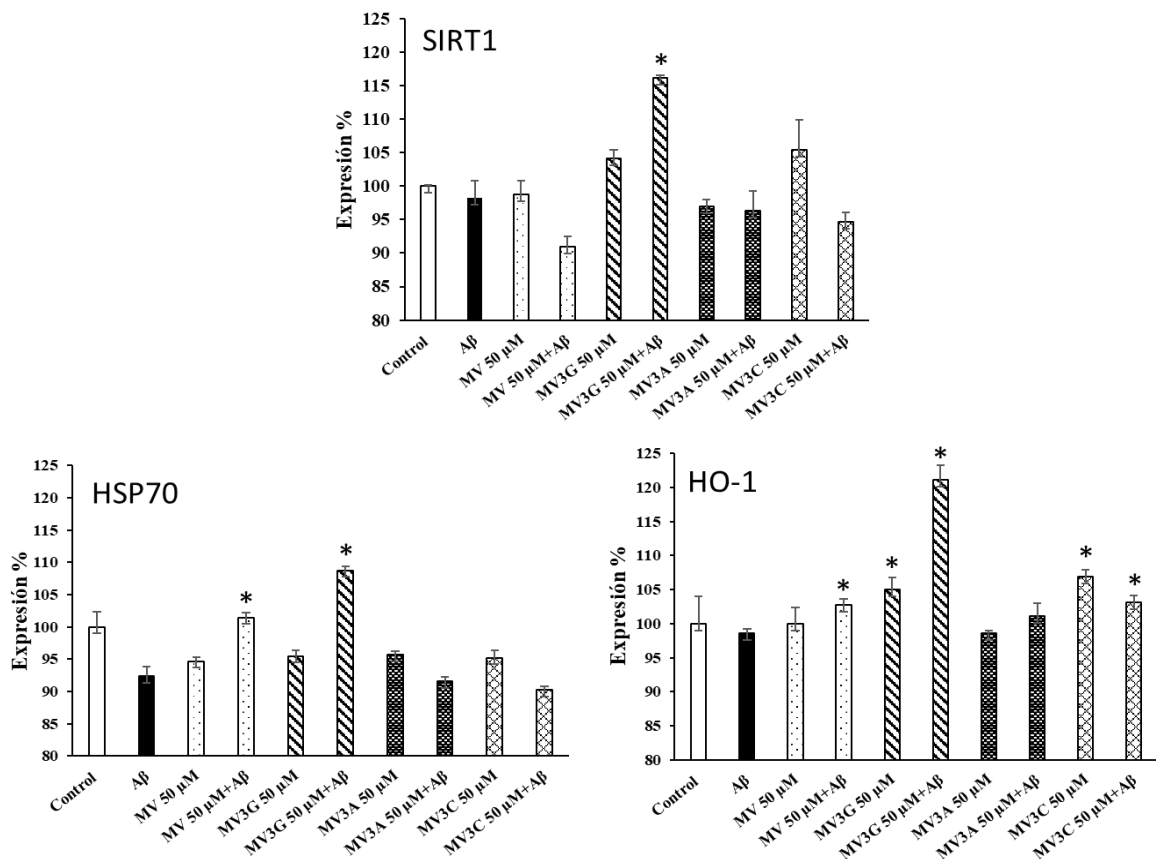
#### **4.3 Efecto de la MV, MV3G, MV3A y MV3C en la expresión génica de vitagenes**

Nuestra supervivencia y la calidad de vida física y mental depende del buen funcionamiento de diversos procesos de mantenimiento y reparación celular. El sistema vitagenes se define como un grupo de genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular en situaciones de estrés. Entre ellos podemos destacar las proteínas de choque térmico (HSP), la hemoxigenasa-1 (HO-1), y las proteínas sirtuinas (SIRT) (Cornelius et al., 2013).

Con objeto de evaluar el mecanismo de acción implicado en el efecto neuroprotector observado anteriormente por parte de la MV, MV3G, MV3A y MV3C se determinó la expresión génica de la SIRT-1, HO-1 y HSP70 tras tratar las células PC12 con los cuatro compuestos a 50 µM en presencia y ausencia del péptido Aβ<sub>25-35</sub> (Figura 15).

Así se ha obtenido una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la expresión de la SIRT-1 únicamente con el compuesto MV3G al ser co-incubado con el péptido Aβ<sub>25-35</sub>, con un aumento del 20% con respecto a la expresión solo con el péptido. Aunque no existan diferencias significativas existe también una tendencia al aumento de la expresión de la SIRT-1 con la MV3G y la MV3C sin péptido Aβ<sub>25-35</sub> (Figura 16). Existen estudios que demuestran que la SIRT-1 está relacionada con procesos fisiológicos como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis o metabolismo (Zheng et al., 2021). En concreto este gen regula el procesado de la proteína precursora del péptido Aβ, la neuroinflamación y la disfunción mitocondrial (Rizzi y Roriz-Cruz, 2018). Así, el aumento de la expresión de la SIRT-1 supone un beneficio demostrado contra el envejecimiento neuronal (Kim et al., 2007).





**Figura 16:** Expresión de los genes SIRT-1, HSP70 y HO-1 en las células control y tratadas con Aβ con o sin los compuestos en estudio: Malvidina (MV), Malvidina-3-O-glucósido (MV3G), Malvidina-3-O-(6''-p-acetil)-glucósido (MV3A) y Malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil)-glucósido (MV3C).

En cuanto al gen HSP70, se obtuvieron resultados significativos cuando se trataron las células con MV3G y MV en presencia de péptido Aβ<sub>25-35</sub> con incrementos en la expresión de este gen de un 20 y 11% respectivamente con respecto a la expresión del gen solo con el péptido (Figura 15). Cabe citar que la HSP70 también tiene un papel importante en la defensa de la célula frente al estrés oxidativo (Madrigal et al., 2009). Asimismo, esta proteína tiene la capacidad de prevenir la agregación del péptido Aβ y de la proteína tau (Repalli y Meruelo, 2015). Varios estudios han demostrado que su sobreexpresión inhibe la agregación del péptido Aβ, protegiendo las neuronas y evitando a toxicidad inducida por el péptido Aβ (Rivera et al., 2018).

Con respecto a la expresión del gen HO-1 se obtuvieron resultados significativos para tres de los cuatro compuestos evaluados. Así la MV3G en co-tratamiento con el Aβ<sub>25-35</sub> fue el compuesto que produjo un mayor aumento de la expresión, llegando hasta el 122% (un 24% más que con el péptido solo). De igual forma se obtuvo un aumento significativo de

la expresión de este gen con respecto al control positivo (solo péptido A $\beta_{25-35}$ ) tras el tratamiento con la MV y la MV3C junto con el péptido del 12% y 7%, respectivamente (Figura 16). La HO-1 es un gen que tiene un rol importante frente al estrés oxidativo ya que activa el del factor de transcripción Nrf2 el cual posee una función neuroprotectora (Abraham y Kappas, 2005). Asimismo, algunos estudios han observado que la expresión de la HO-1 es capaz de disminuir la toxicidad del A $\beta$  mediante la producción de monóxido de carbono (Hettiarachchi et al., 2014).

Hasta día de hoy, no existen estudios que hayan evaluado el papel de estos antocianos en la expresión de la SIRT-1 en células PC12 u otro modelo neuronal. Sin embargo, este efecto se ha demostrado en otros modelos celulares (células de hipocampo, células endoteliales). Por similitud a nuestro estudio cabe citar en primer lugar el trabajo realizado por Ali et al. que observó un aumento de la expresión de la HO-1 en células HT22 (hipocampo) las cuales fueron tratadas con un extracto de antocianos de la alubia negra coreana (67% cianidina-3-*O*-glucósido, 25% delfinidina-3-*O*-glucósido, 5% petunidina-3-*O*-glucósido) y el péptido A $\beta_{1-42}$  a 10  $\mu$ M (Ali et al., 2018). Otro interesante estudio llevado a cabo por Zheng y su equipo de investigación mostró que la MV y su derivado malvidina-3-*O*-guayacol a concentraciones de 1, 2 y 3  $\mu$ M aumentan significativamente la expresión de este gen con respecto al control positivo tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células HUVEC (Zheng et al., 2021). Por último y con respecto a la HSP70 el estudio realizado por Renis et al. observó un aumento de la expresión de dicho gen en células CaCo2 tras el tratamiento con cloruro de cianidina y con cianidina-3-*O*-glucósido a concentraciones 25, 50, 100 y 200  $\mu$ M (Renis et al., 2008).

## 5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo podemos concluir que:

- Ninguno de los compuestos estudiados resulta tóxico para las células a ninguna de las concentraciones ensayadas (1, 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ )
- Tanto la MV como la MV3A y la MV3C son compuestos que ofrecen protección frente a la toxicidad inducida por el péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$ , siguiendo una tendencia dosis-dependiente, ya que, a mayor concentración del compuesto, mayor actividad neuroprotectora.
- Todos los compuestos estudiados a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  presentan actividad antioxidante reduciendo la cantidad de EROs producidas por el péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$ , reduciendo de esta forma el estrés oxidativo a nivel neuronal y la consiguiente muerte celular.
- Tres de los cuatro compuestos evaluados (MV, MV3G, MV3C) son capaces de aumentar la expresión del gen HO-1 pudiendo ser este uno de los mecanismos implicados en el efecto neuroprotector observado. En el caso de la SIRT-1 y la HSP70, únicamente la MV3G es capaz de aumentar significativamente la expresión de estos genes.
- La glucosilación y el grado de sustitución de la glucosa de los antocianos evaluados puede estar relacionado con las actividades observadas.

Así en base a los resultados obtenidos se pueden concluir que estos compuestos antociánicos poseen un efecto neuroprotector frente a la toxicidad y estrés oxidativo inducido por el péptido  $\text{A}\beta_{25-35}$  *in vitro*. Estos efectos pueden explicarse por la capacidad para reducir la producción intracelular de EROs y de modular la expresión génica de la HO-1. Sin embargo, se necesitan más estudios con objeto de elucidar el mecanismo de acción implicado en estos efectos y que ayuden a comprender en profundidad la relación estructura-actividad.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39 (1): 1-25.

Acevedo De la Cruz A, Hilbert G, Rivière C, Mengin V, Ollat N, Bordenave L, et al. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis spp.* accessions by using LC-MS and LC-NMR. *Anal Chim Acta.* 2012; 732: 145-52.

Afzal M, Redha A, AlHasan R. Anthocyanins Potentially Contribute to Defense against Alzheimer's Disease. *Molecules.* 2019; 24(23): 4255.

Ali T, Kim T, Rehman SU, Khan MS, Amin FU, Khan M, et al. Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(7): 6076-93

Andersen OM, Jordheim M. The anthocyanins. In: Andersen OM, Markham KR, Eds. *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications.* 2nd ed. Boca Raton ; 2006. 471-551.

Angeloni C, Pirola L, Vauzour D, Maraldi T. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012:583901.

Aquilano K, Baldelli S, Rotilio G, Ciriolo MR. Role of nitric oxide synthases in Parkinson's disease: a review on the antioxidant and anti-inflammatory activity of polyphenols. *Neurochem Res.* 2008; 33(12): 2416-26.

Brouillard R, Delaporte B, Dubois J.-E. Chemistry of anthocyanin pigments. 3. Relaxation amplitudes in pH-jumps experiments. *J Am Chem Soc.* 1978; 100, 6202–05.

Burns J, Mullen W, Landrault N, Teissedre PL, Lean ME, Crozier A. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from cabernet sauvignon and hybrid grapes. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(14): 4096-102.

Casamenti F, Grossi C, Rigacci S, Pantano D, Luccarini I, Stefani M. (2015). Oleuropein Aglycone: A Possible Drug against Degenerative Conditions. In Vivo Evidence of its Effectiveness against Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 45, 679–88.

Cheplick S, Kwon YI, Bhowmik P, Shetty K. Phenolic-linked variation in strawberry cultivars for potential dietary management of hyperglycemia and related complications of hypertension. *Bioresour Technol.* 2010; 101(1): 404-13.

Cornelius C, Trovato Salinaro A, Scuto M, Fronte V, Cambria MT, Pennisi M, et al. Cellular stress response, sirtuins and UCP proteins in Alzheimer disease: role of vitagenes. *Immun Ageing.* 2013; 10(1): 41.

Cummings JL, Vinters HV, Cole GM, Khachaturian ZS. Alzheimer's disease: Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities. *Neurology*, 1998; 51(1): S2-S17.

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses; CRC Press: Boca Raton, 2003.

Del Valle-Leguizamón G, González-León A, Báez-Sañudo R. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera L.*) y su relación con el color. *Rev Fitotec Mex.* 2005; 28(4): 359-68.

Durant M (2021). Etude des composés phénoliques du raisin & du vin en lien avec l'astringence. Trabajo Fin de Master, Universidad de Burdeos.

Ereminas G, Majiene D, Sidlauskas K, Jakstas V, Ivanauskas L, Vaitiekaitis G, Liobikas J. Neuroprotective properties of anthocyanidin glycosides against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced glial cell death are modulated by their different stability and antioxidant activity in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2017; 94: 188-96.

Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, García-Viguera C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(5): 1588-92.

Gálvez Vargas R, Landelli Claret P, García Martín M. Epidemiología de las enfermedades degenerativas del sistema nervioso: demencias y enfermedad de Alzheimer. Enfermedad de Parkinson. En: Piedrón Gil, editor. *Medicina Preventiva y Salud Pública.* 10.<sup>a</sup> ed. Barcelona: Masson; 2001. p. 745-55.

- Gardener S, Gu Y, Rainey-Smith SR, Keogh JB, Clifton PM, Mathieson SL, et al. (2012). Adherence to a Mediterranean diet and Alzheimer's disease risk in an Australian population. *Transl Psychiatry* 2: e164.
- Gardener H, Caunca MR. Mediterranean Diet in Preventing Neurodegenerative Diseases. *Curr Nutr Rep.* 2018; 7(1): 10-20.
- Guzman-Martinez L, Calfio C, Farias GA, Vilches C, Prieto R, Maccioni RB. New Frontiers in the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2021; 82(1): S51-S63.
- Hettiarachchi N, Dallas M, Al-Owais M, Griffiths H, Hooper N, Scragg J, Boyle J, Peers C. Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid- $\beta$ (1-42)-induced toxicity via carbon monoxide production. *Cell Death Dis.* 2014;5(12): e1569.
- He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules.* 2010; 15(12): 9057-91.
- Isaak CK, Petkau JC, Blewett H, O K, Siow YL. Lingonberry anthocyanins protect cardiac cells from oxidative-stress-induced apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2017; 95(8): 904-10.
- Kaewmool C, Udomruk S, Phitak T, Pothacharoen P, Kongtawelert P. Cyanidin-3-O-Glucoside Protects PC12 Cells Against Neuronal Apoptosis Mediated by LPS-Stimulated BV2 Microglial Activation. *Neurotox Res.* 2020; 37(1): 111-25.
- Kawahara M, Kuroda Y. Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull.* 2000; 53(4): 389-97.
- Kelly, B.L., Ferreira, A. Beta-amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2006; 281: 28079-89.
- Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules.* 2010; 15(11): 7792-814.

- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2007; 26(13): 3169-79.
- Konczak I, Zhang W. Anthocyanins: More Than Nature's Colours. *J. Biomed. Biotechnol*. 2004; 239-40.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 2003; 64(5): 923-33.
- Kovacsova M, Barta A, Parohova J, Vrankova S, Pechanova O. Neuroprotective mechanisms of natural polyphenolic compounds. *Act Nerv Super Rediviva*. 2010; 52(3), 181-86.
- Krivanek TJ, Gale SA, McFeeley BM, Nicastrì CM, Daffner KR. Promoting Successful Cognitive Aging: A Ten-Year Update. *J Alzheimers Dis*. 2021; 81(3): 871-920.
- Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT Jr. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol*. 2002; 322(5): 1089-102.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*. 2014; 6(12): 6020-47.
- Lunte SM. Structural classification of flavonoids in beverages by liquid chromatography with ultraviolet-visible and electrochemical detection. *J Chromatogr*. 1987; 384: 371-82.
- Madrigal-Matute J, López-Franco O, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Ramos-Mozo P, Ortega L, Egido J, Martín-Ventura JL. Heat shock protein 90 inhibitors attenuate inflammatory responses in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2010; 86(2): 330-7.
- Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(3): 577-99.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.

- Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 2004; 1054(1-2): 95-111.
- Navarro-Hortal MD, Romero-Márquez JM, Esteban-Muñoz A, Sánchez-González C, Rivas-García L, Llopis J, Cianciosi D et al. Strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. *Romina*) methanolic extract attenuates Alzheimer's beta amyloid production and oxidative stress by SKN-1/NRF and DAF-16/FOXO mediated mechanisms in *C. elegans*. *Food Chem*. 2022; 372: 131272.
- Nemzer B, Kalita D, Yashin AY, Yashin YI. Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. *Beverages*. 2022; 8(1): 1.
- Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, Hyman BT, McLean PJ. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS One*. 2008; 3(4): e1867.
- Patterson C. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: new frontiers. London, UK: Alzheimer's Disease International (ADI); 2018.
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci*. 1993; 13(4): 1676-87.
- Pinelo M, Arnous A, Meyer AS. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 2006; 17(11): 579–90.
- Pinkaew D, Changtam C, Tocharus C, Thummayot S, Suksamrarn A, Tocharus J. Di-O-demethylcurcumin protects SK-N-SH cells against mitochondrial and endoplasmic reticulum-mediated apoptotic cell death induced by A $\beta$ 25-35. *Neurochem Int*. 2015; 80: 110-9.
- Prior RL, Cao G, Martin A, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(7), 2686–93.



- Renis M, Calandra L, Scifo C, Tomasello B, Cardile V, Vanella L, et al. Response of cell cycle/stress-related protein expression and DNA damage upon treatment of CaCo2 cells with anthocyanins. *Br J Nutr.* 2008; 100(1): 27-35.
- Repalli J, Meruelo D. Screening strategies to identify HSP70 modulators to treat Alzheimer's disease. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 321-31.
- Rivera I, Capone R, Cauvi DM, Arispe N, De Maio A. Modulation of Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide oligomerization and toxicity by extracellular Hsp70. *Cell Stress Chaperones.* 2018; 23(2): 269-79.
- Rizzi L, Roriz-Cruz M. Sirtuin 1 and Alzheimer's disease: An up-to-date review. *Neuropeptides.* 2018; 71: 54-60.
- Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger J. A. (2006). Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 6, 912–21.
- Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Manly JJ, Schupf N, Luchsinger JA. (2009). Mediterranean diet and mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 66, 216–25.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2016; 388(10043): 505-17.
- Shih PH, Wu CH, Yeh CT, Yen GC. Protective effects of anthocyanins against amyloid  $\beta$ -peptide-induced damage in neuro-2A cells. *J Agric Food Chem.* 2011; 59(5): 1683-9.
- Suttisansanee U, Charoenkiatkul S, Jongruaysup B, Tabtimsri S, Siriwan D, Temviriyankul P. Mulberry Fruit Cultivar 'Chiang Mai' Prevents Beta-Amyloid Toxicity in PC12 Neuronal Cells and in a Drosophila Model of Alzheimer's Disease. *Molecules.* 2020; 25(8): 1837.
- Tarozzi A, Merlicco A, Morroni F, Franco F, Cantelli-Forti G, Teti G, Falconi M, Hrelia P. Cyanidin 3-O-glucopyranoside protects and rescues SH-SY5Y cells against amyloid-beta peptide-induced toxicity. *Neuroreport.* 2008; 19(15): 1483-6.
- Thummayot S, Tocharus C, Pinkaew D, Viwatpinyo K, Sringarm K, Tocharus J. Neuroprotective effect of purple rice extract and its constituent against amyloid beta-induced neuronal cell death in SK-N-SH cells. *Neurotoxicology.* 2014; 45: 149-58.

- Truzzi F, Tibaldi C, Zhang Y, Dinelli G, D Amen E. An Overview on Dietary Polyphenols and Their Biopharmaceutical Classification System (BCS). *Int J Mol Sci*. 2021; 22(11): 5514.
- Ullah I, Park HY, Kim MO. Anthocyanins protect against kainic acid-induced excitotoxicity and apoptosis via ROS-activated AMPK pathway in hippocampal neurons. *CNS Neurosci Ther*. 2014; 20(4): 327-38.
- Vermerris W, Nicholson R. *Phenolic Compound Biochemistry*. 2006 ed. Dordrecht: Springer; 2008.
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J Nutr*. 2007; 137 (9): 2043-8.
- Volles MJ, Lansbury PT Jr. Zeroing in on the pathogenic form of alpha-synuclein and its mechanism of neurotoxicity in Parkinson's disease. *Biochemistry*. 2003; 42(26): 7871-8.
- Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(7): 995-1022.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol*. 2001; 126(2): 485-93.
- Yang JS, Jeon S, Yoon KD, Yoon SH. Cyanidin-3-glucoside inhibits amyloid  $\beta$ 25-35-induced neuronal cell death in cultured rat hippocampal neurons. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2018; 22(6): 689-96.
- Zheng F, Xue H, Wang BX, Wu MY, Chen DX, Yue H, Wen LK, He Y. Identification of Stabilization of Malvid Anthocyanins and Antioxidant Stress Activation via the AMPK/SIRT1 Signaling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021; 9934646.