

**Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional
de Doctorado**

PROGRAMA en MEDICINA TRANSLACIONAL



CEU

*Escuela Internacional
de Doctorado*

**Estudio del carácter
neuroprotector de nuevas
1,3- β -dicetonas asimétricas como
análogos de curcumina.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Diana Martínez Casanova

Dirigida por: Dr. José Luis Lavandera Díaz

Co-dirigida por: Dra. Esther Escudero Lirola

MADRID

2019 - 2020

AGRADECIMIENTOS:

Dicen que un doctorado de ciencias sirve para aprender ciencia. ¿Tiene sentido, no? Pues la verdad es que... no todo va de eso. Un doctorado va de aprender a convivir con gente que no conoces, a encontrar puntos en común y a aprender a formar parte de algo. Es aprender a estar dispuesta a ayudar a los demás, tengas tiempo o no, y entender que a veces quien necesita ayuda eres tú. Es asumir que el concepto horario es una palabra difusa y sin sentido. Sirve para desarrollar la paciencia, para aprender cuando hablar y cuando no. Para descubrir lo mejor de ti y lo peor, e intentar así empezar a eliminar lo malo. Para saber que a veces lo pequeños logros te hacen sentir más feliz que los grandes. Sirve para desarrollarte de manera interior y querer enseñarle al mundo lo que ves en tu cabeza y que al final, sin saber cómo, cuándo, ni por qué, en algún momento de toda esa locura te da por sugerir algo en algún "lab meeting" que resulta que puede hasta tener sentido. Y ahí es cuando empiezas a hacer ciencia.

Por lo que... ¿Cómo no me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis?

En primer lugar, y por encima de todo a mi familia, por haber hecho posible cumplir este sueño. En especial a mis padres y a mi Lala por todo su amor incondicional, por apoyarme en todos los sentidos de mi vida y hacer de mí la persona que soy hoy. A mi hermana y a mi cuñada, por siempre estar ahí y apoyarme tanto en los buenos como en los malos momentos.

A mi marido, por su infinita paciencia y por sacarme una sonrisa los días que más lo necesitaba.

Al Dr. José Luis Lavandera, director de esta tesis, por su inmensa ayuda que ha hecho posible llevar a cabo este trabajo además de formarme como profesional y ayudarme siempre y cuando lo he necesitado.

A la Dra. Esther Escudero, por su apoyo incondicional en los momentos más oscuros. Siempre llena de toda la serenidad que a veces nos falta.

A todos mis compañeros de investigación que han estado conmigo a lo largo del camino, pero en especial a Ana Ortiz mi compañera de batalla, siempre apoyándonos en los momentos de bajón y saltando juntas en los momentos de alegría.

A todos los compañeros del (Instituto de Medicina Molecular Aplicada) IMMA, pero sobre todo a mis Irenes, nuestras queridísimas técnicas las cuales han hecho posible realizar los maravillosos Westerns, siempre con paciencia y dedicación. Y como no a mí Susana Arahuetes por sus ánimos y su apoyo en todo momento.

A la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) por habernos sintetizado los compuestos y preocuparse de que no nos faltasen nunca.

A la Universidad San Pablo CEU por darme las oportunidades que me ha dado y por haberme puesto las facilidades necesarias para poder compaginar la tesis con el grado en biotecnología.

Y por último a mis queridas y grandes amigas Cristina García y Kathleen Doria, sin las que simplemente no sería quién soy.

Todo este esfuerzo se
lo dedico a mi familia.

ÍNDICE GENERAL

I.INTRODUCCIÓN	29
I.1. Enfermedades neurodegenerativas	29
I.1.1. Semiología de enfermedades neurodegenerativas.	33
I.1.2. Mecanismos etiopatogénicos en las enfermedades neurodegenerativas.....	37
I.2. Producción de radicales libres, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.	48
I.2.1. Producción de radicales libres y estrés oxidativo.	48
I.2.2. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial:	56
I.3. Antioxidantes como terapia.....	62
I.3.1. Curcumina y curcuminoides.	64
II.HIPOTESIS Y OBJETIVOS:	73
III.MATERIALES Y MÉTODOS	79
III.1. Determinación de la capacidad AOX: ABTS, FRAP y DPPH.....	79
III.1.1. Método ABTS.	80
III.1.2. Método FRAP.....	81
III.1.3. Método DPPH.....	82
III.2. Determinación de las propiedades drug-like.....	83
III.3. Determinación de la citotoxicidad de los compuestos en las diferentes líneas celulares.	83
III.3.1. Líneas celulares.	83
III.3.2. Estudios de citotoxicidad: determinación de la dosis letal 50 (DL50).	86
III.4. Estudios de neuroprotección frente a H ₂ O ₂	88
III.5. Ensayos para la determinación de la solubilidad y estabilidad.	90
III.6. Determinación de la capacidad de quelación de hierro.	91

III.7. Estudios de neuroprotección frente a los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.	92
III.8. Determinación de los niveles intracelulares de ROS en ensayos de neuroprotección.	95
III.9. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). ..	96
III.9.1. Ensayo por espectroscopía de fluorescencia.	97
III.9.2. Ensayo por citometría de flujo.	97
III.10. Cuantificación de biomarcadores celulares de daño oxidativo. ..	98
III.10.1. Cuantificación de MDA.	99
III.10.2. Determinación de los niveles endógenos de GSH y GSSG.	100
III.11. Cuantificación de la expresión de las enzimas endógenas de defensa antioxidante.	102
III.12. Análisis estadístico.	104
IV. RESULTADOS	107
IV.1. Determinación de la capacidad AOX: Método ABTS, FRAP y DPPH.	107
IV.2. Determinación de las propiedades drug-like.	110
IV.3. Determinación de la citotoxicidad de los compuestos en las diferentes líneas celulares.	111
IV.3.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) en la línea celular SH-SY5Y.	111
IV.3.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) en la línea celular HT-22.	119
IV.3.3. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) en la línea celular HepG2.	128
IV.4. Estudios de neuroprotección frente a H_2O_2	131
IV.4.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50).	131
IV.4.2. Neuroprotección en condiciones de EO inducido por H_2O_2 . .	133
IV.5. Ensayos para la determinación de la solubilidad y estabilidad. ...	139
IV.6. Determinación de la capacidad de quelación de hierro.	141

IV.7. Estudios de neuroprotección frente a los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.	142
IV.7.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50).	142
IV.7.2. Neuroprotección frente inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	145
IV.7.3. Neuroprotección frente a neurotoxicidad inducida por glutamato.....	159
IV.8. Cuantificaciónn intracelular de ROS.....	162
IV.9. Valoración de la integridad de la membrana mitocondrial midiendo su potencial de membrana ($\Delta\psi_m$).	164
IV.9.1. Ensayo por espectroscopia de fluorescencia.	164
IV.9.2. Ensayo por citometría de flujo.....	165
IV.10. Cuantificación de biomarcadores celulares de daño oxidativo.	167
IV.10.1. Cuantificación de MDA.....	167
IV.10.2. Determinación de las defensas celulares endógenas a través de la relación GSH/GSSG.	170
IV.11. Cuantificación de la expresión de las enzimas endógenas de defensa antioxidante.....	171
V.DISCUSIÓN.....	177
VI.CONCLUSIONES	197
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	201

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Posibles hipótesis bajaradas para la EP. En la figura (a) se presenta la α -sinucleína como inductor del EO y en consecuencia de la disfunción mitocondrial y en la figura (b) se presenta que el desencadenante es el daño mitocondrial, el cual genera cierto EO y en consecuencia la acumulación de α -sinucleína lo que genera una disfunción sináptica. (Zaltieri y col.,2015) ¹	45
Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial.(Angoso, 2008) ⁶⁷	49
Figura 3. Generación y neutralización de radicales libres. En la figura se observa la producción de ROS y RNS (flecha negra), y la eliminación de estos por parte de los mecanismos celulares (flecha blanca).	55
Figura 4. Productos derivados de la actividad de HMOX-1, la cual degrada el grupo hemo en Fe ²⁺ , dióxido de carbono (CO) y biliverdina (BV) para la posterior inducción de la expresión de numerosos genes de enzimas anti apoptóticas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias(Modificada de Jazwa y col., 2010). ¹⁰⁶	60
Figura 5. Efectos transcripcionales de Nrf2. Al producirse un EO Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo formando heterodímeros con las proteínas Maf (Maf), lo cual facilita su interacción con las regiones ARE del ADN y la consecuente transcripción de genes antioxidantes y enzimas de fase II (Fainstein y col., 2007). ¹⁰⁸	61
Figura 6. Gráfica en la que se representa el numero de publicaciones científicas sobre la curcumina a lo largo de los años.....	65
Figura 7. Equilibrio tautomérico ceto-enol de la curcumina.....	65
Figura 8. Mecanismos antioxidantes de la curcumina (Thiyagarajan y col., 2004). ¹²⁴	66
Figura 9. Los curcuminoides estudiados en este trabajo, representados como la forma tautomérica principal. ^{129,130}	68
Figura 10. Línea celular SH-SY5Y. Imagen realizada al microscopio de contraste de fases (LEICA DM300) a 20x.	84
Figura 11. Línea celular HT-22. Imagen realizada al microscopio de contraste de fases (LEICA DM300) a 20x.	85
Figura 12. Línea celular HepG2. Imagen realizada al microscopio de contraste de fases (LEICA DM300) a 20x.	86
Figura 13. Capacidad antioxidante de trolox, curcumina, 1a y 1b, medida como % de cantidad de DPPH residual. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado.	109
Figura 14. Citotoxicidad de curcumina a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μ M sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	112
Figura 15. Citotoxicidad del compuesto 1a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μ M sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	112
Figura 16. Citotoxicidad del compuesto 2a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μ M sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	113

Figura 17. Citotoxicidad del compuesto 3a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	113
Figura 18. Citotoxicidad del compuesto 4a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	114
Figura 19. Citotoxicidad del compuesto 5a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	114
Figura 20. Citotoxicidad del compuesto 6a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	115
Figura 21. Citotoxicidad del compuesto 7a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	115
Figura 22. Citotoxicidad del compuesto 1b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	116
Figura 23. Citotoxicidad del compuesto 2b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	116
Figura 24. Citotoxicidad del compuesto 3b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	117
Figura 25. Citotoxicidad del compuesto 4b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	117
Figura 26. Citotoxicidad del compuesto 5b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	118
Figura 27. Citotoxicidad del compuesto 6b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	118
Figura 28. Citotoxicidad del compuesto 7b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.	119
Figura 29. Citotoxicidad de la curcumina a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. .	120
Figura 30. Citotoxicidad del compuesto 1a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. .	121
Figura 31. Citotoxicidad del compuesto 2a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. .	121
Figura 32. Citotoxicidad del compuesto 3a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. .	122

- Figura 33.** Citotoxicidad del compuesto 4a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 122
- Figura 34.** Citotoxicidad del compuesto 5a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 123
- Figura 35.** Citotoxicidad del compuesto 6a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 123
- Figura 36.** Citotoxicidad del compuesto 7a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 124
- Figura 37.** Citotoxicidad del compuesto 1b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 124
- Figura 38.** Citotoxicidad del compuesto 2b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 125
- Figura 39.** Citotoxicidad del compuesto 3b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 125
- Figura 40.** Citotoxicidad del compuesto 4b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 126
- Figura 41.** Citotoxicidad del compuesto 5b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 126
- Figura 42.** Citotoxicidad del compuesto 6b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 127
- Figura 43.** Citotoxicidad del compuesto 7b a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. . 127
- Figura 44.** Citotoxicidad del compuesto 1a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HepG2. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 129
- Figura 45.** Citotoxicidad del compuesto 2a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HepG2. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 129
- Figura 46.** Citotoxicidad del compuesto 3a a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HepG2. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 130
- Figura 47.** Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de H_2O_2 tras 24h de incubación sobre la SH-SY5Y. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado (r^2 :0,9896). 131
- Figura 48.** Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de H_2O_2 tras 24h de incubación sobre la HT-22. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado (r^2 :0,9511). 132
- Figura 49.** Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por H_2O_2 en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h, tras lo cual se trataron las células con 200 μM de H_2O_2 durante 24h. Los datos representados son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # p <0.001 control con H_2O_2 200 μM . * p >0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 células tratadas con el compuesto y con H_2O_2 200 μM 134
- Figura 50.** Efecto neuroprotector de 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por H_2O_2 en la línea celular SH-SY5Y expresado como la cantidad de LDH liberada. La viabilidad celular fue determinada mediante la cantidad de LDH liberada. Los compuestos fueron administrados a

diferentes concentraciones durante 24h, tras lo cual se trataron la células con 200 μM de peróxido durante 24h. Los datos representados son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 200 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y con H_2O_2 200 μM 135

Figura 51. Protección de la curcumina frente a H_2O_2 200 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con H_2O_2 200 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 136

Figura 52. Protección del compuesto 6b frente a H_2O_2 200 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con H_2O_2 200 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 136

Figura 53. Protección del compuesto 7b frente a H_2O_2 200 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con H_2O_2 200 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 137

Figura 54. Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por H_2O_2 en la línea celular HT-22. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 700 μM de H_2O_2 durante 24h. Los datos representados son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 700 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células células tratadas con el compuesto y con H_2O_2 700 μM 137

Figura 55. Protección de la curcumina frente a H_2O_2 700 μM en la línea celular HT-22. 0, control con H_2O_2 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 138

Figura 56. Protección del compuesto 6b frente a H_2O_2 700 μM en la línea celular HT-22. 0, control con H_2O_2 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 138

Figura 57. Protección del compuesto 7b frente a H_2O_2 700 μM en la línea celular HT-22. 0, control con H_2O_2 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 139

Figura 58. Determinación de la capacidad de quelación sobre el Fe^{2+} . En la gráfica A se muestran los resultados de los compuestos disueltos en agua. En la gráfica B se muestran los resultados de los compuestos disueltos en agua y metanol en proporción 1:1. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado, mostrando un $p < 0,001$ 141

Figura 59. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de rotenona tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y.La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9890$)..... 142

Figura 60. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de rotenona/oligomericina en proporción 5:1 tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y.La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9849$)..... 143

Figura 61. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de MPP⁺ tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y.La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9802$)..... 143

Figura 62. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de 6-hidroxidopamina tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y.La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los

valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9899$)..... 144

Figura 63. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de rotenona/oligomicina en proporción 10:1 tras 24h de incubación sobre las HT-22. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9702$)..... 144

Figura 64. Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por rotenona en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 5 μM de rotenona durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p<0.001$ control con rotenona 5 μM . * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ células tratadas con el compuesto y con rotenona 5 μM 145

Figura 65. Experimento de protección de la curcumina frente a rotenona 5 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona 5 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 146

Figura 66. Experimento de protección del compuesto 6b frente a rotenona 5 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona 5 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 146

Figura 67. Experimento de protección del compuesto 7b frente a rotenona 5 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona 5 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 147

Figura 68. Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por rotenona/oligomicina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 5:1 μM de rotenona/oligomicina durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p<0.001$ control con rotenona/oligomicina 5: 1 μM * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ células tratadas con el compuesto y con rotenona/oligomicina 5: 1 μM 148

Figura 69. Experimento de protección de la curcumina frente a rotenona/oligomicina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona/oligomicina 5:1 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 149

Figura 70. Experimento de protección del compuesto 6b frente a rotenona/oligomicina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona/oligomicina 5:1 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 149

Figura 71. Experimento de protección del compuesto 7b frente a rotenona/oligomicina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona/oligomicina 5:1 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 150

Figura 72. Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por MPP⁺ 700 μM en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con MPP⁺ 700 μM durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p<0.001$ control con MPP⁺ 700 μM . * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ células tratadas con el compuesto y con MPP⁺ 700 μM 151

Figura 73. Experimento de protección de la curcumina frente a MPP⁺ 700 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con MPP⁺ 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 152

- Figura 74.** Experimento de protección del compuesto 6b frente a MPP⁺ 700 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con MPP⁺ 700 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 153
- Figura 75.** Experimento de protección del compuesto 7b frente a MPP⁺ 700 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con MPP⁺ 700 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 153
- Figura 76.** Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por 6-hidroxidopamina 250 μ M en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 6-hidroxidopamina 250 μ M durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. #p<0.001 control con 6-hidroxidopamina 250 μ M; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 células tratadas con el compuesto y con 6-hidroxidopamina 250 μ M..... 154
- Figura 77.** Experimento de protección de la curcumina frente a 6-hidroxidopamina 250 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con 6-hidroxidopamina 250 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M de curcumina. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 154
- Figura 78.** Experimento de protección del compuesto 6b frente a 6-hidroxidopamina 250 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con 6-hidroxidopamina 250 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M de curcumina. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 155
- Figura 79.** Experimento de protección del compuesto 7b frente a 6-hidroxidopamina 250 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con 6-hidroxidopamina 250 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M de curcumina. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 155
- Figura 80.** Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por rotenona/oligomicina 10:1 μ M en la línea celular HT-22. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con rotenona/oligomicina 10:1 μ M durante 24h. los datos representados son la media \pm desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. #p<0.001 control con rotenona/oligomicina 10:1 μ M, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 células tratadas con el compuesto y con rotenona/oligomicina 10:1 μ M. 156
- Figura 81.** Experimento de protección de la curcumina frente a rotenona/oligomicina 10:1 μ M en la línea celular HT-22. 0, control con rotenona/oligomicina 10:1 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 157
- Figura 82.** Experimento de protección del compuesto 6b frente a rotenona/oligomicina 10:1 μ M en la línea celular HT-22. 0, control con rotenona/oligomicina 10:1 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 158
- Figura 83.** Experimento de protección del compuesto 7b frente a rotenona/oligomicina 10:1 μ M en la línea celular HT-22. 0, control con rotenona/oligomicina 10:1 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x..... 158
- Figura 84.** Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μ M) de glutamato tras 24h de incubación sobre las HT-22. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado (r^2 :0,9611)..... 159
- Figura 85.** Efecto neuroprotector de la curcumina, 6b y 7b contra la citotoxicidad inducida por glutamato 10 mM en la línea celular HT-22. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con glutamato 10 mM durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. #p<0.001; control con glutamato 10mM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 células tratadas con el compuesto y glutamato 10mM. 160

Figura 86. Experimento de protección de la curcumina frente a glutamato 10mM en la línea celular HT-22. 0, control con glutamato 10 mM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 161

Figura 87. Experimento de protección del compuesto 6b frente a glutamato 10mM en la línea celular HT-22. 0, control con glutamato 10 mM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 161

Figura 88. Experimento de protección del compuesto 7b frente a glutamato 10mM en la línea celular HT-22. 0, control con glutamato 10 mM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x. 162

Figura 89. Disminución intracelular de ROS mediada por los compuestos 6b y 7b en la línea celular SH-SY5Y tras el tratamiento durante 4h de 400 μ M de H_2O_2 y con previo tratamiento con los compuestos 6b y 7b durante 24h. La cantidad intracelular de ROS fue determinada mediante el método DFCH-DA. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 400 μ M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 400 μ M. 163

Figura 90. Disminución intracelular de ROS mediada por los compuestos 6b y 7b en la línea celular SH-SY5Y tras el tratamiento durante 2h de 500 μ M de H_2O_2 y con previo tratamiento con los compuestos 6b y 7b durante 6h. La cantidad intracelular de ROS fue determinada mediante el método DFCH-DA. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 500 μ M; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 500 μ M..... 163

Figura 91. Prevención de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) mediada por los compuestos 6b y 7b en la línea celular SH-SY5Y tras el tratamiento durante de 24h de H_2O_2 200 μ M. Las células fueron tratadas con los compuestos 6b y 7b durante 24h, después se incubaron 24h más H_2O_2 . La pérdida del $\Delta\psi_m$ fue determinada mediante la sonda JC-1. El $\Delta\psi_m$ se expresa como relación de fluorescencia de JC-1 en términos de fluorescencia roja a fluorescencia verde (agregados: monómeros). Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 200 μ M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 200 μ M..... 164

Figura 92. Efecto neuroprotector de los compuesto 7b frente H_2O_2 a 400 μ M durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. El compuesto fue administrado a 20 y 40 μ M durante 24h antes del tratamiento con H_2O_2 . El potencial de membrana fue determinado mediante citometría de flujo usando la sonda JC-1. Se representa las poblaciones en cada región FL-1 la cual da fuoescencia verde (J-monómeros) y FL-2 la cual da fluorescencia roja (J-agregados). Los datos representados son la media de los 30.000 eventos \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. A: células control, B: células tratadas con H_2O_2 a 400 μ M C: células tratadas con 7b 20 μ M y con H_2O_2 a 400 μ M D: células tratadas con 7b 40 μ M y con H_2O_2 a 400 μ M. 166

Figura 93. Efecto neuroprotector de los compuestos 6b y 7b frente H_2O_2 a 400 μ M durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa cuantitativamente la relación FL-1/FL-2. Los compuestos fueron administrados a 20 y 40 μ M durante 24h antes del tratamiento con H_2O_2 . Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 400 μ M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 400 μ M. 167

Figura 94. Efecto neuroprotector de los compuestos 6b y 7b frente a H_2O_2 400 μ M durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la concentración de MDA (nM) frente a la cantidad de proteína (mg/ml), los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h antes del tratamiento con H_2O_2 . Los datos se representan como la media \pm la desviación típica de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 400 μ M.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 400 μ M. 168

Figura 95. Efecto neuroprotector de los compuestos 6b y 7b frente a peróxido 500 μM durante 2h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la concentración de MDA (nM) frente a la cantidad de proteína (mg/ml), los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 6h antes del tratamiento con peróxido. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 500 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 500 μM 169

Figura 96. Efecto neuroprotector de los compuestos 6b y 7b frente a peróxido 400 μM durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la relación GSH/GSSG, los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h antes del tratamiento con peróxido. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 400 μM ; $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 400 μM 170

Figura 97. Efecto neuroprotector de los compuestos 6b y 7b frente a peróxido 500 μM durante 2h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la relación GSH/GSSG, los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 6h antes del tratamiento con peróxido. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 500 μM . $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 500 μM 171

Figura 98. Cuantificación de la cantidad de proteína HMOX-1 mediante Western-Blot en diferentes condiciones. En la parte de la izquierda aparece la imagen del gel, cada carril es una condición: A: control, B: control con H_2O_2 750 μM , C: células tratadas con 6b 20 μM , D: células tratadas con 6b 40 μM , E: células tratadas previamente con 6b 20 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , F: células tratadas previamente con 6b 40 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , G: células tratadas con 7b 20 μM , H: células tratadas con 7b 40 μM , I: células tratadas previamente con 7b 20 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , J: células tratadas previamente con 7b 40 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM . En la parte de la derecha de la imagen aparece la relación normalizada entre HMOX-1/Actina. # $p < 0.01$ control con H_2O_2 750 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 750 μM 172

Figura 99. Cuantificación de la cantidad de Nrf2 mediante Western-Blot en diferentes condiciones. En el lado izquierdo de la figura se representa la imagen del gel, cada carril es una condición: A: control, B: control con H_2O_2 750 μM , C: células tratadas con 6b 20 μM , D: células tratadas con 6b 40 μM , E: células tratadas previamente con 6b 20 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , F: células tratadas previamente con 6b 40 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , G: células tratadas con 7b 20 μM , H: células tratadas con 7b 40 μM , I: células tratadas previamente con 7b 20 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , J: células tratadas previamente con 7b 40 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM . En la parte de la derecha de la imagen aparece la relación normalizada entre Nrf2/Actina. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 750 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 750 μM 173

Figura 100. Cuantificación de la cantidad de KEAP1 mediante Western-Blot en diferentes condiciones. En el lado izquierdo de la figura se representa la imagen del gel, cada carril es una condición: A: control, B: control con H_2O_2 750 μM , C: células tratadas con 6b 20 μM , D: células tratadas con 6b 40 μM , E: células tratadas previamente con 6b 20 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , F: células tratadas previamente con 6b 40 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , G: células tratadas con 7b 20 μM , H: células tratadas con 7b 40 μM , I: células tratadas previamente con 7b 20 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM , J: células tratadas previamente con 7b 40 μM y posteriormente con H_2O_2 750 μM . En la parte de la derecha de la imagen aparece la relación normalizada entre Keap1/Actina. # $p < 0.05$ control con H_2O_2 750 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 750 μM 174

Figura 101. Cambios estructurales en la curcumina para generar las 1,3- β -dicetonas de las series a y la b..... 179

Figura 102. 1,3-b-dicetonas 1a y 1b.....	179
Figura 103. Estructuras de las 1,3- β -dicetonas.....	180
Tabla 1. Prevalencia mundial de las tres principales enfermedades neurodegenerativas (Sacada de Informe Neuroalianza). ⁵	31
Tabla 2. Prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas en Europa. (Sacada de Informe Neuroalianza). ⁵	31
Tabla 3. Funciones potenciales de algunos antioxidantes en la enfermedad de Alzheimer (Modificada de Moneim y col., 2015). ¹¹⁷	63
Tabla 4. Posibles mecanismos implicados en la disminución del EO de EGCG, resveratrol y curcumina en la EP (Modificada de Ding y col., 2018). ¹²⁰	64
Tabla 5. Relación de Anticuerpos primarios y secundarios empleados.....	104
Tabla 6. Capacidad AOX del trolox, de la curcumina y de la serie a y b determinada mediante ABTS y FRAP. Valores de IC50, definidos como la cantidad de AOX necesaria para disminuir la concentración de radicales iniciales en un 50% y valores TEAC definidos como la capacidad antioxidante equivalente al trolox. En el caso del FRAP se muestra la capacidad reductora del compuesto a 100 y 200 μ M. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado.....	107
Tabla 7. Capacidad AOX del trolox, de la curcumina y de la serie a y b determinada mediante DPPH. Valores de IC50, definidos como la cantidad de AOX necesaria para disminuir la concentración de radicales iniciales en un 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado.	108
Tabla 8. Propiedades drug-like de la curcumina y de las 1,3 β -dicetonas. Los cálculos se realizaron con MedChem Designer(TM) MedChem – Designer – Simulations – Plus - Inc. ; Lancaster, CA, USA: 2014. Version 3.1.0.30. PM: peso molecular; MlogP: Moriguchi logP; logD: coeficiente de distribución a pH 7.4; NO: número de átomos de oxígeno; TPSA: Área de superficie polar total; HBD: número de grupo donante de enlace de hidrógeno.....	110
Tabla 9. Citotoxicidad de la curcumina y de la serie a y b sobre la línea neuronal SH-SY5Y. Valores de DL50, definidos como la cantidad de compuesto necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT.....	111
Tabla 10. Citotoxicidad de la curcumina y de la serie a y b sobre la línea neuronal HT-22. Valores de DL50, definidos como la cantidad de compuesto necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT.	119
Tabla 11. Citotoxicidad de la curcumina y de la serie a y b sobre la línea neuronal HepG2. Valores de DL50, definidos como la cantidad de compuesto necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT.	128
Tabla 12. Actividad neuroprotectora en la línea neural SH-SY5Y bajo condiciones de estrés oxidativo (H ₂ O ₂ 200 μ M).La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT.	133
Tabla 13. Solubilidad máxima de la curcumina y de los compuestos 6b y 7b en PBS 10mM. Los valores son la media \pm la desviación estándar de dos experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado.	140

Tabla 14. Estabilidad de la curcumina y de los compuestos 6b y 7b en PBS 10mM. Los valores son la media \pm la desviación estándar de dos experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado. 140

Esquema 1. Ensayo para determinación de la citotoxicidad de los compuestos. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT. 88

Esquema 2. Ensayo de neuroprotección en condiciones de EO inducida por H₂O₂. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT. 89

Esquema 3. Ensayo de neuroprotección en condiciones de EO inducida por H₂O₂. Determinación de la viabilidad celular mediante LDH. 90

Esquema 4. Ensayo para la determinación de la DL50 de los inductores de EO. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT. 93

Esquema 5. Ensayo de neuroprotección en condiciones de EO inducido por inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT. 94

Esquema 6. Ensayo de neuroprotección en condiciones de excitotoxicidad inducida por glutamato. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT. 95

ABREVIATURAS

6OHD: 6-hidroxi dopamina

ABTS^{•+}: 2,2-azino bis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico

AOX: antioxidante

APOE: apolipoproteína E

ATCC®: American Type Culture Collection

ATP: adenosina trifosfato

BSA: Albúmina sérica.

CF3: trifluorometilo

DCF: diclorofluoresceína

DCFH₂-DA: diacetato de diclorofluoresceína

DL50: dosis letal 50

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH[•]: 1,1-difenil-2-picrilhidacil

EA: Enfermedad de Alzheimer

EDTA: Ácido tetraetilendiaminacético.

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EM: Esclerosis Múltiple

END: Enfermedades neurodegenerativas

ENM: Enfermedades Neuromusculares

EO: estrés oxidativo

EP: Enfermedad de Parkinson

FeCl₃·6·H₂O: tricloruro de hierro Hexahidratado

FRAP: ferric ion reducing antioxidant power

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

H₂O₂: peróxido de hidrógeno

HBD: número de grupos donantes de enlace de hidrógeno

HCl: ácido clorhídrico

HMOX: hemo-oxigenasa

IC₅₀: concentración a la cual se captan el 50% de los radicales libres.

JC-1: ioduro 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolcarbocianina

Keap1: proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch

LDH: Lactato Deshidrogenasa extracelular

logD: coeficiente de distribución a pH 7,4

logP: coeficiente de reparto

MAO: monoamino-oxidasa

MDA: malondialdehído

MlogP: Moriguchi logP

MPP⁺: 1-Methyl-4-phenylpyridinium

MTT: 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NaOH: hidróxido sódico

NEM: N-etilmaleimida.

NO: número de átomos de oxígeno

Nrf: factores relacionados al factor nuclear

OPT: Orto-phthaldialdehyde

PBS: phosphate-buffered saline

Ph: fenilo

PM: peso molecular

PPA: proteína precursora del amiloide

RCS: especies reactivas de carbono

RNS: especies reactivas de nitrógeno

ROS: especies reactivas de oxígeno

SDS: Dodecilsulfato sódico.

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TBA: Tiobarbitúrico.

TMOP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano

TPSA: área de superficie polar total

UV: ultravioleta

$\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

RESUMEN

El estrés oxidativo celular ha sido reconocido en los últimos años como un jugador clave en diferentes enfermedades, entre ellas las neurodegenerativas. Debido a que el cerebro es un órgano metabólicamente hiperactivo y con menor capacidad para la regeneración celular en comparación con otros órganos, es extremadamente vulnerable a este daño. Dentro de los compuestos estudiados en los últimos años como posibles metabolitos reguladores del estrés oxidativo, la curcumina ha sido objeto de numerosos estudios como posible terapia frente al daño oxidativo. Debido a sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas tales como su baja solubilidad en agua, su baja biodisponibilidad, su alta inestabilidad química y su mala absorción digestiva, esta molécula presenta dificultades a la hora de llegar a sus dianas fisiológicas. Por ello, en este trabajo se han evaluado las propiedades antioxidantes de catorce derivados asimétricos de la curcumina, con la finalidad de caracterizar aquellos derivados con mejor perfil antioxidante, de tal manera que pudiéramos seleccionar aquellos que además presentaran mejores características para actuar a nivel neuronal.

Los ensayos realizados para estudiar la capacidad antioxidante han sido ABTS, FRAP y DPPH habiéndose encontrado que todos los compuestos presentan propiedades antioxidantes similares a la curcumina. Los estudios de viabilidad celular realizados en las líneas celulares SH-SY5Y, HT-22 y HepG2, han demostrado que estos derivados tienen menor citotoxicidad que la curcumina. De todos los quimiotipos la selección de **6b** y **7b** ha evidenciado que estos dos derivados presentan excelente solubilidad y estabilidad química en medios biorrelevantes, que tienen comportamiento de quelación frente a Fe^{2+} similar a la curcumina, y que además, ambos han proporcionado una buena actividad neuroprotectora contra el estrés oxidativo inducido tanto por generadores de radicales

libres (H_2O_2) , como por inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, o como excitotoxicidad inducida por glutamato.

Teniendo en cuenta estos resultados, se ha evidenciado que los compuestos **6b** y **7b** poseen un prometedor perfil antioxidante, con baja actividad citotóxica y buena actividad neuroprotectora, lo que les hace candidatos para ser una nueva clase química interesante con alto potencial farmacológico como nuevos agentes terapéuticos contra enfermedades neurodegenerativas.

ABSTRACT

Oxidative stress has been recognized in recent years as a key player in different diseases, including neurodegenerative diseases. Because the brain is a metabolically hyperactive organ with less capacity of cell regeneration compared with other organs, therefore is extremely vulnerable to this damage. In the last years a lot of compounds has been studied as a metabolite like anti-oxidative regulator. In fact, curcumin has been object of numerous quimical studies to determine its use against oxidative damage. Due to its pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics such as low solubility in water, low bioavailability, high chemical instability and poor digestive absorption, this molecule presents difficulties to reaching its physiological targets. Therefore, in this work the antioxidant properties of fourteen asymmetric derivatives of curcumin have been evaluated, in order to characterize those derivatives wich present a better antioxidant profile. Then we selected those that also presented better characteristics to act at the neuronal level.

The tests carried out to study the antioxidant capacity have been ABTS, FRAP and DPPH. The results have shown that all the compounds had antioxidant properties similars to curcumin. Cell viability studies on the cell lines SH-SY5Y, HT-22 and HepG2 have shown that these derivatives compared with curcumin had low cytotoxicity. After these assays, **6b** and **7b** compudns had been selected through their excellent solubility and chemical stability in biorelevant media, their chelation behavior against Fe^{2+} , and in addition, about their neuroprotective activity against oxidative stress. Acording to these results, it has been shown that compounds **6b** and **7b** had a favorable antioxidant profile, with low cytotoxic and neuroprotective activity, which makes them the best eligible candidates as therapeutic agents against neurodegenerative diseases.

I.INTRODUCCIÓN

I.INTRODUCCIÓN

I.1. Enfermedades neurodegenerativas.

El sistema nervioso (SN) es una red compleja que permite al organismo comunicarse con el medio en el que vive. Dicha red incluye componentes sensoriales, que detectan cambios en los estímulos del medio exterior, y componentes motores, que producen la contracción de músculos voluntarios como los encargados del movimiento, la contracción de los músculos involuntarios como el corazón y la secreción de las glándulas como por ejemplo la secreción de insulina por parte del páncreas. Los componentes que integran el SN reciben, almacenan y procesan la información sensorial, y después coordinan las respuestas motoras apropiadas. El SN está formado por el sistema nervioso central (SNC), el cual comprende el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), que incluye receptores sensoriales, nervios sensoriales y ganglios situados en el exterior del SN. Ambos sistemas están profusamente comunicados entre sí.

En el SN también se pueden distinguir divisiones sensoriales y motoras. La división sensorial o aferente aporta la información hacia el centro integrador del SN, por lo general sobre fenómenos ocurridos en los receptores sensoriales de la periferia, entre los que se incluyen receptores de diversa naturaleza como receptores auditivos y visuales, quimiorreceptores, receptores somatosensoriales, etc. La información que se recopila desde estos sensores es enviada vía aferente a niveles del SN de forma progresiva hasta llegar a la corteza cerebral. La división motora o eferente transporta la información desde el centro integrador del SN hacia la periferia.²

Teniendo en cuenta la amplia red que forma el SN, las patologías que le pueden afectar son muy numerosas y diversas, entre ellas se encuentran las enfermedades neurodegenerativas (END) las cuales comprenden una serie de enfermedades que tienen como rasgo principal la pérdida progresiva y funcional de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y/o del sistema nervioso periférico (SNP).^{3,4} Estas enfermedades tanto por su morbilidad como complejidad, suponen actualmente uno de los principales retos que afronta la Medicina. Son enfermedades que aunque siempre han estado presentes, en los últimos años han cobrado una especial relevancia ya que están emergiendo como un verdadero problema de Salud Pública en los países desarrollados, representado junto con las enfermedades vasculares y oncológicas, la principal causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial.⁵ Este aumento de las END se asocia a la conjunción de los avances científico-técnicos, así como los cambios socio-económicos y ambientales que han conseguido unos mejores sistemas sanitarios en los países desarrollados, con una mejor calidad asistencial y un aumento de la esperanza de vida que favorece su aumento exponencial asociado al envejecimiento. Por todo ello, no solo en el futuro sino también en estos momentos, las END representan un problema sanitario a tener muy en cuenta ya que previsiblemente se irán transformando en una verdadera epidemia mundial representando una importante carga tanto para la comunidad médico-sanitaria como para la sociedad.

El amplio grupo de las enfermedades neurodegenerativas está constituido por numerosas entidades clínicas entre las que cabe destacar la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), las Enfermedades Neuromusculares (ENM), la Esclerosis Múltiple (EM), la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Enfermedad de Parkinson (EP). Las de mayor prevalencia tanto en el mundo como en Europa son EA, la EP y la EM.

Enfermedad	Casos por 100.000 Hab	Prevalencia	Población afectada a nivel mundial	Referencia
Alzheimer y otras demencias	400	0,5%	35.600.000	(Prince et al., 2013, p. 63)
Parkinson	315	0,34%	23.800.000	(Pringsheim, Jette, Frolkis, & Steeves, 2014, p. 1586)
Esclerosis Múltiple	30	0,03%	2.280.000	(Trisolini, Honeycutt, Wiener, & Lesesne, 2010, p. 6)

Tabla 1. Prevalencia mundial de las tres principales enfermedades neurodegenerativas (Informe Neuroalianza).⁶

Enfermedad	Casos por 100.000 Hab	Prevalencia	Población afectada en EUROPA	Referencia
Alzheimer y otras demencias	854	1,23%	6.341.179	(Gustavsson et al., 2011, p. 729)
Enfermedad de Parkinson	168	0,24%	1.249.312	(Gustavsson et al., 2011, p. 729)
Esclerosis Múltiple	108	0,1%	801.900	(MSIF, 2013, p. 9)
Enfermedades Neuromusculares	29	0,041%	149.079	(Olesen et al., 2012)
Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)	2-5	0,002% - 0,005%	10.281-25.703	(Camacho et al., 2014; Gustavsson et al., 2011)

Tabla 2. Prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas en Europa. (Informe Neuroalianza).⁶

Como se evidencia en las tablas 1 y 2, la EA es la forma más común de demencia, siendo este tipo de enfermedades una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las cifras actuales de prevalencia de las demencias son escalofriantes ya que hay aproximadamente 35 millones de personas afectadas y cada año se registran cerca de 10 millones de casos nuevos. Dentro de todos ellos entre el 60% y el 70% de los casos están causados por EA, lo que representa aproximadamente entre 21-25 millones de personas afectadas en el mundo. En Europa, la prevalencia de la EA y otras demencias es de 1,23% lo que supone unos 6 millones de afectados.⁶ En este momento y teniendo en cuenta que la EA muestra un pico de incidencia de aparición entre los 60 y 70 años, las previsiones de aumento de casos de esta enfermedad están estrechamente ligados a la progresión del envejecimiento de la población, siendo mayor la afectación en mujeres que en hombres.⁷

En Estado Unidos (EE.UU.) Los últimos datos de la Asociación de Alzheimer revelan que aproximadamente 5,7 millones de personas están afectados, de entre los cuales 5,5 millones son mayores de 65 años y unos 200.000 individuos menores de 65. Se estima que el número llegará a triplicarse para el año 2050 con más de 13 millones de enfermos con EA. Como en Europa también se ha visto que hay mayor afectación en las mujeres representando 2/3 de los casos.^{7,8}

En cuanto a la Enfermedad de Parkinson, es la segunda END por orden de prevalencia afectando a unos 23 millones de pacientes en el mundo.⁶ En los países industrializados aparece con una prevalencia de entre el 0,3% y el 1%, en sujetos mayores de 60 años y alcanza el 3% en individuos de más de 80 años, presentando unas tasas de incidencia que varían entre 0,08 y 0,18 por 1.000 personas/año. Esta prevalencia varía ampliamente a lo largo del mundo, siendo en Europa y Estados Unidos donde es más alta.⁹ Según el informe de la Fundación del Cerebro (Brain foundation), la prevalencia en Europa se estima en 108-207 por cada 10⁵ habitantes. En España, los resultados varían entre 150 y 1.500 por cada 10⁵ habitantes, con una media de 682,2 por cada 10⁵. Además, la posibilidad de sufrir Parkinson esporádico aumenta con la edad, debido a las comorbilidades y a la ausencia de respuesta al tratamiento con levodopa, que tiende a decrecer a lo largo de su uso por diversos motivos.¹⁰ En EE. UU., en los últimos años, se diagnosticaron 680.000 casos en adultos jóvenes (45 años o más) estimándose que ese número aumentará hasta unos 930.000 afectados en 2020 y a 1.238.000 en 2030, según las proyecciones de población de la Oficina del Censo de EE. UU.¹¹

A diferencia de la EA, en la EP casi todos los estudios epidemiológicos han mostrado que tanto la incidencia como la prevalencia son de 1,5 a 2 veces mayor en hombres que en mujeres, lo que ha sugerido un posible efecto protector de los estrógenos. Por otro lado, se han visto diferencias interétnicas con un mayor riesgo en poblaciones hispanas.¹²

I.1.1. Semiología de enfermedades neurodegenerativas.

Las END se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales específicas, lo cual implica un incorrecto funcionamiento del SN, ocasionando múltiples signos y síntomas que a grandes rasgos podemos identificar como dificultades en las habilidades motoras tales como el movimiento musculoesquelético, el habla, la deglución, o la respiración, y también defectos en los procesos cognitivos como el aprendizaje, la memoria, los sentidos o el estado de ánimo. Al afectar al SN de manera progresiva pueden aparecer diferencias clínicas y de progresión de la enfermedad, desde formas lentas hasta entidades de progresión más rápida. Esto supone que al inicio, el daño puede pasar desapercibido ya que no es suficiente para mostrar los síntomas y a medida que va progresando la enfermedad comenzamos a ver sus manifestaciones.

I.1.1.1 Enfermedad neuromuscular (ENM).

Este grupo que incluye más de 100 tipos de enfermedades y aunque pueden afectar a individuos de todas las edades, principalmente debutan en la mayoría de los casos durante la edad infantil. Se caracterizan por la pérdida de fuerza por parte de los músculos, lo que conlleva a problemas secundarios como la rigidez o la deformación de las articulaciones. Otros síntomas frecuentes son la fatiga, las contracturas, o la dificultad para la relajación muscular. Las principales manifestaciones no motoras son la alteración de la sensibilidad, el dolor y la disautonomía. La progresión de este tipo de enfermedades puede desembocar en problemas respiratorios y/o cardíacos, que constituyen la principal causa de mortalidad. ¹³

I.1.1.2. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La ELA se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas motoras del cerebro y la médula espinal,¹⁴ involucra principalmente las neuronas responsables de controlar el movimiento de los músculos voluntarios. Los primeros síntomas son debilidad y/o rigidez muscular, con afectación de los músculos que controlan la capacidad de hablar, comer,

moverse e incluso respirar. Tanto las neuronas motoras superiores como las inferiores se degeneran o mueren y dejan de inervar a los músculos, por lo que se debilitan y atrofian gradualmente provocando fasciculaciones, que son pequeñas contracciones musculares involuntarias.¹⁵

I.1.1.3. Esclerosis múltiple (EM).

La EM merece una consideración especial dentro de las enfermedades neuronales ya que posee una alta prevalencia en adultos jóvenes de 20-40 años. Es una enfermedad que se caracteriza por la pérdida de la función motora y sensorial, que resulta de la inflamación mediada por el sistema inmunitario, la desmielinización y el daño axonal posterior. Se produce una lesión de la vaina de mielina (material que rodea y protege las axones de las neuronas), lo que provoca alteraciones de la vista, debilidad muscular, problemas con la coordinación y el equilibrio, entumecimiento, parestesias e incluso problemas en las funciones cognitivas.¹⁶

I.1.1.4. Enfermedad de Alzheimer (EA).

En la EA se ha observado que son principalmente las neuronas colinérgicas del hipocampo y la amígdala las que comienzan a dañarse, lo que clínicamente se refleja con alteración inicial en los procesos de memoria y lenguaje.¹⁷ Este deterioro cognitivo y conductual que parece estar asociado con la agregación de β -amiloide en las neuronas, es el que parece ser el responsable de la neurodegeneración. La EA no afecta por igual a todos los individuos, lo que ha llevado a describir tres etapas diferenciales que pueden aparecer a diferentes edades y no tienen por qué ser progresar de forma lineal.

1. *Etapas de afectación Leve*: pérdida mínima de la memoria, cambios de humor, lentitud de aprendizaje y de reacción, dificultades para la organización y planificación.
2. *Etapas de afectación Moderada*: aumento de la dependencia, incapacidad de orientación y aumento de la pérdida de memoria.

3. *Etapa de afectación Grave*: pérdida de la autonomía, con incapacidad para hablar, para alimentarse, para controlar las funciones corporales.

Actualmente la EA se puede clasificar siguiendo dos criterios principales: según su componente hereditario y según la edad a la que se muestran los síntomas.^{18,19}

Respecto a si posee o no un componente hereditario se clasifican en:

- *Alzheimer familiar*: en los que el origen de la enfermedad posee un componente genético y son la minoría de los enfermos. En estos casos, la apolipoproteína E (APOE) ha sido reconocida como el principal factor de riesgo genético. Aunque los mecanismos que subyacen a la naturaleza patógena del APOE en esta enfermedad no se han dilucidado por completo, se apunta a que la APOE puede contribuir a la patogénesis de la enfermedad a través de la formación de β -amiloide.^{20,21}
- *Alzheimer esporádico*: en la que el origen de la enfermedad es desconocido y ocurre de manera repentina, suelen ser la mayoría de los casos.

Según la edad a la que aparecen los síntomas se clasifican en:

- *Alzheimer de inicio precoz*: generalmente corresponde a los casos de Alzheimer familiar. En ellos la enfermedad aparece antes de los 65 años, incluso antes de los 40.
- *Alzheimer de inicio tardío*: los síntomas se manifiestan después de los 65 años. Es la forma más común de la enfermedad, de la cual hasta el momento no se conocen sus causas y de las cuales se barajan diferentes hipótesis.

I.1.1.5. Enfermedad de Parkinson (EP).

En la EP son las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra* las que empiezan a afectarse provocando modificaciones en el control y en la coordinación del movimiento.¹⁷

Se trata de una enfermedad con afectación principalmente musculoesquelética y actualmente también se reconoce que produce afectación cognitiva.²² La EP al igual que el Alzheimer se puede subdividir en EP de origen esporádico, la mayoría de los casos, y en EP de origen hereditario, que constituyen el 10% de los casos.

En los síntomas motores ^{23,24} nos encontramos con:

- Bradicinesia: lentitud, fatigabilidad y disminución de amplitud en la iniciación y ejecución de un movimiento repetitivo simple.
- Rigidez: se define como la sensación de resistencia a la movilización pasiva de los miembros o cuello del paciente.
- Temblor: característicamente de reposo en fases iniciales que al progresar puede asociar a un temblor postural o de acción.
- Acinesia: “falta de movimiento”, se trata del rasgo fundamental de la enfermedad.

Estos síntomas pueden presentarse aisladamente o en combinación y son característicamente de inicio unilateral manteniéndose un grado de asimetría a lo largo de la enfermedad.

En cuanto a los síntomas no motores nos encontramos con:

- Síntomas cognitivos y conductuales:
 - ✓ Demencia: se trata probablemente del síntoma más discapacitante y que más preocupación y estrés provoca en el paciente y su entorno familiar. Los déficits cognitivos se consideran parte integral del trastorno. La prevalencia acumulada de demencia a lo largo del curso de la EP se sitúa entre el 60 y el 83%, con una prevalencia puntual de hasta el 30%.²⁵
 - ✓ Depresión y ansiedad, psicosis, apatía y fatiga.²⁶
 - ✓ Trastornos del control de los impulsos y conductas compulsivas. Se trata de alteraciones conductuales que se pueden ver asociadas o incrementadas por el uso de la terapia dopaminérgica. Generalmente se presenta en pacientes hombres y que padecen Parkinson de inicio precoz.

- ✓ Pérdida de libido: se puede dar hasta en el 65% de pacientes y en hombres no va siempre asociada a disfunción eréctil. La edad, sexo femenino y depresión son los mayores predictores del riesgo.²⁷
- Síntomas disautonómicos:
 - ✓ Estreñimiento, disfunción urogenital, hipotensión postural, hipersudoración, etc. Estos síntomas son principalmente debidos a la denervación periférica del sistema nervioso autónomo aunque también existe alteración de los centros autonómicos centrales.^{28,29}

I.1.2. Mecanismos etiopatogénicos en las enfermedades neurodegenerativas.

I.1.2.1. Mecanismos generales.

Ya que la etiología de las END permanece aún desconocida se barajan varios mecanismos fisiopatológicos que podrían estar involucrados en su aparición y progresión. La mayoría de estas enfermedades poseen un origen multifactorial y actualmente se apunta a un origen secundario responsable de los cambios en los mecanismos metabólicos o tóxicos de las células, los cuales pueden ocasionar disfunción mitocondrial y/o modificaciones en distintos procesos moleculares que pueden desembocar en el desarrollo de agregados de proteínas neurotóxicas.

I.1.2.1.1. Implicación de plegamientos anómalos de proteínas en END.

Entre los mecanismos propuestos como factores etiológicos de estas enfermedades, se encuentran aquellos relacionados con fallos en el control de la síntesis y del plegamiento correcto de las proteínas.

Entre los mecanismos de control del plegamiento proteico que podrían sufrir cambios funcionales se encuentran:

- *Desregulación de la proteostasis:*

La proteostasis es un mecanismo de regulación de proteínas que se encarga de eliminar proteínas con plegamientos erróneos que pueden llegar a producir agregados tóxicos. Este mecanismo implica varios procesos reguladores de translación y plegado de proteínas, entre los que se incluyen las chaperonas que se encargan de dar la conformación tridimensional a la proteína y de transportarla, y de las respuestas a proteínas malplegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*) que se encargan de degradar proteínas defectuosas enviándolas al proteasoma. Por lo tanto, la proteostasis actúa como control de la calidad de proteínas en los diferentes tipos celulares. En las END este control de proteínas funciona de manera incorrecta con una proteostasis interrumpida, debido a la disminución de la función de la UPR, lo que estaría favoreciendo la acumulación y agregación de proteínas malformadas, provocando disfunción neuronal progresiva y la muerte celular.³⁰

- *Perturbación de la Autofagia:*

Otro proceso relacionado con la regulación de proteínas malformadas es la autofagia, que se trata de un proceso de degradación intracelular dependiente de lisosomas que permite el reciclaje de los componentes citoplasmáticos en materiales bioenergéticos y biosintéticos para el mantenimiento de la homeostasis celular. Dado que la función de la autofagia es particularmente importante en diversas condiciones de estrés, la perturbación de esta puede conducir a disfunción celular y diversas enfermedades como las END.³¹

- *Exosomas:*

Son pequeñas entidades membranosas de origen endocítico producidas por gran cantidad de células. Es otro de los mecanismos de eliminación de proteínas y poseen una gran importancia en los mecanismos de comunicación celular. Estos exosomas son excretados tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas, y sus acciones conducen a la modulación del comportamiento celular para la agregación o

eliminación de determinadas moléculas. Parece que están implicados en las END ya que ayudan a la formación y agregación de proteínas neurotóxicas.³²

- *Priones:*

Los priones son agentes infecciosos que son capaces de formar agregados aberrantes de proteínas. La proteína priónica (PrP) pertenece a la clase de proteínas formadoras de amiloide, de las cuales y en algunos casos se han asociado a ciertas END como la EA. El daño se produce por la conversión de una glucoproteína de superficie celular normal (PrPC) en una isoforma con su conformación alterada (PrPSc), la cual es capaz de iniciar una reacción autocatalítica que produce la acumulación de amiloide en el SNC y que conduce al desarrollo de neurodegeneración.³³

En general, la actividad alterada de estos sistemas de degradación de proteínas provoca la formación de agregados anormales que pueden ser causantes de enfermedades. Existen evidencias que demuestran como la desregulación de estos procesos estaría implicada en trastornos neuronales como la EA, la EP, la ELA y la EM, ya que favorece la aparición de priones, α -sinucleína y proteína tau anormal, lo que termina provocando una disfunción neuronal con una transcripción desregulada y un transporte axonal deteriorado. Por lo tanto, la agregación de proteínas defectuosas y su acumulación en el SN estarían dificultando las funciones mitocondriales y proteómicas, el transporte axonal y la transmisión sináptica. Además parece que hay mecanismos que pueden facilitar la diseminación de estas proteínas erróneas desde zonas con neuronas enfermas a lugares donde no hay afectación, lo que estaría implicado en la expansión del daño neuronal y la progresión de la neurodegeneración en diferentes áreas del SN.

1.1.2.1.2. Implicación del daño oxidativo en END.

Además de la posible implicación de los fallos en la eliminación de las proteínas malformadas como mecanismo fisiopatológico común en varias END, en numerosos estudios se ha evidenciado que estas enfermedades poseen otro vínculo fisiopatológico común como es la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS generan un amplio abanico de respuestas celulares como son: el estrés oxidativo (EO), el aumento de calcio intracelular, el aumento de la peroxidación lipídica, el aumento de la carbonilación de proteínas y/o un desequilibrio en la concentración de hierro y cobre.³⁴ Todos estos procesos son inductores de daño celular ya que pueden deteriorar el sistema de reparación de ADN, alterar los lípidos y las proteínas, traduciéndose todo ello en una pérdida de la función mitocondrial acelerando el proceso de envejecimiento celular. El cerebro es extremadamente vulnerable al daño oxidativo ya que es un órgano con un metabolismo elevado y alto consumo de oxígeno, que además cuenta con una menor capacidad de regeneración celular y tiene gran cantidad de lípidos en comparación con otros órganos, por lo que se ha descrito que los ROS pueden estar implicados en la patogénesis de las END.³⁵

1.1.2.2. Mecanismos etiopatogénicos en Alzheimer y Parkinson.

Teniendo en cuenta que dentro de las END Alzheimer y Parkinson son las de mayor prevalencia y que probablemente tendrán una progresión exponencial a lo largo de los años, es importante ahondar en sus mecanismos fisiopatológicos.

1.1.2.2.1. Mecanismos etiopatogénicos en EA.

Ya que en la EA las causas no han sido completamente dilucidadas, se define como un trastorno heterogéneo con interrelación entre una serie de factores genéticos y factores adquiridos a lo largo de la vida. Avances recientes en estudios celulares y moleculares revelan que la formación de β -amiloide y otros derivados de la proteína precursora de amiloide son los principales responsables de los cambios en el cerebro de pacientes con

Alzheimer. Además, la disfunción mitocondrial y de neurotransmisores, el estrés oxidativo, la inflamación y los trastornos neuroinmunes y tróficos se incluyen como factores etiológicos en distintos síndromes de demencia asociados a la pérdida de un número crítico de dendritas y de sus conexiones sinápticas.³⁶

En la histopatología de la EA se destaca una atrofia severa de la corteza cerebral, producida por la pérdida de neuronas corticales y subcorticales y de conexiones dendríticas en áreas de la corteza y del hipocampo, debida a la formación de las denominadas placas seniles y ovillos neurofibrilares en los cuerpos neuronales.^{37,38} Las placas seniles consisten en cuerpos extraneuronales de forma esférica formados por agregados de β -amiloide y rodeados de formaciones neuríticas anómalas, como dendritas y axones pequeños degenerados, asociados a astrocitos y células de la microglia activadas. Los ovillos neurofibrilares son formaciones proteicas intracelulares que aparecen en neuronas corticales y límbicas. Entre las proteínas implicadas en la formación de estos ovillos se encuentra la proteína tau (τ), la cual se encarga de la estabilización de los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina. En la EA esta proteína tau se encuentran fosforilada de forma anómala, lo que da lugar a la formación de filamentos helicoidales apareados insolubles que crean los ovillos neurofibrilares.

En los últimos años la teoría más aceptada para explicar las causas de la EA es la denominada "cascada amiloide", que establece que el fenómeno patológico central es el depósito extracelular de placas β -amiloides que conduce a daño axonal mediante procesos inflamatorios, la alteración en la estructura del citoesqueleto microtubular neuronal y la aparición de los cambios neurofibrilares y neurodegenerativos, dando como resultado final de la muerte neuronal. Este depósito extracelular de placas β -amiloides se produce cuando el proceso de metabolización de la proteína precursora del amiloide (PPA) se realiza de manera incorrecta; la PPA se procesa por acción de enzimas β -secretasas para generar β -amiloide,

cuando se produce un fallo en este proceso se generan los agregados de β -amiloide los cuales se encuentran presentes en las placas neuríticas.^{39,40,41,42} Estos resultados, se han visto apoyados por los estudios realizados en modelos experimentales, donde ratones transgénicos con EA y aumento de la expresión de la PPA, muestran un aumento del daño oxidativo y parecen tener síntomas relacionados con la degeneración neuronal.⁴³

Además de esta posible etiopatogenia para EA, se propone también como posible mecanismo de afectación neuronal el déficit específico de las enzimas acetilcolintransferasa (AChT) y acetilcolinesterasa (AChE), lo que se correlaciona con un déficit colinérgico que conllevaría a la disfunción cognitiva. La enzima AChT es esencial para la síntesis de acetilcolina (ACh) y la deficiencia de esta enzima se relaciona con una disminución del nivel neurotransmisor lo que terminaría provocando daño neuronal. La pérdida de neuronas colinérgicas en los núcleos basales estaría por tanto correlacionada no solo con el déficit de AChT, sino también con la aparición de las placas neuríticas, lo que permite formular la denominada “hipótesis colinérgica”.⁴⁴

Otro de los procesos fisiopatológicos definidos en la etiopatogenia de la EA indica que modificaciones en la concentración de glutamato pueden estar implicados en esta enfermedad. El glutamato posee diversas funciones en el organismo; participa en numerosas rutas metabólicas y forma parte de la mayoría de las proteínas. En el SNC además de estas funciones, su principal papel es facilitar y agilizar la comunicación entre las neuronas como neurotransmisor excitatorio. Una vez que el glutamato es liberado al espacio sináptico interactúa con la neurona receptora mediante receptores específicos, localizados en la superficie de la membrana. Existen al menos cuatro tipos de receptores que pueden reconocer al glutamato, tres de ellos son receptores ionotrópicos, los cuales forman canales que permiten el paso de iones como el sodio y el

calcio; el otro tipo son receptores metabotrópicos, los cuales al interactuar con el glutamato pueden activar diferentes rutas de señalización a nivel neuronal. Por otro lado, la sobreestimulación de los receptores ionotrópicos por glutamato produce una sobrecarga de calcio en el interior celular, la cual induce hiperexcitabilidad y neurotoxicidad, provocando un EO que da lugar a la degeneración celular y en consecuencia la muerte neuronal.^{45,46}

Esta serie de eventos se asocia a END como la ELA, EM, EP y la EA, y por esta razón es interesante conocer la capacidad de nuevos compuestos con potencial terapéutico de proteger frente a la neuroexcitotoxicidad inducida por glutamato, ya que constituye la fase previa al desarrollo de un proceso neurodegenerativo.⁴⁷

Por todo ello, en la actualidad se piensa que en la EA los epifenómenos subyacentes a los trastornos que ocurren en los sistemas de distintos neurotransmisores, como el glutamato, la noradrenalina, la dopamina, la serotonina y la histamina, estarían implicados en la fisiopatología de esta enfermedad.^{48,49}

Además de las posibles causas citadas, en la EA se ha visto que una minoría de los casos tienen un origen genético. En este sentido, y como se ha mencionado anteriormente, parece que el gen APOE puede poseer un papel importante en la modulación de la patogénesis de la enfermedad. En condiciones normales la expresión del gen da como producto la apolipoproteína E (ApoE), que se encarga del transporte de lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol hacia el sistema linfático y luego a la sangre. Esta proteína, aunque se expresa mayoritariamente en el hígado, aparece también en los astrocitos y en las neuronas del SNC, estando implicada en el remodelado y reparación de las conexiones sinaptodendríticas. El gen de la APOE es un gen polimórfico que posee tres alelos principales ApoE2, ApoE3 y ApoE4. Estudios genéticos realizados en pacientes con Alzheimer familiar, han demostrado que la expresión del alelo ApoE4 podría estar involucrado en

una mayor sensibilidad de contraer la enfermedad ya que los pacientes con este genotipo poseen mayores niveles plasmáticos de marcadores de EO, lo que podría obstaculizar la reparación de las conexiones sinápticas. En los últimos años las pruebas de genotipado de APOE están emergiendo como posibles marcadores de diagnóstico y evaluación de riesgo de padecer la enfermedad, por lo que se están empezando a sugerir estrategias terapéuticas dirigidas al control de la APOE4.^{50,51}

1.1.2.2. Mecanismos etiopatogénicos en EP.

Respecto a la etiopatogenia de EP, esta enfermedad se define como un trastorno motor complejo del SNC cuyas manifestaciones clínicas están relacionadas con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el *locus ceruleus* y en la *pars compacta* de la *sustancia nigra*. El daño celular se relaciona con la agregación de la proteína α -sinucleína que forma los cuerpos de Lewy induciendo la lesión de las células y su muerte progresiva, lo que afecta las vías de señalización de la coordinación de movimientos. Aunque no se conoce del todo la función fisiológica de la α -sinucleína, su sobreexpresión en las neuronas induce la apoptosis celular, liberando proteínas pro-apoptóticas como el citocromo C, y la acumulación de estas proteínas en el retículo endoplasmático desencadenaría también la respuesta UPR.^{52,53}

Actualmente no se conoce si la α -sinucleína precede y desencadena indirectamente el daño mitocondrial o si los déficits mitocondriales conducen a la disfunción neuronal y la acumulación sináptica de α -sinucleína tal y como se muestra en la figura 1(a y b).¹ Se ha descrito que las inclusiones de α -sinucleína favorecen el aumento de la entrada de calcio en la mitocondria, elevando así el EO mitocondrial en las neuronas dopaminérgicas, por lo que la formación de α -sinucleína como el daño mitocondrial parecen actuar como factores fundamentales en la patogénesis de la EP.⁵⁴

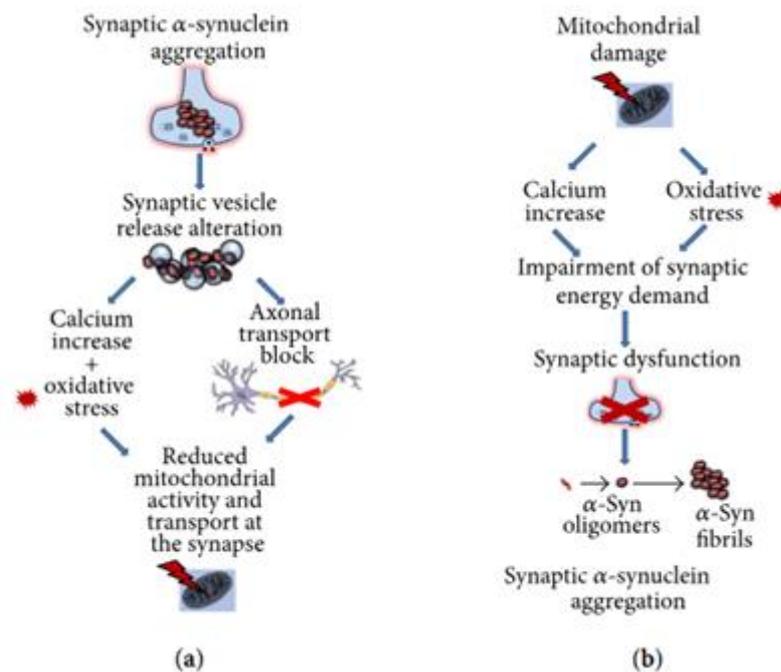


Figura 1. Posibles hipótesis bajaradas para la EP. En la figura (a) se presenta la α -sinucleína como inductor del EO y en consecuencia de la disfunción mitocondrial y en la figura (b) se presenta que el desencadenante es el daño mitocondrial, el cual genera cierto EO y en consecuencia la acumulación de α -sinucleína lo que genera una disfunción sináptica. (Zaltieri y col.,2015)¹

Además, del daño mediado por α -sinucleína, en la EP también se ven exacerbados múltiples procesos neuroinflamatorios, como por ejemplo reacciones mediadas por la microglía, aumento de la expresión de sustancias proinflamatorias y la infiltración linfocítica, particularmente en la *sustancia nigra*. Todo esto hace pensar que la neuroinflamación también está implicada en la patogenia de Parkinson y como consecuencia en los consiguientes síntomas conductuales.^{55,56} Esto sugiere que tanto la agregación, el daño oxidativo, la neuroinflamación y como consecuencia el deterioro mitocondrial pueden constituir un papel importante en los procesos de neurodegeneración en la EP.

Análogamente a lo que ocurre en la EA, alrededor del 10% de los casos de Parkinson son de tipo hereditario, y se han descrito varios genes implicados en su etiopatogenia. Todos ellos son de la familia PARK, como el PARK1/4 (SNCA), PARK8 (LRRK2), PARK6 (PINK1), PARK2 (PRKN) y

PARK7 (DJ-1). Estos genes están implicados en varios procesos celulares como el metabolismo de la dopamina, la disfunción mitocondrial, el estrés que se produce en el retículo endoplasmático y en la alteración de la autofagia⁵⁷

- El PARK1/4 o gen SNCA fue el primero que se asoció inequívocamente con el parkinsonismo familiar. La aparición de una mutación sin sentido en este gen provoca una malformación en la α -sinucleína, que afecta a las vesículas de neurotransmisores sinápticos afectando a la modulación de la liberación del neurotransmisor, lo que provocaría alteraciones funcionales en las neuronas dopaminérgicas. Además se ha descrito que en ratones transgénicos con EP temprana, la mutación A53T de α -sinucleína podría suprimir la autofagia en el cerebro produciendo una sinucleinopatía. También la agregación de esta α -sinucleína mutada está implicada en la generación de disfunción mitocondrial asociada a EO previo.⁵⁸
- El gen PARK8 o *LRRK2* codifica la proteína dardarina que parece jugar un papel importante en el ensamblaje del citoesqueleto y en la transmisión de señales ayudando a la comunicación celular. Mutaciones en este gen están implicadas en la modificación de la transmisión de dopamina, al mismo tiempo pueden reducir la eficiencia del sistema de la autofagia lo que facilitaría la acumulación de α -sinucleína por lo que su implicación en la génesis de la EP estaría relacionada por un lado con un aumento en los cuerpos de Lewy y por otro lado una disminución en las neuronas dopaminérgicas.⁵⁹
- PARK6 o *PINK1* codifica para la proteína quinasa putativa inducida por PTEN 1. Esta proteína se encuentra en las mitocondrias de todas las células del cuerpo. Su función aún no se conoce completamente, pero parece que ayuda a proteger a las mitocondrias de un mal funcionamiento durante períodos de estrés celular, por lo que podría tener un papel neuroprotector. Aunque

las mutaciones en PINK1 son poco frecuentes, pueden explicar algunos casos de EP de inicio temprano en los que se ve alterada la respuesta de la mitocondria frente al estrés celular.⁶⁰

- El gen PARK2 o PRKN codifica para una proteína llamada parkina. Se trata de una proteína ubiquitina-ligasa involucrada en la degradación de proteínas mediante la vía proteosómica. Mutaciones en este gen provocan que la parkina no pueda eliminar correctamente las proteínas malformadas lo que lleva a su acumulación y en consecuencia a una posible disfunción mitocondrial. Aunque hoy en día sigue siendo una incógnita la interacción funcional entre la ubiquitinización de proteínas malformadas por parte de la parkina y el control de calidad mitocondrial regulado por PINK1, se sabe que estos mecanismos están relacionados por lo que se ven implicados en el correcto funcionamiento de la mitocondria y por lo tanto en el funcionamiento celular. Mutaciones en PINK1 y en PARK2 interfieren con los eventos mencionados anteriormente, lo que sugiere que poseen cierta importancia en la etiología de la EP.⁶¹ Estudios en *Drosophila melanogaster* corroboraron que los genes PARK6 (PINK1) y PARK2 (Parkina) están vinculados a una vía común involucrada en el mantenimiento mitocondrial. Mutaciones en estos genes causa la pérdida de la función en esta vía lo que conlleva a alteraciones morfológicas y funcionales de la mitocondria, que conduce a la degeneración muscular del vuelo y la muerte celular en grupos específicos de neuronas dopaminérgicas. En mamíferos se demostró también que ambos genes conjuntamente regulan la eliminación de las mitocondrias disfuncionales por la vía autofagia-lisosoma, mediante el proceso conocido como mitofagia y que mutaciones en estos genes hacen que se vea afectada esta vía de eliminación.⁶²
- El gen PARK7 o DJ1 codifica una proteína que pertenece a la familia ThiJ/Pfp1. Aunque aún no se conoce realmente el papel de

DJ-1 dentro de las células, existen varias funciones propuestas. En la actualidad, la función más aceptada es la de proteger las neuronas del estrés oxidativo y/o protegerlas contra el daño mitocondrial. Sin embargo, este mecanismo aún no está claro, pero se sabe que posee propiedades antioxidantes, efectos antiapoptóticos y efectos sobre la función respiratoria mitocondrial, la morfología, el recambio y la biogénesis. Mutaciones en DJ-1 afectan principalmente a una proteína involucrada en la oxidoreducción intracelular, lo que aumenta la sensibilidad hacia el EO y disminuye la capacidad neuroprotectora. También se ha visto que mutaciones en este gen poseen cierta relación con la aparición temprana de la EP.^{58,63}

I.2. Producción de radicales libres, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial.

I.2.1. Producción de radicales libres y estrés oxidativo.

El oxígeno es un elemento esencial para los organismos aerobios, entre ellos el ser humano y aunque es un elemento imprescindible para la vida, un estado de hiperoxia conduce a la toxicidad celular. En el cuerpo humano los radicales libres se genera de forma constante, ya que son productos de múltiples procesos fisiológicos como por ejemplo, la respiración celular, la actividad fagocítica, las oxidaciones biológicas, la actividad de la xantina oxidasa, el envejecimiento, la alimentación, etc. Estos radicales son especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de carbono (RCS), siendo las ROS los que se producen de manera mayoritaria debido a que el oxígeno es el elemento esencial para la respiración aerobia.⁶⁴

En la respiración mitocondrial, y de forma específica en la cadena transportadora de electrones, el O₂ se reduce completamente actuando como aceptor final de cuatro electrones, lo que genera una molécula de agua. Durante este proceso se produce una reducción parcial generando

ROS ya que la configuración electrónica del O_2 en su estado fundamental contiene dos electrones desapareados. Sin embargo, el hecho de que los dos electrones desapareados tengan el mismo espín hace que la molécula de oxígeno no pueda aceptar directamente dos electrones de otra molécula, ya que la combinación final de espines incumpliría el principio de exclusión de Pauli, por lo que tiende a aceptar electrones de uno en uno. ^{65,66}

La adición de un electrón conduce al radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la aceptación del segundo electrón da lugar al anión peróxido (O_2^{2-}) que al combinarse con hidrógeno genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Al perderse una molécula de agua se genera el radical hiroxilo ($\cdot OH$), y por último tiene lugar la unión de un protón y un electrón al radical hidroxilo para finalmente dar una molécula de agua tal y como se ve en la figura 2.

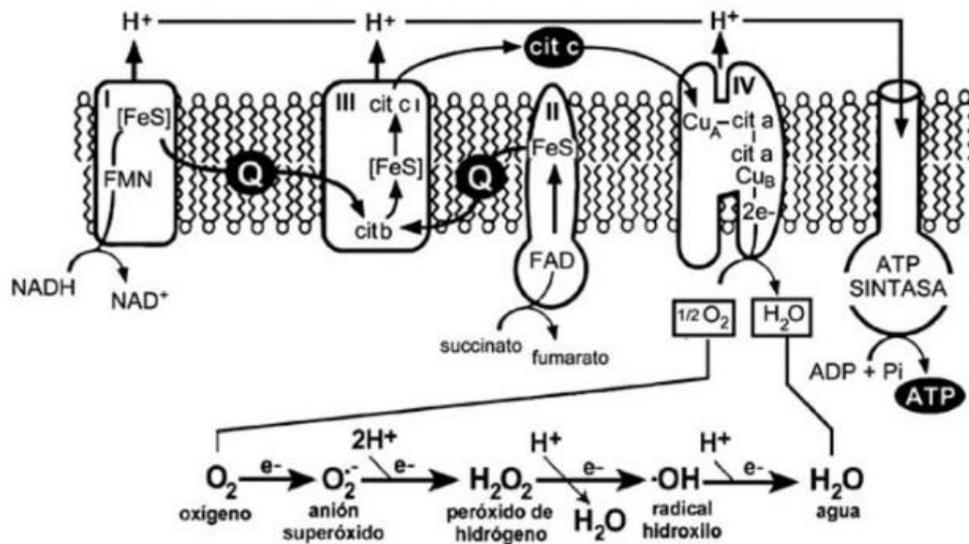


Figura 2. Generación de especies reactivas de oxígeno por la cadena de transporte electrónico mitocondrial. (Angoso, 2008)⁶⁷

En condiciones metabólicas el organismo está continuamente generando radicales libres, no solo en la cadena de transporte electrónico mitocondrial para producir gran cantidad de energía en forma de ATP,

sino que también existen otros complejos enzimáticos productores de ROS en la mitocondrial y/o en el citosol.

Estos complejos enzimáticos son:

- 1) La NADPH-oxidasa, complejo enzimático multimérico perteneciente a la familia de genes NOX que comprende el citocromo b558 compuesto por la subunidad p22PHOX y la subunidad gp91PHOX que se encuentran ancladas a la membrana, varias proteínas citosólicas (p47PHOX, p67PHOX, y p40PHOX) y la proteína G Rac. La NADPH-oxidasa se activa cuando las subunidades citosólicas son fosforiladas y Rac es activada en el citosol, lo que produce su translocación a la membrana y la formación del complejo NADPH-oxidasa activo. Esta enzima transfiere un protón a través de la membrana y genera como producto el anión superóxido. Dicha enzima se expresa en la glía, los astrocitos y en las neuronas aunque su papel es aún desconocido.⁶⁸
- 2) La xantina-oxidasa (XO) (que junto con la xantina-deshidrogenasa son dos formas convertibles de la oxidoreductasa). Se encuentra en altas concentraciones en la leche de mamíferos y está ampliamente distribuida en los tejidos de estos. Está considerada una enzima clave para el catabolismo de las purinas. La XO cataliza una gran variedad de sustratos y tiene la capacidad de pasar electrones al oxígeno molecular para producir ácido úrico, anión superóxido y peróxido de hidrógeno.⁶⁹
- 3) Las monoamino-oxidasas (MAO-A y MAO-B), localizadas en la membrana exterior de la mitocondria y se encargan del catabolismo oxidativo de neurotransmisores amínicos como la serotonina, la dopamina y la epinefrina. Para su función utilizan FADs (Flavín-Adenina-Dinucleótidos) y en consecuencia producen aldehídos. El ciclo FAD-FADH₂ genera peróxido de hidrógeno.⁷⁰

Todos estos radicales producidos son moléculas altamente inestables y con gran poder reactivo capaces de generar daño celular. Numerosos estudios demuestran que un aumento de estos radicales libres en el interior de la mitocondria puede generarle daños tanto en su función como en su morfología, asociados en numerosas ocasiones a lesiones en su ADN. Este daño en el ADN mitocondrial puede inducir deleciones y mutaciones puntuales en sus genes, desencadenando disfunción en la mitocondria responsable de la lesión celular descrita en el proceso de envejecimiento. Por otro lado, es conocido que cuando se produce una mayor cantidad de radicales libres, la mitocondria pierde su potencial de membrana ($\Delta\psi_m$), siendo este es uno de los eventos clave que ocurren durante el proceso de apoptosis celular mediada por radicales libres. Por esta razón el potencial de membrana mitocondrial es un parámetro de referencia para evaluar la función mitocondrial y conocer así el estado celular.⁷¹ La relación entre la función mitocondrial, la producción de radicales libres, el daño del ADN mitocondrial y el envejecimiento celular se apunta como un eje importante a la hora de poder comprender parte de los mecanismos etiológicos en las enfermedades neurodegenerativas. Pero además de los radicales libres producidos en la mitocondria a través de estos mecanismos, en la célula hay otros orgánulos que también los producen como son los peroxisomas, donde la aminoácido oxidasa, la acil-CoA oxidasa y la urato oxidasa generan H_2O_2 , y en el retículo endoplasmático, donde el citocromo P-450 cataliza reacciones de monooxigenación que generan O_2^- y H_2O_2 por mecanismos dependientes de NADPH.^{72,73} Tanto el radical superóxido como el peróxido no poseen una elevada reactividad frente a las macromoléculas, pero sin embargo en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre, pueden reaccionar entre sí (reacción de Fenton o Harber-Weiss) y dar lugar al radical hidroxilo (OH^\cdot) que posee una elevada reactividad.⁷⁴

A parte de estas rutas metabólicas productoras de radicales libres en condiciones fisiológicas, existen otros mecanismos inductores que se describen a continuación.

- 1) *Rotenona*: sustancia química de origen vegetal extraída de raíces de plantas del género *Lonchocarpus* y *Derris que fue* ampliamente utilizada como insecticida hasta 2007. Debido a su elevada lipofilia es capaz de atravesar fácilmente las membranas celulares ⁷⁵. Se une al complejo I de la cadena transportadora de electrones inhibiéndolo, lo que da lugar a una reducción en la producción de ATP, y genera un aumento de las ROS causado por la fuga de electrones.⁷⁶ Por otro lado como efecto secundario destacable, la exposición crónica a este pesticida puede reproducir características de la EP. ^{77,78}
- 2) *Oligomicina*: se trata de un antibiótico macrólido producido por bacterias del género *Streptomyces*. No tiene efecto directo sobre la cadena de transporte de electrones ni sobre el gradiente quimiosmótico, ya que actúa específicamente bloqueando el canal de protones en la fracción F₀ de la ATP sintasa, lo que conlleva a la inhibición de la Fosforilación oxidativa. ⁷⁹ En experimentos in vitro, es utilizado como un coinhibidor junto a rotenona para potenciar el efecto inhibitorio sobre la cadena transportadora de electores, generando así un aumento de las ROS, lo cual genera un aumento en el EO y en consecuencia la disfunción mitocondrial.⁸⁰
- 3) *1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺)*: el MPP⁺ es el metabolito tóxico del MPTP, un herbicida con estructura similar al paraquat. El MPTP es oxidado por la enzima MAO-B en los astrocitos a MPP⁺, el cual es captado por las células dopaminérgicas, almacenándose en vesículas citoplasmáticas o mitocondriales, donde inhibe el complejo I de la cadena transportadora de electrones, lo que provoca una disminución en la producción de ATP y muerte de las células dopaminérgicas. ⁸¹ Asimismo el MPP⁺ produce un aumento

en los niveles de ROS por la fuga de electrones que se produce a nivel de la cadena transportadora de electrones,⁸² lo que de forma secundaria, produce la muerte de las células dopaminérgicas del SN a través de mecanismos inflamatorios como respuesta al estrés oxidativo que se genera.^{83,84} Por todo ello es un modelo ampliamente utilizado para mimetizar la disfunción mitocondrial y el EO que se produce en la EP.

- 4) 6-hidroxi-dopamina: se trata de un compuesto análogo a la dopamina que actúa como neurotoxina, ya que es capaz de producir degeneración en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales.⁸⁵ La degeneración neuronal se produce ya que la 6-hidroxi-dopamina al metabolizarse genera una elevada cantidad de radicales libres y quinonas; lo que provoca un rápido descenso en enzimas antioxidantes y la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, con un aumento de las ROS y en consecuencia daños en la estructura y en el metabolismo dando lugar a la muerte celular.⁸⁶ Su toxicidad es selectiva para las neuronas catecolaminérgicas.⁸⁷ Es capaz de producir procesos celulares propios de la enfermedad tales como estrés oxidativo, degeneración neuronal, neuroinflamación y apoptosis.^{88 89}

Como ya se ha apuntado anteriormente, todos estos radicales son moléculas altamente inestables y con gran poder reactivo, capaces de generar daño celular, siendo necesario que el organismo cuente con sistemas biológicos antioxidantes que sean capaces de contrarrestar los efectos tóxicos de estos compuestos.

I.2.1.1. Sistemas celulares antioxidantes.

Se entiende como antioxidante (AOX) a cualquier molécula que pueda prevenir o retardar la oxidación de otra molécula, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Los sistemas antioxidantes mantienen el estado redox a costa de un constante gasto de energía metabólica.

Los AOX biológicos pueden ser de origen interno o externo e incluyen: ⁹⁰

- Antioxidantes enzimáticos:
 - ✓ Superóxido dismutasa: son una familia de enzimas cuya acción antioxidante consiste en catalizar el paso de anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.^{91,92} En mamíferos se han descrito tres isoformas como la cobre-zinc-SOD (Cu/Zn-SOD o SOD-1), la manganeso-SOD (Mn-SOD o SOD-2) y la SOD-extracelular (EC-SOD o SOD-3). ⁹³
 - ✓ Catalasa: también llamada peróxido-reductasa, es una enzima tetramérica que contiene un grupo ferro-porfirínico. Junto con la enzima Glutation peroxidasa (GPx), se encarga de catalizar la reacción de H₂O₂ a O₂ y H₂O. Es una de las enzimas con mayor actividad catalítica, siendo una sola molécula de catalasa capaz de convertir millones de moléculas de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. ⁹⁴ Se encuentra localizada en los peroxisomas aunque también se puede encontrar en el citoplasma y la mitocondria.⁹⁵
 - ✓ Glutation peroxidasa: cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno y de peróxidos lipídicos utilizando para ello la GSH como donante de electrones y como cofactor el selenio, reacción donde se forma H₂O y GSSG, por lo que esta enzima se encarga de la eliminación de radicales libres, lo cual protege al organismo frente al EO.⁹⁶ Existen hasta ocho isoformas de la enzima en tejidos de mamíferos, localizadas en el citosol y en la mitocondria de las células. En el cerebro, las enzimas GPx se expresan en neuronas y células gliales, siendo la GPx4 la isoforma más expresada en el tejido cerebral,⁹⁷ la cual ha sido reconocida recientemente como un regulador clave en la ferroptosis, una vía de muerte celular programada no

apoptótica dependiente de hierro, recientemente descubierta que causa un rápido elevación en las ROS.⁹⁸

- Antioxidantes no enzimáticos:
 - ✓ Cofactores enzimáticos antioxidantes (Se, Coenzima Q10)
 - ✓ Inhibidores enzimáticos oxidativos (Inhibidores de la ciclooxigenasa)
 - ✓ Quelantes de metales de transición
 - ✓ Captadores de radicales libres (Curcuimna, vitamina C y E)

En la figura 3 se esquematiza como la producción de radicales libres asociadas a las funciones metabólicas normales es controlada por alguno de estos mecanismos.

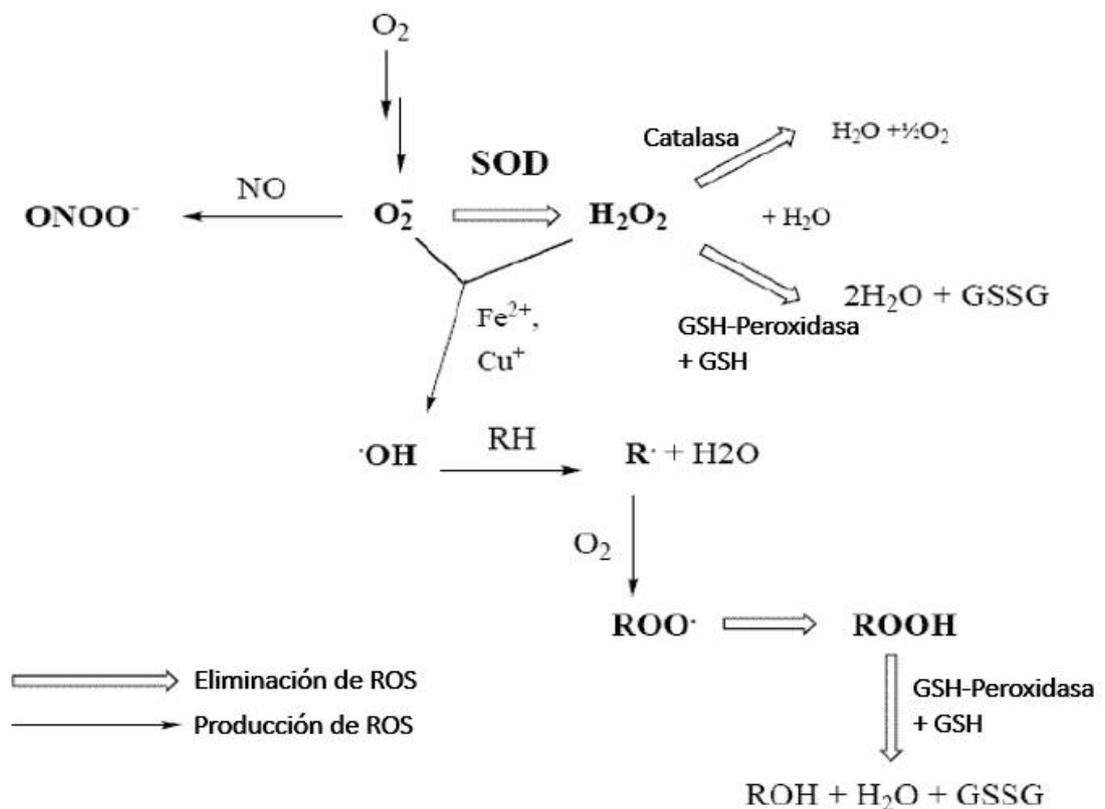


Figura 3. Generación y neutralización de radicales libres. En la figura se observa la producción de ROS y RNS (flecha negra), y la eliminación de estos por parte de los mecanismos celulares (flecha blanca).

Por lo tanto, la finalidad de estos sistemas antioxidantes es reducir de forma constante la producción de radicales para mantener un equilibrio estable entre la oxidación y reducción, siendo imprescindible para el mantenimiento del correcto funcionamiento celular el balance entre los mecanismos de producción y los sistemas de eliminación. Sin embargo, hay situaciones que provocan una pérdida de este equilibrio y terminan generando un estrés oxidativo (EO) por aumento de radicales libres.

I.2.2. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial:

El EO se produce por un desequilibrio entre los sistemas productores de radicales libres del organismo y las defensas antioxidantes endógenas, siendo la causa de lesiones oxidativas en lípidos, proteínas y ADN. Dichas lesiones se manifiestan como peroxidación de los lípidos insaturados de las membranas, modificaciones en el ADN con alteraciones en los pares de bases, roturas de las hebras de ADN, intercambios entre las cromátidas hermanas o estimulación de factores de transcripción nuclear que pueden afectar la regulación de genes. También favorece la producción de cruzamientos entre las proteínas y el ADN, la carbonilación proteica y la pérdida de los grupos SH- de las proteínas, etc. Hay numerosas evidencias que demuestran que el EO provoca disfunción mitocondrial, ya que la mitocondria es el orgánulo con mayor producción de ROS. El radical hidroxilo, el cual se produce en la CTE, es altamente reactivo y puede dañar diferentes macromoléculas dentro de las mitocondrias como proteínas, lípidos y ADN,⁹⁹ el daño irreparable que se produce en el ADN mitocondrial conduce al fallo del complejo I, lo que puede dar como resultado un aumento de electrones que genera la formación de radical superóxido lo que contribuye al estrés oxidativo metabólico.¹⁰⁰ Una vez que se daña el ADN mitocondrial se puede amplificar el EO al disminuir la expresión crítica de ciertas proteínas que son importantes para el transporte de electrones. Esto a su vez crea un círculo vicioso de producción de ROS y daño oxidativo que conduce a la apoptosis celular.⁹⁹

Además la CTE también es sensible al daño mediado por RNS (NO y ONOO). Estos RNS pueden modificar las proteínas mitocondriales y dar lugar a alteraciones funcionales de muchas enzimas metabólicas implicadas en la CTE como el citocromo C oxidasa.

Por lo que la disfunción mitocondrial es de origen multifactorial ya que se produce debido a una serie de factores tales como disfunción de la CTE, estrés oxidativo, desregulación en los niveles de calcio mitocondrial, reducida producción de ATP por la CTE, apertura del poro de transición mitocondrial y desregulación en la eliminación de mitocondrias defectuosas por medio de los sistemas ubiquitina-proteasoma.¹⁰¹

Numerosas evidencias sugieren que el aumento del EO, la apoptosis alterada y en consecuencia la disfunción mitocondrial parecen jugar un papel clave en la patogénesis de varias END como la EA, la EP, la ELA y la enfermedad de Huntington,^{102,103} de tal forma que en los últimos años se ha establecido una relación entre la pérdida de la función mitocondrial y los fallos en la función celular asociada al envejecimiento, ya que como se ha comentado anteriormente, la alta producción de ROS produce una lesión en la membrana interna de las mitocondria, lo que induce un incremento en la generación de especies reactivas generando un sistema de retroalimentación positiva.¹⁰⁴ Estos datos sugieren que el EO y la disfunción mitocondrial pueden jugar un papel clave en la muerte celular y como consecuencia en END como la EA y la EP.

Para determinar los efectos dañinos de los radicales libres y si estos pueden afectar a los cambios en el potencial redox intracelular, la activación génica y la modificación oxidativa de lípidos, proteínas y ADN, se usan biomarcadores celulares que evalúan el estrés oxidativo y de la disminución de la defensa reductora.^{105,106} Entre ellos principalmente se utiliza la peroxidación de lípidos, ya que son uno de los principales objetivos de ROS. Los hidroperóxidos pueden reaccionar con metales de transición como el hierro o el cobre para formar aldehídos estables, como

el malondialdehído (MDA), que dañan las membranas celulares y oxidan las lipoproteínas. La cuantificación de MDA es fácilmente detectable en plasma, suero, tejidos y cultivos celulares permitiendo utilizarlo como marcador biológico del estrés oxidativo.¹⁰⁷ Como biomarcador para la determinación de la disminución de la defensa endógena reductora, se puede utilizar la relación entre el glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado (GSSG). La enzima glutatión (GSH) es la enzima antioxidante más común en células aeróbicas, se trata de un tripéptido (γ-glutamilcisteinilglicina) que actúa como un antioxidante endógeno y está implicado en la regulación del metabolismo y en la detoxificación de sustancias xenobióticas.¹⁰⁸ Dado el alto consumo de oxígeno del cerebro, éste es especialmente susceptible al estrés oxidativo, actuando la GSH como un secuestrador de radicales libres y como un inhibidor de la peroxidación lipídica.¹⁰⁹

El grupo cisteína-tiol confiere a la molécula de GSH su actividad antioxidante,¹¹⁰ ya que es susceptible de ser oxidado por sustancias prooxidantes como los ROS y los RNS, para dar la forma oxidada (GSSG). En condiciones fisiológicas, la forma reducida de la GSH es la predominante, sin embargo el ratio GSH/GSSG disminuye debido al envejecimiento natural del cuerpo humano y en las enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA.^{111,112} Por tanto, la medida del ratio GSH/GSSG en modelos experimentales es un método idóneo para evaluar la eficacia del tratamiento.

En la actualidad se ha descrito un aumento del EO en la EA y la EP relacionado con altos niveles de marcadores de la peroxidación lipídica, disminución de las defensas reductoras asociadas a niveles de glutatión, y delecciones en el ADN mitocondrial. Además, esta situación de EO podría actuar no solo dañando la mitocondria y favoreciendo el acumulo de ROS, sino que sería probable que también participara en la aparición de proteínas aberrantes (α-sinucleína o β-amiloide) y que al escapar del control de eliminación de proteínas malplegadas (fallos en la proteólisis) se podrían acumular y provocarían la neurodegeneración.¹¹³

Por otro lado el organismo posee más de 100 genes involucrados en el sistema antioxidante, existen factores de transcripción que se activan por radicales libres (ROS, RNS), entre ellos destacan el factor nuclear κ B (NF κ B), la proteína activadora 1 (AP1), la hemo-oxigenasa 1 (HMOX-1) y los factores relacionados al factor nuclear (Nrfs).

La hemo oxigenasa (Hmox) es la enzima responsable de la descomposición fisiológica del grupo hemo en biliverdina, monóxido de carbono y hierro. Se han identificado tres isoformas (Hmox-1, Hmox-2 y Hmox-3). La isoforma Hmox-1 es ubicua y su actividad puede incrementarse por el grupo hemo u otras metaloporfirinas, metales de transición y estímulos que inducen el estrés celular. Actualmente Hmox-1 se reconoce como una de las principales proteínas de choque térmico y respuesta al estrés¹¹⁴ y es considerada como un indicador sensible y fiable de estrés oxidativo celular, ya que se sabe que su actividad aumenta en respuesta al EO regulando la expresión inducible de numerosos genes de enzimas anti-apoptóticas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias (figura 4). También ha sido descrita en END como la EA, ya que Hmox-1 se encuentra presente en neuronas y neuroglia, por lo que se ha especulado que podría ser un nuevo objetivo terapéutico para la neuroprotección.^{115,116}

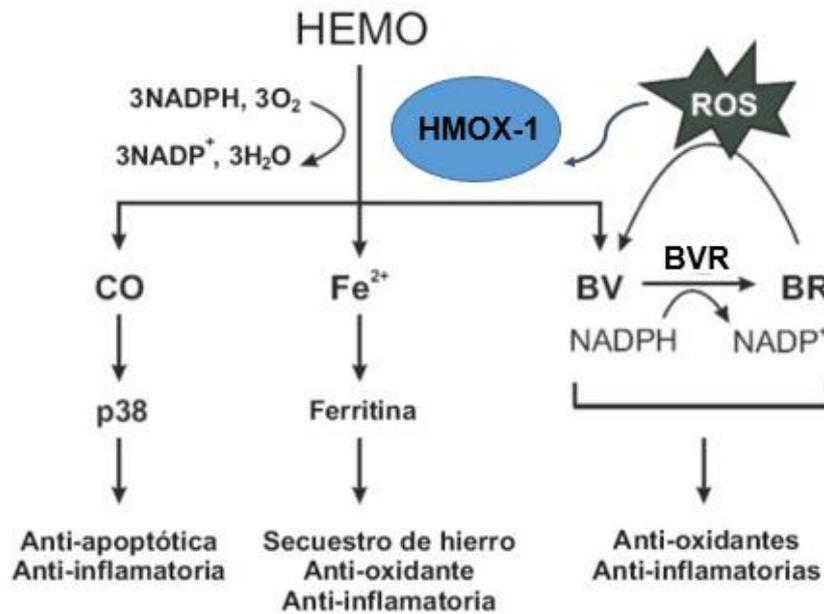


Figura 4. Productos derivados de la actividad de Hmox-1, la cual degrada el grupo hemo en Fe^{2+} , dióxido de carbono (CO) y biliverdina (BV) para la posterior inducción de la expresión de numerosos genes de enzimas anti apoptóticas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias (Modificada de Jazwa y col., 2010).¹¹⁵

Por otro lado, los factores relacionados al factor nuclear (Nrf2) contribuyen a la actividad del proteosoma 26S, lo cual confiere protección contra el estrés oxidativo y los xenobióticos. Uno de los factores más estudiados actualmente es Nrf2, el cual regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas antioxidantes y citoprotectoras, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE ("Antioxidant Response Element"). La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión al citoesqueleto y a una proteína citoplasmática llamada Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch). Ya que Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, su actividad se mantiene estrictamente regulada. La célula debe conservar un determinado estado redox para permanecer en homeostasis, un cambio en dicho estado puede modificar la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción, por lo que Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo, sino únicamente cuando se

generan condiciones de estrés oxidativo tal y como se muestra en la figura 5.¹¹⁷

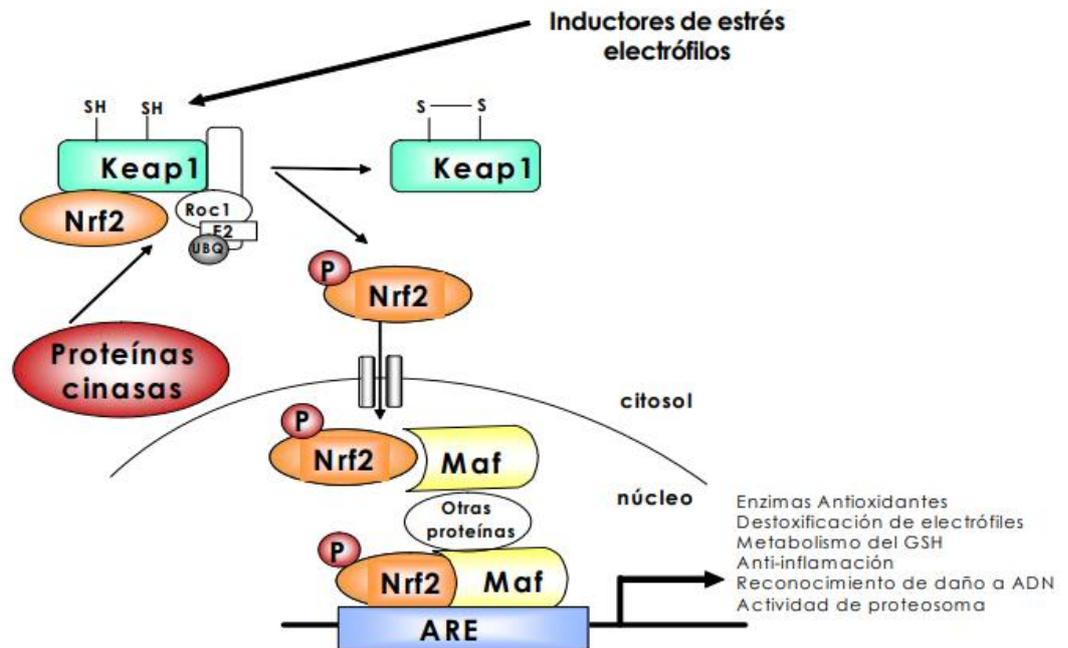


Figura 5. Efectos transcripcionales de Nrf2. Al producirse un EO Nrf2 se disocia de Keap1 y se transloca al núcleo formando heterodímeros con las proteínas Maf (Maf), lo cual facilita su interacción con las regiones ARE del ADN y la consecuente transcripción de genes antioxidantes y enzimas de fase II (Fainstein y col., 2007).¹¹⁷

Por otro lado, la bibliografía indica que las vías ligadas a Nrf2 están involucradas en mecanismos protectores contra el estrés oxidativo mediante la regulación de antioxidantes y genes detoxificantes de fase II. Y que la desregulación de Nrf2 se ve relacionada con el envejecimiento y la patogénesis de muchas enfermedades crónicas humanas, incluidas las neurodegenerativas como la EP, la EA y la ELA. Por lo tanto, el control de Nrf2 y las proteínas reguladoras de esta vía resulta de gran interés, para identificar nuevas terapias más efectivas para el control de las END.^{118,119}

En general, el uso de estos biomarcadores facilita el estudio del EO y su relación con la disfunción mitocondrial y con el daño celular. En los últimos años ha habido numerosos estudios ahondando en el papel de estos mecanismos y su relación con la degeneración celular en las END como Alzheimer y Parkinson con intención de profundizar en cómo estos acontecimientos afectan al ciclo de la vida de célula. Además en la

actualidad el uso de terapias antioxidantes se siguen contemplando como posibles herramientas terapéuticas importantes para prevenir el inicio y progresión de este tipo de enfermedades.^{120–122.}

I.3. Antioxidantes como terapia.

La curcumina y otros compuestos fenólicos y flavonoides han sido los más estudiados como posible terapia frente al EO.^{123,124}

Como parece que las END pueden estar relacionadas con situaciones de EO, en los últimos años se han ensayado distintos compuestos antioxidantes (AOX) en EA y EP ya que podrían funcionar como terapias potenciales para la prevención de estas enfermedades, de hecho en numerosos estudios se han demostrado los efectos beneficiosos de los AOX tanto en modelos animales como en modelos celulares de enfermedad neurodegenerativa.^{35,125}

Entre las posibles moléculas con efectos AOX estudiadas para la EA se encuentran: la vitamina E o el α -tocoferol, el β -caroteno, la vitamina C, el ácido lipoico y la *N*-acetilcisteína, etc., evidenciándose que estos compuestos pueden ejercer cierta protección contra los ROS que son los causantes del daño celular. En la tabla 3 se resumen las posibles funciones de los AOX en el desarrollo y progresión de EA.^{126,127}

Antioxidante	Funciones potenciales
Melatonina	Mejora el ritmo de la actividad de descanso y mejora la calidad del sueño. Previene la friolegénesis y la agregación de A β .
Estrógenos	Mejora la absorción de A β agregado en Microglia. Reduce la producción de A β .
Selenio	Estimula la señalización de la biogénesis mitocondrial y mejorar el rendimiento funcional mitocondrial. Reduce la producción de tau.
Polifenoles	Ácido elágico y punicalagin: Potentes inhibidores de secretacina β . Curcumina: inhibe las citoquinas que inician la producción de amiloide. Epigallocatequina-3-galato: Reduce la producción de A β y la deposición de placa en el cerebro.
Vitaminas	Vitamina E: mejora el rendimiento cognitivo y suprime la neurotoxicidad inducida por tau. β -caroteno: aumenta la actividad de colina acetiltransferasa. Vitamina B12: mejora la neuroquímica. Vi1,25Dihidroxi-vitamina D3: Aumenta el aclaramiento fagocítico de las placas amiloides.
Ácido docosaheptaenoico	Mantiene la integridad y la función neuronal. Limita la producción y la acumulación de A β neurotóxico de su APP v.
CoQ₁₀	Mejora la bioenergética cerebral. Atenúa la sobreproducción de A β y la deposición de A β intracelular en la corteza.

Tabla 3. Funciones potenciales de algunos antioxidantes en la enfermedad de Alzheimer (Modificada de Moneim y col., 2015).¹²⁶

En cuanto a la EP son numerosos los estudios dónde se han utilizado los AOX como terapia preventiva. En este caso, los AOX más estudiados son las vitaminas y los flavonoides, poniéndose de manifiesto que individuos que consumen una dieta rica en vitamina A y B muestran un riesgo reducido de desarrollar EP.¹²⁸ Los flavonoides poseen una elevada capacidad AOX y los más estudiados hasta hoy en día han sido el galato de epigallocatequina (EGCG), las flavonas (baicaleína), flavonoles (quercetina, kaempferol, morina y miricetina), isoflavonas (biochanina A) y otros compuestos fenólicos no flavonoides (resveratrol y curcumina). De los compuestos mencionados anteriormente los que mostraron mayor efecto AOX en los modelos de la EP fueron el resveratrol, la curcumina y

EGCG, por lo que podrían ser candidatos prometedores para el tratamiento de la EP.¹²⁹

En la tabla 4 se muestra para las tres sustancias anteriores los modelos de estudio utilizados (*in vivo* o *in vitro*) y los posibles mecanismos implicados en la disminución del EO. El resveratrol y el EGCG actúan en la función mitocondrial mientras que la curcumina además de actuar a nivel mitocondrial media en el metabolismo de la dopamina y disminuye los niveles de metales como el hierro.

Antioxidante	Modelo de estudio	Posible mecanismo
Galato de epigallocatequina (EGCG)	Células PC12 tratadas con MPP ⁺ . Drosophila mutante con LRRK2 y parquin nulo.	Up-regula PGC-1 α y mejora la función de la mitocondria. Atenua la vía mitocondrial asociada en LRRK2 y la patogénesis relacionada con parquina.
Resveratrol	Fibrilastos primarios de pacientes con EP con mutación en PARK2. Ratas inducidas con 6OH-Dopamina.	Aumenta la expresión de genes diana de PGC-1 α (TFAM, citocromo C y COX I). Regulan las actividades GPx, GR, CAT y SOD.
Curcumina	Células PC12 tratadas con MPP ⁺ . Ratas inducidas con MPTP. Ratas inducidas con 6OH-Dopamina.	Media la toxicidad de PC12 a través de la vía mitocondrial Bcl-2ROS-iNOS. Inhibe la actividad de MOA-B Quelación de hierro en la sustancia nigra.

Tabla 4. Posibles mecanismos implicados en la disminución del EO de EGCG, resveratrol y curcumina en la EP (Modificada de Ding y col., 2018).¹²⁹

I.3.1. Curcumina y curcuminoides.

Entre todos los AOX citados anteriormente el que ha sido ampliamente más utilizado en experimentación a lo largo de los últimos años ha sido la curcumina por sus efectos a nivel de protección mitocondrial en células nerviosas, lo que podemos observar analizando el número de publicaciones científicas sobre el uso de curcumina como AOX ha ido aumentando considerablemente a lo largo de los años tal y como se puede observar en la figura 6.

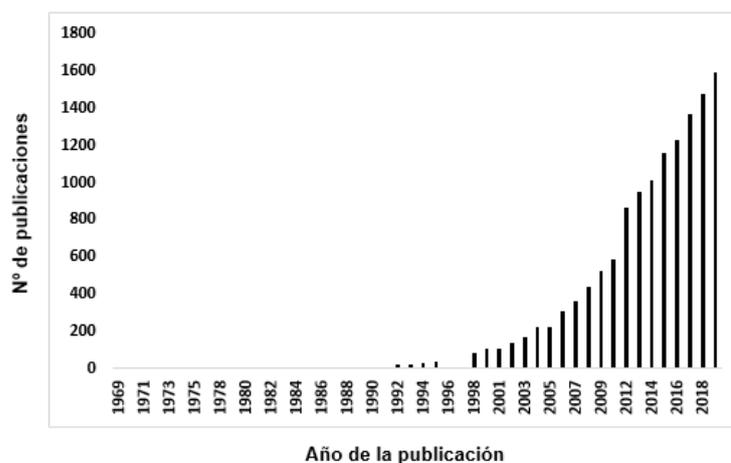


Figura 6. Gráfica en la que se representa el número de publicaciones científicas sobre la curcumina a lo largo de los años.

La curcumina es compuesto fenólico de origen natural procedente de la Cúrcuma (*Curcuma longa*), el cual es el componente mayoritario del curri aunque también se encuentra en cantidades limitadas en el jengibre. Ha sido empleada durante cientos de años por su sabor, color y capacidad como conservante a la vez que se le han atribuido propiedades terapéuticas para una gran variedad de enfermedades como las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer, artritis, etc.^{130,131}

Desde el punto de vista estructural el equilibrio tautomérico ceto-enol determina las propiedades físicas y químicas de la curcumina (figura 7).

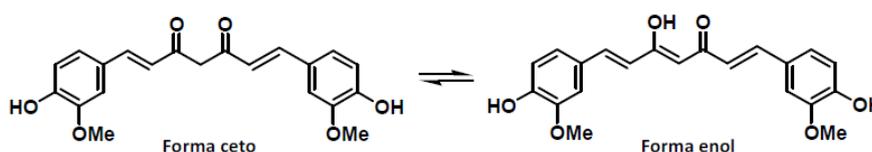


Figura 7. Equilibrio tautomérico ceto-enol de la curcumina.

La curcumina posee una fuerte actividad antioxidante comparable a la de las vitaminas C y E, además numerosos estudios han demostrado sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, su capacidad para captar radicales (O^{2-} , $OH\cdot$ y NO) y su capacidad de inhibir la peroxidación

lipídica de la membrana.¹³² Los mecanismos AOX propuestos hoy en día para la curcumina se muestran en la figura 8.¹³³

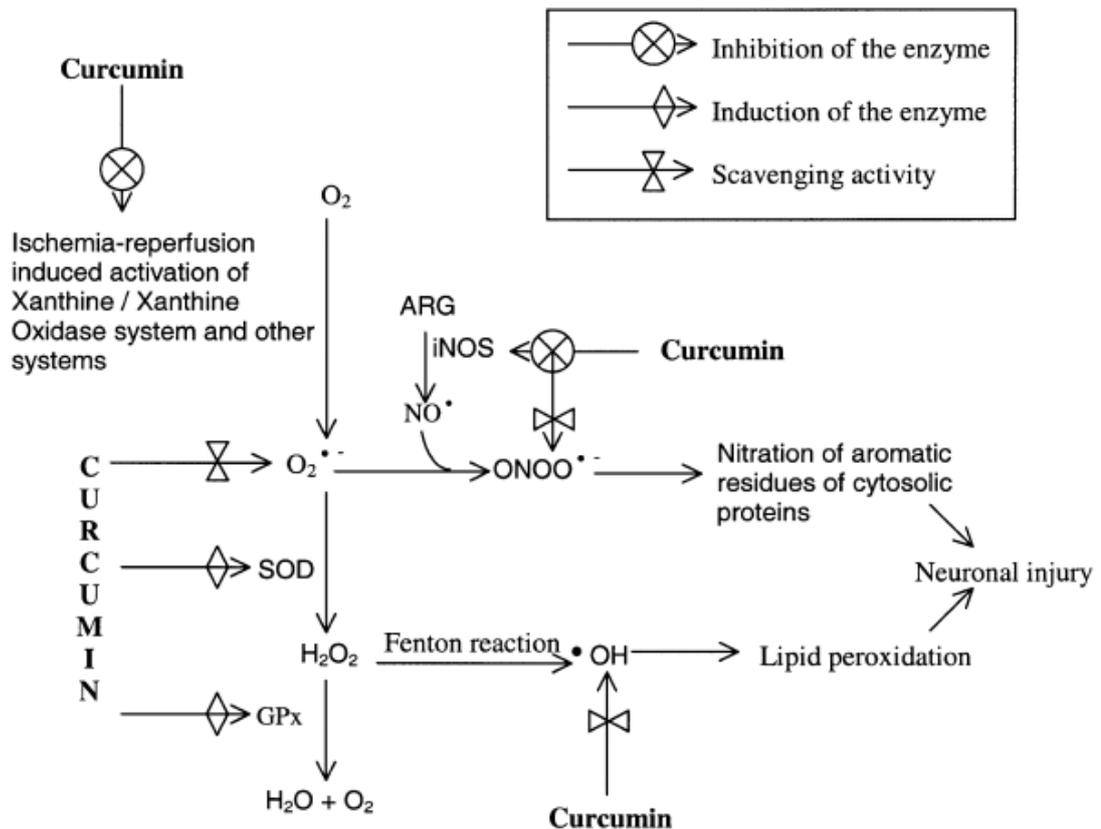


Figura 8. Mecanismos antioxidantes de la curcumina (Thiyagarajan y col., 2004).¹³³

Los estudios referentes al uso de la curcumina en la EA han puesto de manifiesto diversas propiedades biológicas de esta molécula a la hora de modular diferentes procesos bioquímicos, como son la atenuación de la disfunción mitocondrial inducida por EO y la regulación de la respuesta inflamatoria. También se ha visto que podría estar implicada en la atenuación de la formación de las placas neuríticas, ya que evita la formación del oligómero tóxico β-amilode inhibiendo su agregación y acumulación.^{134,135}

Por otro lado, los trabajos sobre el uso de curcumina en Parkinson han evidenciado que previene la agregación de α-sinucleína al reducir la toxicidad por unión a oligómeros preformados y fibrillas, lo cual acaba alterando su exposición hidrofóbica a la superficie. Además, se ha visto

que la curcumina no se une a la α -sinucleína monomérica, sino que se une específicamente a oligómeros intermedios, lo que sugiere que tanto ella como los compuestos polifenólicos sintetizados a partir de su estructura pueden usarse como dianas farmacológicas candidatas para el tratamiento de la EP y otras enfermedades neurológicas.¹³⁶

Todos estos resultados tomados en conjunto demuestran que los curcuminoides pueden ser buenas herramientas terapéuticas para prevenir e incluso tratar enfermedades neurodegenerativas, y podrían ser fármacos de elección ante estas patologías. Sin embargo, debido a la baja solubilidad en agua de la curcumina y la mala absorción tras su administración oral, existen varios problemas farmacocinéticos y farmacodinámicos, como su baja biodisponibilidad y su alta inestabilidad química que dificultan la orientación efectiva hacia su diana, ya que esta se encuentra en las células y mitocondrias del cerebro humano.¹³⁷ Por ello es importante descubrir nuevos derivados de curcumina que sean capaces de eludir estas limitaciones y que mantengan su capacidad protectora frente a las END, siendo la obtención de estos derivados un nuevo reto farmacológico que se perfila como prioritario en la actualidad.

La idea de abordar un tratamiento con nuevos quimiotipos derivados de curcumina que posean un perfil antioxidante similar a ella y sin embargo presenten una mejor biodisponibilidad ha sido parte fundamental de nuestra investigación. En este sentido se han diseñado por el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) varios derivados simétricos con diferentes patrones de sustitución aromática.^{138,139}

Los derivados curcuminoides obtenidos, son compuestos que mantienen el puente dicetónico α , β -insaturado de 7 carbonos con anillos aromáticos sustituidos, enlazados a ambos lados de este puente y que contienen diferentes sustituciones. Estos hemicurcuminoides β -dicetonas, se han agrupado en dos series. La serie "a" se trata de los derivados que

contienen en su extremo un grupo fenilo (Ph) y la serie “b” son los derivados que en su estructura química contienen un grupo trifluorometilo (CF₃).

Los derivados que han sido utilizados estos se muestran en la figura 9.

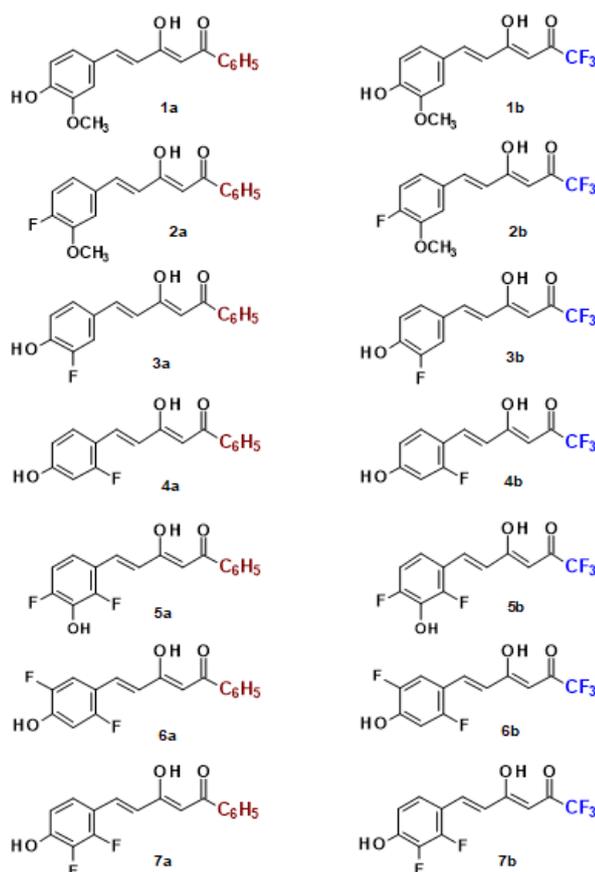


Figura 9. Los curcuminoides estudiados en este trabajo, representados como la forma tautomérica principal.^{138,139}

Todos estos compuestos han sido ensayados para determinar su capacidad antioxidante y protectora en ensayos *in vitro* utilizando líneas celulares neuronales, con la finalidad de ahondar en las posibles relaciones entre la pérdida del balance oxido-reducción, la disfunción mitocondrial y la relación de estos dos fenómenos con el correcto funcionamiento neuronal.

Teniendo en cuenta las evidencias que apoyan que la pérdida del control de la oxidación celular es uno de los procesos que favorecen el envejecimiento celular y por lo tanto la pérdida de su función, hemos

querido abordar como terapéutica el utilizar unas condiciones antioxidantes como medidas para ralentizar el envejecimiento celular, proponiendo la siguiente hipótesis de trabajo y los consiguientes objetivos.

II.HIPOTESIS Y OBJETIVOS

II.HIPOTESIS Y OBJETIVOS:

El SN es muy sensible al daño oxidativo debido a su baja capacidad AOX y su alta demanda de oxígeno y glucosa. Teniendo en cuenta que el EO está implicado en el inicio y progresión de las END y que estas son un reto sanitario y social importante por su aumento de incidencia, las estrategias farmacológicas orientadas a prevenir este EO deberían considerarse prioritarias para controlar su aparición y progresión. Dentro de las moléculas capaces de prevenir este EO se encuentra la curcumina, la cual posee un buen perfil AOX. Sin embargo dicha molécula presenta una mala biodisponibilidad a nivel sistémico y del SNC, como consecuencia de sus malas propiedades fisicoquímicas como son su baja solubilidad y baja estabilidad química,¹⁴⁰ junto con un mal perfil de propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad) lo que conlleva en su conjunto a que presente malas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas,¹⁴¹ lo que le imposibilita alcanzar los órganos diana con niveles de exposición adecuados y poder así ejercer su acción AOX. Por todo ello, en el presente trabajo se establece como hipótesis de partida la posibilidad de identificar dentro del quimiotipo de las 1,3- β -dicetonas asimétricas, nuevos compuestos con modificaciones estructurales en la molécula de curcumina, que permitan mejorar sus propiedades fisicoquímicas manteniendo su actividad AOX, y que eviten posteriormente las limitaciones de estabilidad y biodisponibilidad propias de la curcumina, dotando a su vez a los nuevos compuestos de un buen perfil neuroprotector en condiciones de estrés oxidativo, junto con una baja citotoxicidad en diferentes líneas celulares.

Para abordar nuestra hipótesis establecemos como objetivo principal identificar dentro de los compuestos diseñados por el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos de la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) aquellos quimiotipos que posean mejor perfil AOX y mejores capacidades neuroprotectoras, al objeto de seleccionar el compuesto más idóneo, cuya progresión lo hará elegible como candidato

para los estudios posteriores *in vivo* en modelos pre-clínicos de Alzheimer y Parkinson.

Por ello se establece como objetivos específicos los siguientes:

1. Determinar la capacidad antioxidante de los quimioidos (hemicurcuminoides β -dicetonas) en comparación con la curcumina, al objeto de seleccionar los que tengan mejor perfil AOX.
2. Determinación de la citotoxicidad de los todos compuestos, realizando estudios de citotoxicidad para establecer la dosis letal 50 (DL50) en las líneas neuronales SH-SY5Y y HT-22 y en la línea hepática HepG2.
3. Estudio de la solubilidad y estabilidad química en medios bio-relevantes de aquellos compuestos con mejor perfil AOX y de citotoxicidad, al objeto de establecer el mejor perfil drug-like.
4. Determinación de la capacidad quelante de hierro (Fe^{2+}) en medios bio-relevantes de aquellos compuestos con mejor perfil AOX y menor citotoxicidad.
5. Determinación de la viabilidad celular en diferentes condiciones de EO en las líneas neuronales SH-SY5Y y H-T22, al objeto de establecer la DL50 de los diferentes inductores de EO, que se utilizarán posteriormente en los estudios de neuroprotección.
6. Estudiar la actividad neuroprotectora en diferentes condiciones de EO de aquellos compuestos que muestren el mejor perfil antioxidante y de citotoxicidad, en las líneas neuronales SH-SY5Y y H-T22.
7. Determinación de los niveles intracelulares de las ROS en células SH-SY5Y en condiciones de EO crónicas y agudas, y previo tratamiento con los mejores compuestos.
8. Estudiar el potencial de membrana mitocondrial en células SH-SY5Y en condiciones de EO crónicas y agudas, y previo tratamiento con los mejores compuestos.

9. Cuantificación de biomarcadores celulares de daño oxidativo en la línea neuronal SH-SY5Y en condiciones EO crónicas y agudas, previamente tratadas con aquellos compuestos que hayan demostrado el mejor perfil antioxidante, neuroprotector y con menor citotoxicidad.
10. Determinación por western blot de los niveles de expresión de las enzimas endógenas de defensa antioxidante en las células SH-SY5Y en condiciones de estimulación crónicas de EO, al objeto de elucidar el potencial mecanismo de acción de los compuestos más prometedores.

III.MATERIALES Y MÉTODOS

III.MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la capacidad antioxidante de los quimiotipos hemicurcuminoïdes diseñados y sintetizados por el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos de la UNED^{138,139} hemos llevado a cabo ensayos dirigidos a estudiar sus características antioxidantes.

En todos los estudios realizados en el presente trabajo de tesis se han empleado disoluciones madre en dimetilsulfóxido (DMSO) (23488.294 VWR Prolabo) de los compuestos patrones y de las 1,3- β -dicetonas a una concentración 20 mM en viales de vidrio topacio de 4ml. Posteriormente los compuestos se alicuotaron en microviales Eppendorf de 100 μ l y se mantuvieron a -20°C. En estas condiciones se comprobó además que los compuestos permanecían perfectamente solubles y estables.

III.1. Determinación de la capacidad AOX: ABTS, FRAP y DPPH.

Los métodos de determinación de la actividad AOX se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres, de tal modo que cuanto mayor sea la capacidad de inhibir la generación de radicales por parte del compuesto ensayado mayor capacidad AOX tendrá dicho compuesto.

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un único método que refleje de forma unívoca el perfil AOX de un compuesto, por lo que es necesario utilizar diferentes métodos que permitan elucidar el mecanismo AOX.

Estos métodos pueden clasificarse en dos tipos principales:

- Aquellos que determinan la transferencia de electrones, donde la interacción del compuesto AOX y el sustrato dan como resultado la neutralización de radicales libres. Entre estos ensayos se encuentran el ABTS y el FRAP.¹⁴²
- Aquellos donde se determina la capacidad de donación de un átomo de Hidrógeno al radical por parte del compuesto AOX. Estos ensayos se basan en una reacción competitiva entre el AOX y el

sustrato, los cuales compiten por los radicales. Entre los métodos existentes el método DPPH es uno de los más utilizados.¹⁴³

La capacidad reductora del compuesto AOX frente al radical se mide en una reacción reductora que implica por lo general un cambio colorimétrico, el cual puede cuantificarse espectrofotométricamente.^{90,144}

III.1.1. Método ABTS.

El ensayo ABTS se basa en la reducción del radical ABTS^{•+} por parte del compuesto AOX que se esté estudiando. El radical monocatiónico ABTS^{•+} (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) se genera por reacción del ABTS y el persulfato potásico, dando lugar al radical ABTS^{•+} de color verde-azulado oscuro y con una absorción ultravioleta (UV) máxima a 415 nm, con otros picos de absorbancia a 645 nm, 734 nm y 815 nm. La capacidad de decoloración del compuesto se toma como una medida de la reducción o inhibición del radical ABTS^{•+}, de tal forma que a mayor poder AOX mayor decoloración se produce.^{145,146}

En este ensayo para la generación del radical ABTS^{•+} se empleó ABTS 7 mM (10102946001, Sigma-Aldrich) y persulfato potásico 2,4 mM (216224, Sigma-Aldrich) en proporción 1:1, incubándose durante 16 horas en oscuridad. La concentración de radical óptima para el ensayo de la capacidad AOX se determinó mediante una recta de calibrado al objeto de establecer la concentración necesaria de radical en el ensayo como aquella en la que se obtuviera una absorbancia de 0,7 UAM. Para el ensayo de los distintos compuestos (serie **a** y serie **b**) se realizaron diluciones seriadas en agua miliQ partiendo de una disolución madre de cada compuesto de concentración 1 mM en DMSO, con el fin de obtener concentraciones finales de 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μ M para su ensayo se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos con fondo plano (391-3615, VWR). La capacidad AOX de cada compuesto se determinó por cuadruplicado a cada una de las distintas concentraciones ensayadas. Cada placa contó con un control negativo de la reacción (concentración 0 μ M = ABTS^{•+} + agua), y en cada experimento se ensayaron trolox y curcumina como antioxidantes de referencia. Para la realización del

ensayo, el radical ABTS⁺ y el compuesto AOX se añadieron en una proporción 3:1 en un volumen final de 200 µL/pocillo. Tras incubar la placa 30 min en oscuridad se midió la absorbancia a $\lambda=734$ nm en el espectrofotómetro (Lector de microplacas multimodo Varioskan™ LUX, VL0000D0, Thermo Fisher). La capacidad de captación del radical ABTS⁺, se calculó empleando la siguiente fórmula:

Porcentaje de actividad de captación de radicales ABTS⁺ = $\{1 - [As / Ac]\}$ x 100 donde As es la absorbancia de las muestras y Ac la absorbancia de la solución de control sin antioxidante.

III.1.2. Método FRAP.

En este método la capacidad antioxidante se basa en el poder que tiene un compuesto para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺. En dicho ensayo el complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe³⁺-TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso (Fe²⁺-TPTZ) el cual es coloreado, por lo que a mayor aumento de la coloración mayor capacidad reductora de Fe³⁺ tiene el compuesto ensayado y por lo tanto mejor capacidad AOX.¹⁴⁷

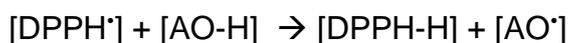
El ensayo se llevó a cabo siguiendo el método de Benzie y *col.*¹⁴⁸, para su realización se utilizaron ácido clorhídrico (HCl) 40 mM (87003-253, VWR), tricloruro de hierro Hexahidratado (FeCl₃·6·H₂O) 20 mM (24208237, VWR), tampón acetato (NaAc) 0,3 mM (S5636, Sigma-Aldrich) pH 3,6 y TPTZ 10 mM (T1253, Sigma-Aldrich) disuelto en HCl 40 mM. Para la preparación del reactivo FRAP se utilizó TPTZ 10 mM, FeCl₃·6 H₂O 20 mM y tampón Acetato 0,3 mM a pH 3,6 añadiéndolos en una proporción 1:1:10. La concentración de radical óptima se determinó mediante una recta de calibrado al objeto de establecer la concentración necesaria de radical en el ensayo como aquella en la que se obtuviera una absorbancia de 0,6 UAM. La capacidad AOX de cada compuesto se determinó a distintas concentraciones (0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µM) y por cuadruplicado en placas transparentes de 96 pocillos con fondo plano (391-3615, VWR). Cada placa contó con un control negativo de la reacción (concentración 0 µM = FRAP + agua) y en cada experimento se ensayaron trolox y curcumina como antioxidantes de referencia. En cada

placa la disolución del radical FRAP y el AOX se añadieron en una proporción 9:1 en un volumen final de 200 μL /pocillo. A continuación se agitó la placa durante 30 min a 30°C y posteriormente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda = 593 \text{ nm}$.

Porcentaje de capacidad de reducción del $\text{Fe}^{3+} = \{1 - [\text{As} / \text{Ac}]\} \times 100$ donde As es la absorbancia de las muestras y Ac la absorbancia de la solución de control sin antioxidante.

III.1.3. Método DPPH.

El ensayo DPPH se emplea para evaluar la capacidad AOX de los compuestos para reducir el radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidacil (DPPH \cdot). Este radical es susceptible de reaccionar con compuestos AOX a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno que proporciona el agente AOX, esta reacción se puede representar de la siguiente manera:



Dicho radical, absorbe a la longitud de onda de 517 nm. Como resultado de la reacción a mayor decoloración del radical mayor será la capacidad del compuesto ensayado de donar un H al DPPH \cdot y por lo tanto tendrá mayor capacidad AOX.^{142,149}

Para la realización del ensayo se generó el radical DPPH \cdot 0,2 mM (D9132, Sigma-Aldrich) por disolución en etanol absoluto (141086.1315, Panreac). La concentración de radical óptima se determinó mediante una recta de calibrado al objeto de establecer la concentración necesaria de radical en el ensayo como aquella en la que se obtuviera una absorbancia de 0,5 UAM.

La capacidad AOX de cada compuesto se determinó a distintas concentraciones (0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM) en placas transparentes de 96 pocillos con fondo plano (391-3615,VWR). Los experimentos se realizaron cuatro veces por cuadruplicado. Cada placa contó con un control negativo de la reacción (concentración 0 μM =

DPPH^{*} y agua), y en cada experimento se ensayaron trolox y curcumina como antioxidantes de referencia. La disolución del radical DPPH^{*} y el AOX se añadieron en una proporción 3:1 en un volumen final de 200 μ L/pocillo. Se dejó incubar la placa 30 min en oscuridad y a continuación se realizó una primera medida en el espectrofotómetro a $\lambda = 517$ nm, tras lo cual se dejó incubar la placa otros 30 min más en oscuridad y realizándose una segunda lectura al objeto de comprobar que no existiese una evolución posterior de la reacción.

El porcentaje de capacidad captadora de radicales DPPH^{*} se calcula con la siguiente fórmula:

% de reducción del DPPH^{*} = $\{1 - [As / Ac]\} \times 100$, donde As es la absorbancia de las muestras y Ac el absorbancia de la solución control sin antioxidante pero con DPPH.

III.2. Determinación de las propiedades drug-like.

Para estudiar el potencial farmacológico de todos los compuestos sintetizados, se calcularon los parámetros fisicoquímicos de la curcumina y de las 1,3- β -dicetonas sintetizadas mediante el programa MedChem Designer(TM) MedChem-Designer-Simulations-Plus-Inc.; Lancaster, CA, USA: 2014. Version 3.1.0.30.

III.3. Determinación de la citotoxicidad de los compuestos en las diferentes líneas celulares.

III.3.1. Líneas celulares.

Para la realización de los estudios de citotoxicidad se utilizaron las líneas celulares neuronales SH-SY5Y y HT-22 y la línea de hepatocitos HepG2. En todos los estudios realizados en el presente trabajo de tesis se han empleado disoluciones madre en DMSO de los compuestos patrones y de las 1,3- β -dicetonas a una concentración 20 mM, se comprobó que la cantidad de DMSO en las disoluciones de los compuestos no interfería en la viabilidad celular.

3.1.1. Línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

El uso de neuronas primarias de mamíferos derivadas del tejido del sistema nervioso central embrionario está limitado por el hecho de que una vez diferenciadas en neuronas maduras, las células ya no pueden propagarse. Sin embargo para superar esta limitación se pueden usar “in vitro” líneas celulares transformadas. En este contexto, se describe la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, la cual proviene de una biopsia de tumor de medula ósea metastásico, fue depositada en la ATCC® (American Type Culture Collection) por June L. Biedler en 1970. Es ampliamente utilizada como modelo neuronal desde el comienzo de los años 80 gracias a que posee las propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas, por lo que suele utilizarse para modelos “in vitro” de diferenciación y funcionalidad neuronal. Además su facilidad de mantenimiento debido a su suministro ilimitado de células, ha hecho que esta línea sea ampliamente utilizada en estudios experimentales de procesos relacionados con la diferenciación neuronal, el metabolismo, procesos neurodegenerativos y neuroadaptativos, así como en neurotoxicidad y neuroprotección. Asimismo es ampliamente utilizada como modelo “in vitro” para END como la EA y la EP.^{150,151} Fueron obtenidas de la ATCC® (ATCC® - CRL-2226).

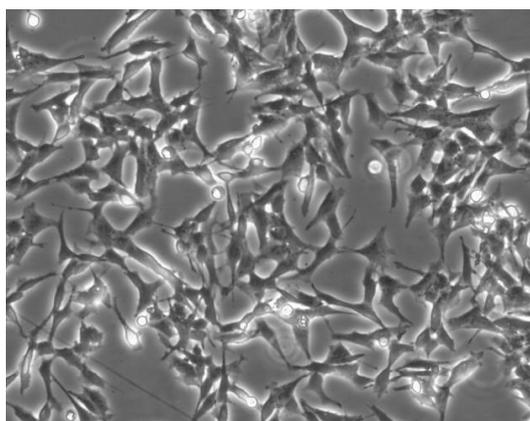


Figura 10. Línea celular SH-SY5Y. Imagen realizada al microscopio de contraste de fases (LEICA DM300) a 20x.

3.1.2. Línea de hipocampo de ratón HT-22.

Se trata de una línea celular de hipocampo de ratón inmortalizada subclonada a partir de las células HT-4 por Marimoto y Koshland.¹⁵² Se ha visto que esta línea neuronal es altamente sensible al glutamato, por lo tanto son usadas frecuentemente como sistema modelo para estudiar la toxicidad inducida por glutamato en neuronas,¹⁵³ aunque también se utilizan para determinar la citotoxicidad de otros compuestos. Adicionalmente se ha observado que poseen propiedades colinérgicas funcionales, por lo que es usada para determinar el mecanismo fisiopatológico de la EA ya que se sabe que la hipofunción colinérgica del hipocampo está involucrada en esta enfermedad. Por lo que se trata de un modelo celular ampliamente utilizado para la determinación de la etiología de la EA, el cual nos sirve para determinar si existen compuestos capaces de proteger al organismo frente a esta enfermedad.¹⁵⁴ Fueron obtenidas del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo (Dra. Eva Martínez Pinilla).

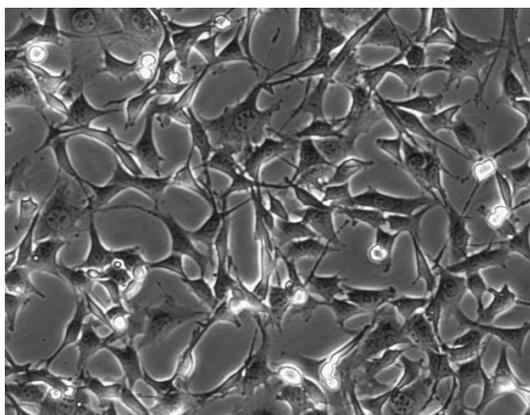


Figura 11. Línea celular HT-22. Imagen realizada al microscopio de contraste de fases (LEICA DM300) a 20x.

3.1.3. Línea tumoral de hepatocitos HepG2.

Al objeto de estudiar la citotoxicidad de los compuestos de la serie de las 1,3- β -dicetonas en otras líneas celulares humanas se realizaron estudios de citotoxicidad frente a la línea celular HepG2. Se trata de línea celular

hepática inmortalizada de células de hepatoblastoma humano, caracterizadas y derivadas por primera vez por Aden y col.¹⁵⁵ Fue depositada en la ATCC® por el Instituto Wistar.¹⁵⁶ Son ampliamente utilizadas en estudios “*in vitro*” para el estudio de metabolismo de fármacos y para estudios de hepatotoxicidad. Fueron obtenidas de la ATCC® (ATCC® -HB8065).

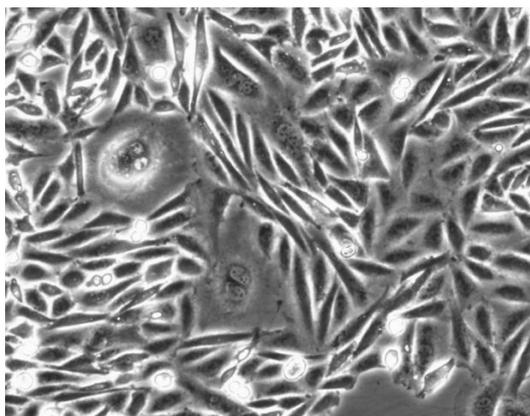


Figura 12. Línea celular HepG2. Imagen realizada al microscopio de contraste de fases (LEICA DM300) a 20x.

III.3.2. Estudios de citotoxicidad: determinación de la dosis letal 50 (DL50).

Al objeto de determinar la citotoxicidad de las 1,3- β -dicetonas, se realizaron estudios de citotoxicidad en las líneas celulares SH-SY5Y, HT-22 y HepG2, para definir la dosis de compuesto necesaria que permita obtener una viabilidad celular del 50% (DL50).

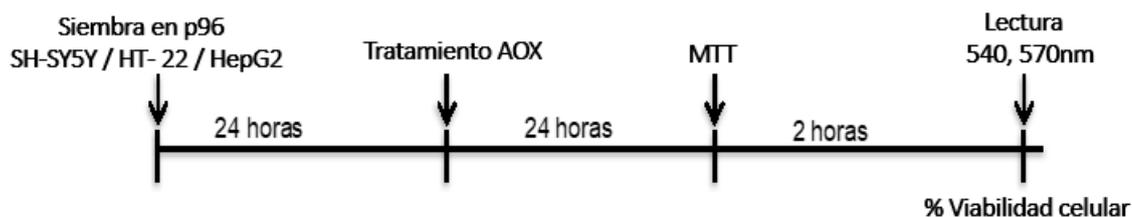
Para ello, se utilizaron placas de cultivo transparentes de 96 pocillos de fondo plano Costar™ (10792552, Fisher Scientific), en la que se sembraron 5.000 células por pocillo. Las células SH-SY5Y se cultivaron en medio DMEM/F12 con glutamina y 15 mM de HEPES (L0092-500, Biowest), suplementado con 10% de suero fetal bovino (S181-H100, Biowest), 1% de penicilina/estreptomina 10.000 U/ml (15140122, Thermo Fisher), bicarbonato 2,44 g/L (S5761, Sigma-Aldrich) y 0,1% de fungizona (15290026, Gibco). Las células HT-22 se cultivaron en medio DMEM con 4,5 g/L de glucosa (BE12-614F, Lonza), suplementado con

10% de suero fetal bovino (S181-H100, Biowest), 1% de penicilina/estreptomicina 10.000 U/ml (15140122, Thermo Fisher), L-glutamina 2 mM (10214683, Fisher Scientific), HEPES 1 M (I0180-100, Biowest) y 0,1% de fungizona (15290026, Gibco). Las células HepG2 se cultivaron en medio RPMI 1640 con L-glutamina (L0500-500, Biowest), suplementado con 10% de suero fetal bovino (S181-H100, Biowest), 1% de penicilina/estreptomicina 10.000 U/ml (15140122, Thermo Fisher), bicarbonato 2,44 g/L (S5761, Sigma) y 0,1% de fungizona (15290026, Gibco).

Una vez sembradas las placas con cada uno de los tipos celulares el procedimiento a seguir fue el mismo tal y como se muestra en el esquema 1, incubándose 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa 90%, tras lo cual las células se trataron otras 24 h con los compuestos a las concentraciones de 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 µM. Tras lo cual se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT según el protocolo de Mosmann.¹⁵⁷

Este ensayo se basa en la capacidad de las células para reducir el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a formazán (*E,Z*)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano, el cual en medios acuosos se encuentra en forma de cristales insolubles de color violeta, por lo que puede ser medido a una longitud de onda de 540 nm o 570 nm.¹⁵⁷ Las deshidrogenasas mitocondriales son las que llevan a cabo esta reducción, con lo cual es una medida directa de la viabilidad celular.¹⁵⁸ Por lo que es un método ampliamente empleado para evaluar la viabilidad celular en ensayos de proliferación y citotoxicidad celular.¹⁵⁹

Para ello se añadieron 20 µL de MTT 5 mg/ml (M5655, Sigma) a cada pocillo, tras lo cual se dejó incubar 2 h, al objeto de alcanzar la reducción de MTT a formazán por parte de las células viables. A continuación se añadió a cada pocillo 200 µL de DMSO (23488.294 VWR Prolabo), y las placas fueron leídas en el espectrofotómetro a 540 nm.



Esquema 1. Ensayo para determinación de la citotoxicidad de los compuestos. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT.

III.4. Estudios de neuroprotección frente a H₂O₂.

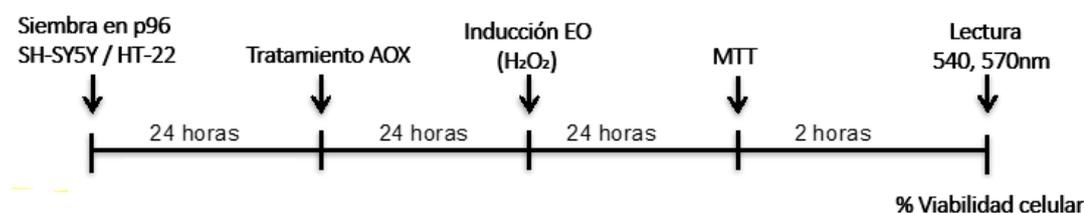
III.4.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50).

Para determinar la supervivencia celular frente al EO inducido por peróxido en las líneas neuronales SH-SY5Y y HT-22 al objeto de establecer la DL50 hemos realizado estudios de viabilidad celular del peróxido de hidrógeno, para ello se realizó una disolución madre de 1 M, a partir del reactivo comercial al 33% (SZBB3540V, Sigma-Aldrich). A partir de esta se realizaron las diluciones seriadas de 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 μ M en el medio celular correspondiente a cada línea celular. Una vez sembradas las placas con cada uno de los tipos celulares el procedimiento a seguir fue el mismo que el anterior.

III.4.2. Neuroprotección en condiciones de EO inducido por H₂O₂.

Para determinar la actividad neuroprotectora en condiciones de EO inducidas por peróxido de hidrógeno de aquellos derivados que mostraron el mejor perfil antioxidante y menor citotoxicidad se procedió tal y como se muestra en el esquema 3. Se sembraron 3.000 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano Costar™ (10792552, Fisher Scientific) y se incubaron durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Transcurridas las primeras 24 h se procedió a tratar las células con los compuestos a las concentraciones de 0, 5, 10, 20 y 40 μ M, incubándose de nuevo la placa otras 24 h en las mismas condiciones. Tras el tratamiento con el compuesto AOX se procedió a la inducción de EO con H₂O₂ a la concentración de su DL50 (200 μ M) durante otras 24 h.

Finalmente tras la incubación se determinó la viabilidad celular para cada concentración de compuesto ensayada, utilizando el ensayo de MTT, según el protocolo de Mosmann.¹⁵⁷



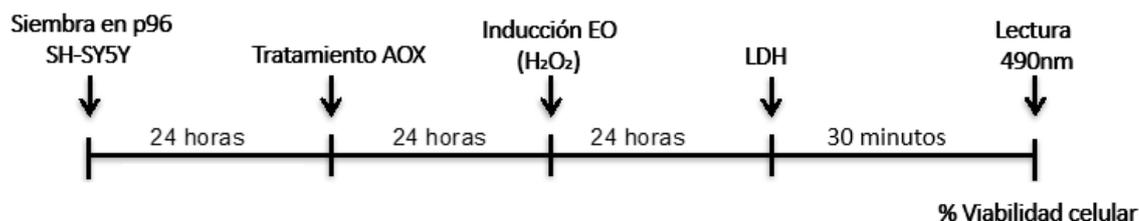
Esquema 2. Ensayo de neuroprotección en condiciones de EO inducida por H₂O₂. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT.

Una vez seleccionados los compuestos más prometedores se volvió a realizar el ensayo de neuroprotección frente a H₂O₂ 200 µM con los compuestos **6b** y **7b** a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 50 µM. Siguiendo el mismo protocolo anterior.

Al objeto de confirmar la actividad neuroprotectora de los compuestos más interesantes en la línea celular SH-SY5Y se procedió además a la realización del ensayo de determinación de viabilidad celular mediante el método de la Lactato Deshidrogenasa (LDH). La LDH es una enzima citosólica perteneciente a la familia de las óxidoreductasas presente en múltiples tipos celulares, que es liberada al medio extracelular cuando la membrana plasmática se encuentra dañada.¹⁶⁰ Este método se basa en una reacción enzimática en la cual la LDH cataliza el paso de lactato a piruvato, con la reducción de una molécula de NAD⁺ a NADH. Éste NADH actúa como cofactor en la conversión de la sal de tetrazolio (cloruro de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolio) a formazán que presenta un color rojo intenso. La concentración de formazán es directamente proporcional a la concentración de LDH.¹⁶¹

En este método, una vez finalizado el tratamiento de las células se tomaron 50 µl del sobrenadante de cada pocillo y se dispensaron en una placa transparente de 96 pocillos con fondo plano (391-3615, VWR).

Posteriormente se añadieron 50 μl del reactivo (LDH Cytotoxicity Assay Kit, Pierce™, USA) a cada pocillo, dejándose durante 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadieron 50 μl del reactivo de parada de la reacción y se procedió a la lectura espectrofotométrica a 490 nm.



Esquema 3. Ensayo de neuroprotección en condiciones de EO inducida por H₂O₂. Determinación de la viabilidad celular mediante LDH.

III.5. Ensayos para la determinación de la solubilidad y estabilidad.

Para determinar la solubilidad y la estabilidad química en medios bio-relevantes de aquellos 1,3- β -dicetonas con el mejor perfil AOX y de citotoxicidad, se realizaron estudios de solubilidad y estabilidad al objeto de identificar los compuestos con el mejor perfil drug-like.

Para la determinación de la solubilidad se utilizó el protocolo descrito por Hoelke y col.⁸ con ligeras modificaciones. El ensayo se realizó en una placa de 48 pocillos transparente de fondo plano (1820765, Thermo Fisher), se usaron los compuestos **6b** y **7b** a concentraciones en el rango de 10 μM a 1 mM. Cada dilución del compuesto se llevó a cabo pipeteando volúmenes definidos de la solución stock en los pocillos, y posteriormente se adiciono PBS 10 mM PH=7,4 hasta alcanzar un volumen final de 500 μL por pocillo. La cantidad final de DMSO por pocillo fue del 2%. Posteriormente, 200 μl de cada dilución fueron transferidos a una placa de 96 pocillos con fondo plano (10547781, Thermo Scientific) para para la determinación de los espectros UV. Se midió también la absorbancia de un control sin compuesto, la cual se usó posterior para corregir las absorbancias de las disoluciones con compuesto. En paralelo en en otra p96 se dispensaron 10 μl de soluciones stock 20 mM y 190 μl de PBS 10 mM, se agitaron en un agitador de microplacas durante dos

horas, y luego se filtraron 160 μ l de cada solución y se transfirieron a una nueva placa para la medida de absorción UV.

Para la determinación de la estabilidad de los compuestos en un medio bio-relevante como el PBS, se prepararon diluciones de concentración 400 μ M de los derivados **6b** y **7b**, en PBS 10 mM, y de concentración 50 μ M para curcumina debido a su baja solubilidad. A continuación se determinó el espectro UV para cada disolución en el rango de 270-600 nm, volviéndose a medir dicho espectro a las 24, 48 y 72 horas. El ancho de banda espectral se estableció en 5 nm y el intervalo de medición de datos fue de 10 nm.

III.6. Determinación de la capacidad de quelación de hierro.

Para estudiar la capacidad de quelación de hierro de las 1,3- β -dicetonas que presenten mejor perfil AOX y de citotoxicidad, se determinó la capacidad de quelación de hierro Fe^{2+} de acuerdo al método de Dinis y col,¹⁶² utilizando cloruro ferroso en lugar de sulfato ferroso. Para ello se utilizaron placas transparentes de 96 pocillos con fondo plano (10547781, Thermo Scientific). Las concentraciones utilizadas de los compuestos en este ensayo fueron 0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 200 μ M, dispensándose 180 μ l de cada una por pocillo, a los que se les añadió 10 μ l de FeCl_2 1 mM (372870, Sigma-Aldrich). Posteriormente se agito la placa durante 1 minuto y se agregaron 10 μ l de ferrozina 2 mM (160601, Sigma-Aldrich) por pocillo, se agitó de nuevo y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se midió la absorbancia a 562 nm. A menor absorbancia mayor actividad quelante del compuesto. Como control positivo de la reacción se usó EDTA (1233508, Sigma-Aldrich). Los experimentos se realizaron en H_2O MiliQ y en una disolución de agua:metanol en proporción 1:1 al objeto de evaluar el efecto de la solubilidad en la capacidad de quelación de Fe^{2+} sobre todo en el caso de curcumina, debido a su baja solubilidad en medios acuosos.

La actividad de quelación de hierro del compuesto se calculó como el porcentaje de inhibición del complejo Fe^{2+} -ferrozina mediante la siguiente fórmula:

% De inhibición = $\{(A_o - A_s) / A_o\} \times 100$

Donde A_o es la absorbancia del control, y A_s es la absorbancia de las muestras. Usándose EDTA como control positivo.

III.7. Estudios de neuroprotección frente a los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Para estudiar la actividad neuroprotectora de las 1,3- β -dicetonas que mostraron mejor perfil AOX y menor citotoxicidad, se utilizaron las líneas neuronales SH-SY5Y y HT-22 y se realizaron ensayos de protección al objeto de determinar la supervivencia celular para cada compuesto en diferentes condiciones de EO.

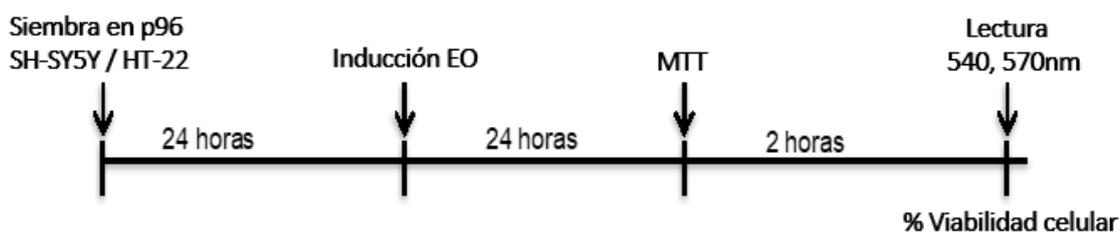
III.7.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50).

Para determinar la supervivencia celular frente a diferentes condiciones de EO en las líneas neuronales SH-SY5Y y HT-22 al objeto de establecer la DL50 de los inductores de EO, las cuales se utilizarán posteriormente en los estudios de neuroprotección, hemos realizado estudios de viabilidad celular de los siguientes inductores:

- Rotenona: se preparó una disolución madre 20 mM de rotenona (R-8875, Sigma-Aldrich) en DMSO. A partir de esta se realizaron las diluciones seriadas a 0, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200 μ M en el medio celular correspondiente.
- Oligomicina: Se usó una disolución stock de 10 mM de oligomicina (75351, Sigma-Aldrich) en DMSO. La oligomicina se utilizó en combinación con rotenona en los experimentos de neuroprotección, manteniendo una relación rotenona/oligomicina 5:1 en el caso de los estudios con la línea celular SH-SY5Y y de 10:1 para los ensayos llevados a cabo con las células HT-22.
- MPP⁺: (se utilizó una disolución madre de MPP 100 mM (D048, Sigma-Aldrich) en DMSO, a partir del cual se preparó disoluciones seriadas de 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000 μ M en el medio celular correspondiente.

- 6-hidroxidopamina: se preparó una disolución madre 100 mM de 6-hidroxidopamina (SC-203482, Santa Cruz) disuelta en DMSO, para posteriormente realizar las diluciones seriadas a 0, 10, 20, 40, 60, 200, 250, 500 μM en el medio celular correspondiente.

Tal y como indica el esquema 2, se sembraron 5.000 células por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano Costar™ (10792552, Fisher Scientific), y se incubaron durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas se trataron con cada uno de los inductores de EO a las concentraciones indicadas anteriormente y se volvieron a incubar en las mismas condiciones otras 24 horas. Finalizado el período de tratamiento con el agente inductor de EO, se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT, según el protocolo de Mosmann.¹⁵⁷



Esquema 4. Ensayo para la determinación de la DL50 de los inductores de EO. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT.

III.7.2. Neuroprotección en condiciones de EO inducido por inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Para determinar la capacidad neuroprotectora de las mejores 1,3- β -dicetonas en diferentes condiciones de EO inducidas por inhibidores de la cadena de transporte electrónico se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano Costar™ (10792552, Fisher Scientific) en las que se sembraron 3.000 células por pocillo, tal y como se muestra en el esquema 5 se incubó la placa durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, transcurridas las cuales se trataron células con los compuestos **6b** y **7b** a las concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 50 μM , y se volvieron a incubar otras 24 h en las mismas condiciones. Posteriormente, se trataron las células con el compuesto inhibidor de la

cadena de transporte electrónico a ensayar, rotenona, oligomicina, MPP+ o 6-hidroxidopamina, a la concentración de su DL50. Tras 24 h de incubación se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT, según el protocolo de Mosmann.¹⁵⁷

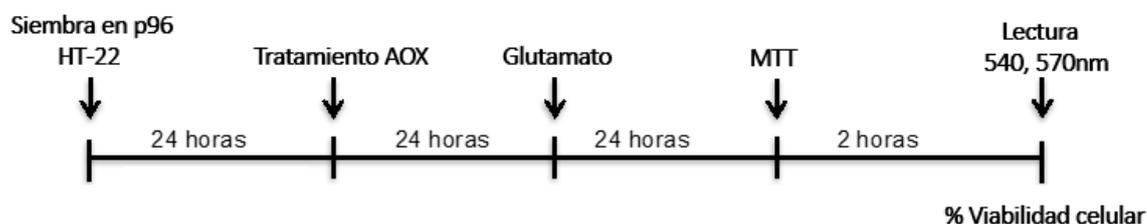


Esquema 5. Ensayo de neuroprotección en condiciones de EO inducido por inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT.

III.7.3. Neuroprotección frente a neurotoxicidad inducida por glutamato.

Para determinar la capacidad de neuroprotección frente a la neurotoxicidad inducida por glutamato en la línea celular HT-22 de aquellos quimiotipos que muestren el mejor perfil antioxidante y menor citotoxicidad. Se determinó previamente la DL50 de glutamato de la misma forma que para los agentes inductores de EO. Se realizó una disolución madre de 1 M de ácido L-glutámico monosódico (101322410 Sigma-Aldrich) en agua miliQ autoclavada, y a partir de esta se realizaron las diluciones seriadas 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 y 30 mM en el medio celular correspondiente. Tras determinar su DL50 se pasó a determinar la neuroprotección. Para ello se utilizaron placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano Costar™ (10792552, Fisher Scientific) en las que se sembraron 3.000 células por pocillo, tal y como se muestra en el esquema 6 se incubó la placa durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, y después se trataron las células con los derivados **6b** y **7b** a las concentraciones de 0, 5, 10, 2, 40, 50 μM y se volvieron a incubar otras 24 h en las mismas condiciones. Posteriormente, se trataron las células con glutamato a la concentración de su DL50. Tras 24 h de incubación se

determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de MTT, según el protocolo de Mosmann.¹⁵⁷



Esquema 6. Ensayo de neuroprotección en condiciones de excitotoxicidad inducida por glutamato. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT.

III.8. Determinación de los niveles intracelulares de ROS en ensayos de neuroprotección.

Para aquellas 1,3- β -dicetonas que mostraron actividad neuroprotectora en condiciones de EO inducida por diferentes estresores, se procedió a la determinación de los niveles intracelulares de ROS después del tratamiento con dichos compuestos en la línea celular SH-SY5Y en condiciones crónicas y agudas de EO.

Para ello en el presente estudio se empleó la sonda fluorescente diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA) siguiendo el método de Wang y col.¹⁶³ En este ensayo el DCFH₂-DA internalizado por las células es escindido intracelularmente por las esterasas celulares, siendo oxidado posteriormente por las ROS para formar el compuesto fluorescente Diclorofluoresceína (DCF),¹⁶⁴ siendo ésta una molécula altamente fluorescente. De esta forma se puede relacionar directamente el contenido de ROS con la fluorescencia emitida por la DCF.

Para este ensayo se utilizaron placas negras de 96 pocillos con fondo plano y transparente (10588885, Thermo Scientific) en las que se sembraron 3.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Transcurrido el primer período de incubación las células se trataron con los compuestos **6b** y **7b** a las concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M. En el modelo crónico, dicho tratamiento con los compuestos se llevó a cabo durante 24 h, y después

se indujo el EO con H₂O₂ (SZBB3540V, Sigma-Aldrich) 400 µM durante 4 horas. En el modelo agudo, el tratamiento con los compuestos se realizó durante 6 h, transcurridas las cuales se indujo el EO durante 2 h con H₂O₂ 500 µM. En ambos casos, después del período de incubación con H₂O₂, las células fueron lavadas dos veces con tampón Hanks (sin Ca⁺² ni Mg⁺²) (BE10-547F, Lonza) y posteriormente se trataron con DCFH₂-DA 20 µM (D6883, Sigma-Aldrich) disuelto en medio de cultivo sin suero fetal bovino. Se incubaron las placas de ambos tratamientos durante 40 min, tras lo cual se lavaron dos veces con tampón Hanks. Las medidas de fluorescencia se realizaron en el espectrofotómetro a la longitud de excitación de 485 nm y a la de emisión de 535 nm.

III.9. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$).

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial en células SH-SY5Y en condiciones de estimulación crónicas y agudas de EO, previo tratamiento con los mejores compuestos, se usó la sonda fluorescente de yoduro de 5,5', 6, 6'-tetracloro-1,1',3, 3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), la cual es capaz de entrar en el interior celular formando monómeros a nivel citoplasmático y formando agregados en la mitocondria, siempre y cuando la homeostasis mitocondrial funcione correctamente. Esta sonda tiene una longitud de excitación de 488 nm y tanto los agregados como los monómeros de JC-1 exhiben fluorescencia. Los monómeros exhiben fluorescencia verde (con pico emisión a 527 nm) y los agregados de JC-1 muestran fluorescencia roja (con pico emisión a 590 nm). Por lo tanto, las células sanas emitirán mayor fluorescencia roja que verde, mientras que las células con la función mitocondrial alterada por el EO muestran mayor fluorescencia verde que roja.^{32,165,166}

Este estudio se realizó mediante dos técnicas de análisis, utilizando espectroscopia de fluorescencia en formato de placa p96 negra y por citometría de flujo en formato de placa p6.

III.9.1. Ensayo por espectroscopía de fluorescencia.

Para determinar el $\Delta\psi_m$ mediante espectroscopía de fluorescencia, se utilizó el colorante catiónico JC-1, el cual entra selectivamente en las mitocondrias y de forma reversible cambia su color de rojo a verde a medida que disminuye el potencial de membrana.¹⁶⁷ En células sanas, JC-1 forma agregados fluorescentes rojos, mientras que en células apoptóticas con bajo potencial de membrana, JC-1 permanece como monómeros con fluorescencia verde.¹⁶⁸

En este ensayo se utilizaron placas negras de 96 pocillos con fondo plano y transparente (10588885, Thermo Scientific) sembrándose 3.000 células por pocillo e incubándose durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Transcurrida la primera incubación, las placas se trataron con los mejores compuestos (**6b** y **7b**), a concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M. En el tratamiento crónico la incubación con los compuestos fue de 24 h, tratándose posteriormente con H₂O₂ a 400 μ M (SZBB3540V, Sigma-Aldrich) durante 4 h. En el tratamiento agudo las células se trataron con los compuestos durante 6h a las mismas concentraciones, y luego se expusieron 2 h a H₂O₂ 500 μ M. Una vez finalizado el período de incubación con H₂O₂, las células se lavaron dos veces con tampón Hanks y posteriormente se incubaron las placas con JC-1 5 μ M (BIOV1130-5, VWR) durante 20 min, tras lo cual se lavaron las células tres veces con tampón Hanks. Las placas se leyeron en el espectrofotómetro, la intensidad de fluorescencia roja debida a los J-agregados se midió a longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm, mientras que para los J-monómeros con fluorescencia verde se midió a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión a 535 nm. Los resultados fueron expresados como la relación de la intensidad de fluorescencia de los J-agregados:J-monómeros.

III.9.2. Ensayo por citometría de flujo.

Para corroborar el potencial de membrana mitocondrial con el compuesto **7b** se realizaron estudios de citometría de flujo. En este ensayo se

utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos de fondo plano Costar™ (10578911, Fisher Scientific) sembrando 250.000 células por pocillo, incubándose la placa durante 24 h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Transcurrido el primer período de incubación se trataron las células con **7b** a concentraciones de 20 μM y 40 μM, incubándose la placa otras 24 h en las mismas condiciones. Una vez finalizada la segunda incubación las células se trataron con H₂O₂ a 400 μM (SZBB3540V, Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 24 h. Tras la incubación las células se lavaron con tampón Hanks y se incubaron durante 30 min más en medio de cultivo con JC-1 5 μM (BIOV1130-5, VWR). Tras la incubación se procedió al levantamiento enzimático de las células con 0,3 ml de tripsina 0,25%/EDTA (T3924, Sigma-Aldrich) por pocillo durante 5 minutos. Tras la neutralización de la tripsina con 1 ml de medio de cultivo, se centrifugaron a 1000 rpm durante 4 minutos en un vial Eppendorf de 1,5 ml. El pellet fué resuspendido en 1 ml de medio Hanks para su lectura posterior en el citómetro de flujo. El análisis de poblaciones por citometría de flujo se realizó teniendo en cuenta que los monómeros de JC-1 exhiben fluorescencia verde (con pico emisión a 527 nm) medida en el canal FL-1 y los agregados de JC-1 muestran fluorescencia roja (con pico emisión a 590 nm) medida en el canal FL-2. Por lo tanto, las células sanas emitirán mayor señal de fluorescencia en el canal FL-2 (fluorescencia roja) que señal de fluorescencia en el canal FL-1 (verde), mientras que las células con la función mitocondrial alterada por el EO mostraron mayor señal en el canal FL-1 que en el canal FL-2.

III.10. Cuantificación de biomarcadores celulares de daño oxidativo.

Para cuantificar los biomarcadores celulares de daño oxidativo en la línea neuronal SH-SY5Y en condiciones de estimulación crónica y aguda de EO se realizaron los siguientes ensayos.

III.10.1. Cuantificación de MDA.

El malondialdehído (MDA) es uno de los aldehídos reactivos más comunes en el plasma, suero y tejidos. Es por ello que su cuantificación se haya usado para determinar la peroxidación de lípidos a nivel celular y tisular, cuantificando así el nivel de estrés oxidativo in vivo e in vitro. Entre los métodos más comunes está el método TBARS.^{169,170} En este método, el sustrato de la reacción es el MDA, que reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) en medio ácido y a alta temperatura para dar un complejo coloreado, que puede cuantificarse mediante fluorimetría o espectrofotometría.^{171,172}

Para la cuantificación del MDA se utilizaron placas de cultivo de 6 pocillos de fondo plano Costar™ (10578911, Fisher Scientific) con 250.000 células por pocillo. Las células se incubaron de manera estándar durante 48 h, tras la incubación se trataron las células con los derivados **6b**, **7b** a concentraciones de 10 μM y 20 μM . En el tratamiento crónico la incubación con los compuestos fue de 24 h, tratándose posteriormente con H_2O_2 a 400 μM (SZBB3540V, Sigma) durante 4 h. En el tratamiento agudo las células se trataron con los compuestos durante 6 h a las mismas concentraciones, y luego se expusieron H_2O_2 500 μM durante 2 h. Una vez finalizado el período de incubación las células se lavaron con PBS 50 mM y se levantaron mecánicamente. Se recolectaron en tubos de 5 ml (0030119380, Eppendorf) y se resuspendieron en 1 ml de PBS 50 mM. Se mantuvieron a -80°C durante 24 h. Se realizó una recta de calibrado de MDA utilizando TMOP, molécula generadora de MDA (108383, Sigma-Aldrich), con las siguientes concentraciones de MDA 0, 0.007, 0.013, 0.030, 0.060, 0.125, 0.250, 0.500 μM .

Para el ensayo, de cada pellet celular con PBS se cogieron 150 μL y se añadió se añadió 100 μL de buffer de lisis (Tris-HCl 1 M pH=8, EDTA 0,5 M y 10% SDS). Las muestras se sonicaron durante 10 min en hielo en el sonicador (3000512 – Ultrasons 1 Litro, Grupo Selecta). Tras lo cual se añadió 1,250 ml de TBA (ácido acético glaciar y 2- tiobarbiturico en una proporción 1:4, (20104.298, VWR), (T-5500, Sigma), respectivamente). Se

incubó 1 h a 96°C y 700 rpm en el termo bloque (20444601112 - Thermomixer Comfort, Eppendorf). Tras la hora se pasaron a hielo durante 10 minutos y se centrifugaron durante otros 10 min a 4°C y 13.000 g. Posteriormente se cogió 200 µL del sobrenadante por triplicado y se pasaron a una placa negra de 96 pocillos con fondo plano y transparente (10588885, Thermo Scientific) para determinarse la fluorescencia en el espectrofotómetro con una excitación a 540 nm y una emisión a 590 nm.

Para dar un valor de MDA en correspondencia a la cantidad de células que tenemos en la muestra se determinó la cantidad de proteínas que posee la muestra, mediante el método de Bradford.¹⁷³ Se tomaron 25 µL de muestra y 75 µL de Bradford (B6916, Sigma-Aldrich), se dejó incubar durante 10 minutos en agitación y a continuación se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a $\lambda = 595$ nm. Como recta patrón para la determinación de proteínas se usó albumina de suero bovino (BSA) (1076192, Sigma-Aldrich) a concentraciones de 0, 0.97, 1.9, 3.9, 7.8 y 15.6 µg/ml.

III.10.2. Determinación de los niveles endógenos de GSH y GSSG.

La GSH es la enzima antioxidante más común en células aeróbicas. Dado el alto consumo de oxígeno del cerebro, éste es especialmente susceptible al EO, por lo que la GSH actúa como un secuestrador de radicales libres.¹⁰⁹ La actividad AOX de la GSH es debida al grupo cisteína-tiol,¹¹⁰ que es susceptible de ser oxidado por sustancias pro-oxidantes como los ROS o los RNS, para dar la forma oxidada de la GSH, la GSSG. En condiciones fisiológicas, la forma reducida de la GSH es la predominante, sin embargo a medida que van aumentando los radicales libres la forma predominante es la GSSG. Por tanto, la medida del ratio GSH/GSSG es indicativo de la presencia de ROS en modelos experimentales. Esta descrito que el ratio GSH/GSSG se ve disminuido en el envejecimiento celular y en las enfermedades neurodegenerativas como la EP y la EA.^{174,112}

Para determinar la relación GSH/GSSG se utilizaron placas de cultivo de

6 pocillos de fondo plano Costar™ (10578911, Fisher Scientific) con 250.000 células por pocillo. Las células se incubaron de manera estándar durante 48 h para que se produzca la expresión de los biomarcadores de EO, tras la incubación se trataron las células con los derivados **6b**, **7b** a concentraciones de 10 μM y 20 μM . En el tratamiento crónico la incubación con los compuestos fue de 24 h, tratándose posteriormente con H_2O_2 a 400 μM (SZBB3540V, Sigma) durante 4 h. En el tratamiento agudo las células se trataron con los compuestos durante 6 h a las mismas concentraciones, y luego se expusieron 2 h a H_2O_2 500 μM . Una vez finalizado el período de incubación las células se lavaron con PBS 50 mM y se levantaron mecánicamente para su ruptura. Se recolectaron en tubos eppendorf de 5 ml (0030119380, Eppendorf) y se resuspendieron en 1 ml de PBS 50 mM. Se mantuvieron a -80°C durante 24 h.

Para la determinación de la GSH se tomaron 100 μL de muestra y se le añadió 10 μL de OPT a 10mg/ml (1.11452.0005, MERK) y 290 μL del buffer KPE (fosfato potásico monobásico (P5655, Sigma-Aldrich)) + EDTA 1233508, Sigma-Aldrich)+ Di-potasio hidrógenofosfato (12D050006, VWR). Se agitaron las muestras y se centrifugaron a 13.000 g a 4°C durante 10 min, posteriormente se transfirió 100 μL del sobrenadante una placa negra de 96 pocillos con fondo plano y transparente (10588885, Thermo Scientific) y se determinó la fluorescencia en el espectrofotómetro con una excitación de $\lambda = 360$ nm y una emisión de $\lambda = 420$ nm. Se realizó una recta de calibrado de GSH (0399, VWR) a concentraciones de 0; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25 y 50 μM con objeto de determinar la concentración de GSH de la muestra.

Para la determinación de la GSSG se cogió 100 μL de muestra y se le añadió 2 μL de NEM (40526, Alfa Aesar) y 200 μL de KPE, se agito y se incubo durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se añadieron 10 μL de OPT y 190 μL NaOH 0,1 N (655104, Sigma) y se volvió a incubar 10 min en oscuridad. Se centrifugaron las muestras a 13.000 g a 4°C durante 10 min, posteriormente se transfirió 100 μL del

sobrenadante a una placa de 96 negra con fondo plano y transparente (10588885, Thermo Scientific) para determinar la fluorescencia de igual modo que en la GSH. Asimismo se realizó una recta de calibrado de GSSG (0524, VWR) a concentraciones de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 y 200 μM con objeto de determinar la concentración de GSSG de la muestra.

III.11. Cuantificación de la expresión de las enzimas endógenas de defensa antioxidante.

Para determinar los niveles de expresión de las enzimas endógenas de defensa antioxidante en las células SH-SY5Y en condiciones crónicas de EO, se utilizó la técnica de Western Blot.

Se determinó el nivel de expresión de la enzima Hmox-1 ya que es considerada como un indicador sensible y fiable de EO, y se sabe que su actividad aumenta en respuesta al EO regulando la expresión inducible de numerosos genes de enzimas anti-apoptóticas, anti-oxidantes y anti-inflamatorias.¹⁷⁵

Por otro lado se determinó también la influencia de los derivados en la vía Nrf2/Keap1, Nrf2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas antioxidantes y citoprotectoras, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE mientras que Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch) regula la actividad de Nrf2. Keap1 también actúa como un sensor de resistencia oxidativa y electrofílica.¹⁷⁶

En numerosos estudios se ha determinado que ambas vías se encuentran influenciada por los polifenoles como la curcumina.^{175,177}

Para ello se emplearon placas de cultivo de 6 pocillos de fondo plano Costar™ (10578911, Fisher Scientific) sembradas con 250.000 células por pocillo. Posteriormente se incubaron las placas bajo condiciones estándar durante 24 h, tras lo cual se trataron las células con 20 μM y 40 μM de los derivados **6b** y **7b**. Se volvió a incubar la placa otras 24 h, y se pasó a realizar el tratamiento crónico en el cual se trataron las células con H_2O_2 a 750 μM y se incubó durante 24 h. Se extrajo de las células la

proteína total celular utilizando un tampón de lisis RIPA (R0278 Sigma-Aldrich), suplementado con inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail P8340, Sigma–Aldrich) y de fosfatasas (Phosphatase inhibitor cocktail Set II, Calbiochem). Las células se incubaron con esta solución tampón durante 30 minutos a 4°C; posteriormente se centrifugaron a 12.000 g durante 15 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Una vez extraído el contenido proteico, se determinó su concentración mediante el método estándar del ácido bicinconínico con el kit “BCA Protein Assay” (Thermo Fisher Scientific), utilizando BSA como estándar. Los extractos proteicos (20 µg de proteína) se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 12% en presencia de SDS y bajo condiciones reductoras; a continuación, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa mediante un sistema semi-seco Trans-Blot® (Bio-Rad, Berkeley, CA, EEUU). Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche al 5% en un tampón Tris-HCl 50 mM (T3263, Sigma-Aldrich), pH 7,5, NaCl 150 mM (S9888, Sigma-Aldrich) con Tween-20 (P1369, Sigma-Aldrich) al 0,1%. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos y, posteriormente, con la IgG secundaria correspondiente conjugada con peroxidasa (tabla 5). Las bandas inmunorreactivas se detectaron por quimioluminiscencia mediante el sistema ECL (GE-Amersham, Buckinghamshire, R.U) y fueron cuantificadas por densitometría mediante el programa informático ImageJ v1.46a (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU).

Proteína	Anticuerpo primario	Incubación	Anticuerpo secundario	Incubación
β -Actina	Monoclonal de ratón (Santa Cruz) [1:1.000]	T/N 4°C	IgG de cabra anti-ratón-HRP (Abcam) [1:5.000]	1h, TA
HMOX2	Monoclonal de conejo (ABclonal) [1:1.000]		IgG de cabra anti-conejo-HRP (Abcam) [1:5.000]	
Nerf2	Monoclonal de conejo (Elabscience) [1:1.000]			
KEAP1	Monoclonal de conejo (Elabscience) [1:1.000]			

Tabla 5. Relación de Anticuerpos primarios y secundarios empleados.

III.12. Análisis estadístico.

Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado a menos que se indique lo contrario.

Para las curvas de captación de radicales y las curvas de muerte se realizó un ajuste por mínimos cuadrados de regresión no lineal usando el programa GRaphPad Prism 7.0 (GraphPad-Software, LA Jolla, CA, EUA)

Para todos los estudios de evaluación *in vitro* de la actividad biológica se realizaron comparaciones entre los grupos control y tratados o el intragrupo completo usando un ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiple de Dunnet.

IV.RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Determinación de la capacidad AOX: Método ABTS, FRAP y DPPH.

A continuación se describen los resultados obtenidos para la determinación de la capacidad AOX de los 1,3- β -dicetonas, comparándolos con curcumina y trolox como compuestos AOX de referencia.

La actividad AOX de los compuestos ha sido caracterizada por los métodos ABTS, FRAP y DPPH. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 6 y 7.

Compuesto	Ensayo ABTS		Ensayo FRAP		
	IC50 (μ M)	ABTS-TEAC _{100*}	a 100 μ M	a 200 μ M	FRAP-TEAC _{100**}
Trolox	34,0 \pm 2,3	1,00	53,00	100,00	1,00
Curcumina	22,4 \pm 0,9	1,05	47,00	74,40	0,86
1a	50,5 \pm 2,0	0,88	32,20	55,70	0,59
2a	>600	0,21	0,10	0,70	0,00
3a	60,2 \pm 2,2	0,51	20,50	31,00	0,33
4a	107,8 \pm 7,6	0,40	9,80	14,30	0,15
5a	274,7 \pm 35,3	0,23	3,40	5,30	0,05
6a	67,2 \pm 2,7	0,51	15,50	25,20	0,25
7a	79,6 \pm 4,3	0,69	14,00	20,70	0,22
1b	34,6 \pm 2,7	0,73	36,60	61,40	0,64
2b	>600	0,23	1,90	3,10	0,03
3b	113,3 \pm 12,4	0,67	19,70	32,60	0,34
4b	216,1 \pm 39,5	0,52	4,80	8,50	0,09
5b	518,1 \pm 94,6	0,32	3,00	4,70	0,05
6b	115,5 \pm 11,0	0,67	6,70	11,30	0,15
7b	70,9 \pm 5,8	0,62	8,80	15,30	0,16

*ABTS-TEAC₁₀₀ ensayo ABTS.

**FRAP-TEAC₁₀₀ ensayo FRAP.

Tabla 6. Capacidad AOX del trolox, de la curcumina y de la serie **a** y **b** determinada mediante ABTS y FRAP. Valores de IC50, definidos como la cantidad de AOX necesaria para disminuir la concentración de radicales iniciales en un 50% y valores TEAC definidos como la capacidad antioxidante equivalente al trolox. En el caso del FRAP se muestra la capacidad reductora del compuesto a 100 y 200 μ M. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado.

En ellas se muestran valores de IC50, definidos como la cantidad de AOX necesaria para disminuir la concentración de radicales iniciales en un 50%, y valores TEAC definidos como la capacidad antioxidante equivalente al trolox; se trata de una medida que determina la fuerza antioxidante de un compuesto basada en la capacidad AOX del trolox.

De los resultados expuestos los compuestos con mejor carácter AOX corresponden a **1a**, **3a**, **4a**, **6a**, **7a**, **1b**, **3b**, **6b** y **7b**; siendo **1a** y **1b** los que mejor capacidad AOX presentan. Por otro lado los valores obtenidos para curcumina y trolox eran los esperados tal y como se respalda en la literatura.^{178,179} Por lo que los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados mediante los métodos ABTS y FRAP confirman el carácter AOX de curcumina, trolox y de las 1,3- β -dicetonas.

En cuanto al ensayo de DPPH, los compuestos **1a** y **1b** fueron las únicas β -dicetonas que han mostrado actividad en este ensayo. La tabla 7 muestra los valores de IC50 obtenidos para trolox, curcumina y los derivados **1a** y **1b**. En ella se puede observar que los derivados **1a** y **1b** poseen mayores valores de IC50 que los de curcumina y trolox.

Compuesto	IC50 (μM)*
Trolox	19,0 \pm 1,8
Curcumina	26,5 \pm 1,5
1a	42,3 \pm 3,4
1b	53,8 \pm 2,6

* Concentración de antioxidante que causa la disminución del 50% del radical DPPH.

Tabla 7. Capacidad AOX del trolox, de la curcumina y de la serie **a** y **b** determinada mediante DPPH. Valores de IC50, definidos como la cantidad de AOX necesaria para disminuir la concentración de radicales iniciales en un 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado.

En la Figura 13 se muestra el porcentaje de DPPH[•] restante en ella se puede observar que ha altas concentraciones **1b** es el que mejor disminuye la cantidad de DPPH[•].

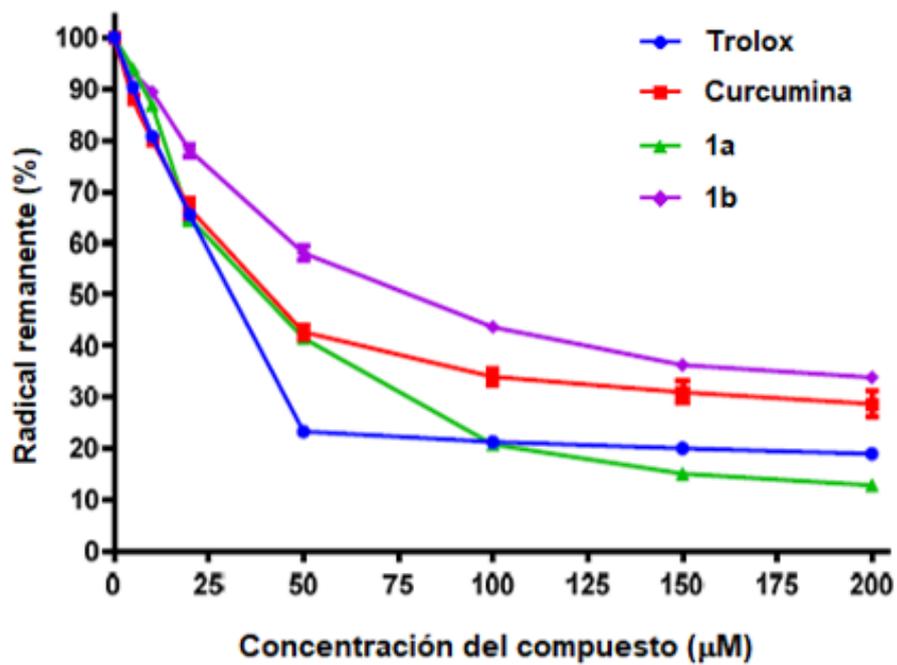


Figura 13. Capacidad antioxidante de trolox, curcumina, **1a** y **1b**, medida como % de cantidad de DPPH[•] residual. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado.

IV.2. Determinación de las propiedades drug-like.

Para estudiar el potencial farmacológico de todos los compuestos sintetizados, se calcularon sus parámetros fisicoquímicos y se compararon con los de la curcumina. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Compuesto	PM	MlogP	logD	NO	TPSA	HBD
Curcumina	368,39	2,256	2,778	6	96,2	3
1a	296,33	2,938	2,467	4	66,8	2
2a	298,32	3,863	3,021	3	46,5	1
3a	284,29	3,628	2,813	3	57,5	2
4a	284,29	3,628	3,023	3	57,5	2
5a	302,28	4,014	2,170	3	57,5	2
6a	302,28	4,014	2,885	3	57,5	2
7a	302,28	4,014	2,858	3	57,5	2
1b	288,23	2,046	0,563	4	66,8	2
2b	290,22	2,981	0,945	3	46,5	1
3b	276,19	2,725	0,972	3	57,5	2
4b	276,19	2,725	1,074	3	57,5	2
5b	294,18	3,122	0,974	3	57,5	2
6b	294,18	3,122	1,158	3	57,5	2
7b	294,18	3,122	1,163	3	57,5	2

Tabla 8. Propiedades drug-like de la curcumina y de las 1,3- β -dicetonas. Los cálculos se realizaron con MedChem Designer(TM) MedChem – Designer – Simulations – Plus - Inc. ; Lancaster, CA, USA: 2014. Version 3.1.0.30. PM: peso molecular; MlogP: Moriguchi logP; logD: coeficiente de distribución a pH 7.4; NO: número de átomos de oxígeno; TPSA: Área de superficie polar total; HBD: número de grupo donante de enlace de hidrógeno.

Los criterios actualmente más aceptados para compuestos dirigidos al SNC son los siguientes: $PM \leq 360$, $MlogP \leq 3.0$, $logD \leq 2$, $HBD \leq 2$, $NO \leq 2$, $TPSA > 40 \text{ \AA}^2$ y $\leq 90 \text{ \AA}^2$.^{180,181} Según los resultados obtenidos podemos observar que todos los compuestos poseen propiedades similares a las de la curcumina mejorándose muchas de ellas en los derivados, teniendo los compuestos de la serie **b** (CF₃) el perfil más compensado en cuanto a PM, MlogP, logD y TPSA, y siendo los compuestos **6b** y **7b** los más prometedores considerando sus propiedades fisicoquímicas calculadas y sus actividades antioxidantes.

IV.3. Determinación de la citotoxicidad de los compuestos en las diferentes líneas celulares.

IV.3.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) en la línea celular SH-SY5Y.

Los resultados de los estudios de citotoxicidad frente a células de la línea neuronal SH-SY5Y se muestran en la tabla 9. Los datos se expresan como valores de DL50 (μM), es decir, la concentración del compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular al 50% con respecto del control.

Compuesto	DL50 (μM)*
Curcumina	48,8 \pm 5,1
1a	103,8 \pm 6,7
2a	75,7 \pm 5,4
3a	98,1 \pm 8,3
4a	103,5 \pm 7,1
5a	118,7 \pm 8,5
6a	134,2 \pm 6,6
7a	125,6 \pm 8,0
1b	101,8 \pm 5,6
2b	88,0 \pm 4,5
3b	109,0 \pm 7,6
4b	138,0 \pm 6,5
5b	153,0 \pm 21,0
6b	186 \pm 13,2
7b	200 \pm 17,1

Tabla 9. Citotoxicidad de la curcumina y de la serie **a** y **b** sobre la línea neuronal SH-SY5Y. Valores de DL50, definidos como la cantidad de compuesto necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT.

A partir de los resultados obtenidos podemos determinar que la serie **b** posee una citotoxicidad menor que la serie **a** sobre la línea neuronal SH-SY5Y.

En las siguientes figuras (14-28) se muestran las imágenes tomadas con un microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM300). Se observa que algunos compuestos son capaces de cristalizar (**1a**, **2a** y **3a**), a diferencia del resto, pudiendo ser esto un factor influyente en la citotoxicidad de la línea celular SH-SY5Y.

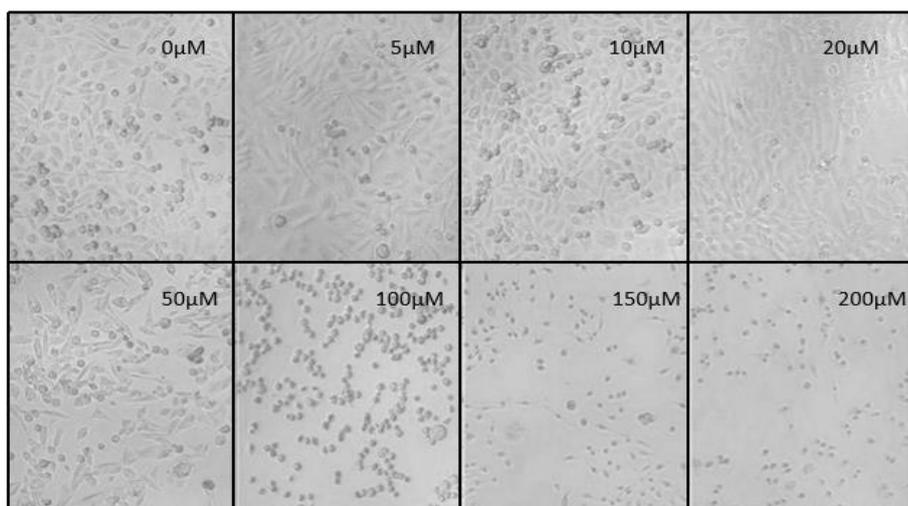


Figura 14. Citotoxicidad de curcumina a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

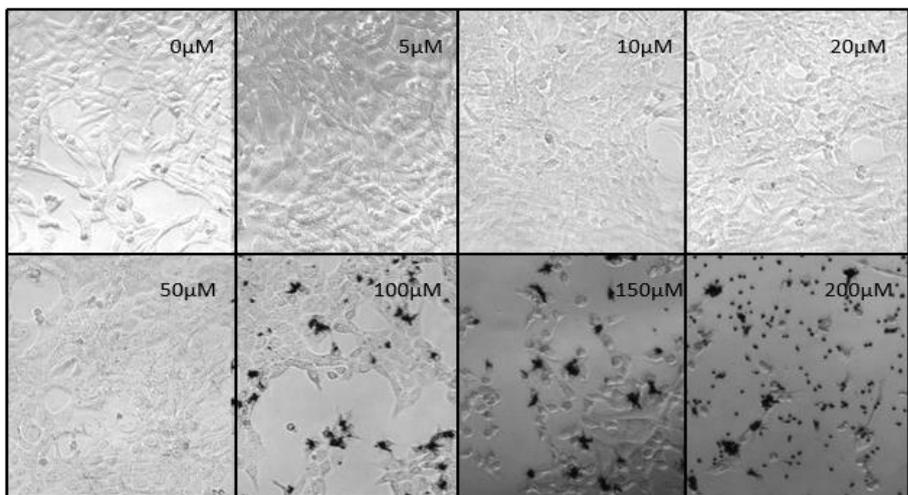


Figura 15. Citotoxicidad del compuesto **1a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

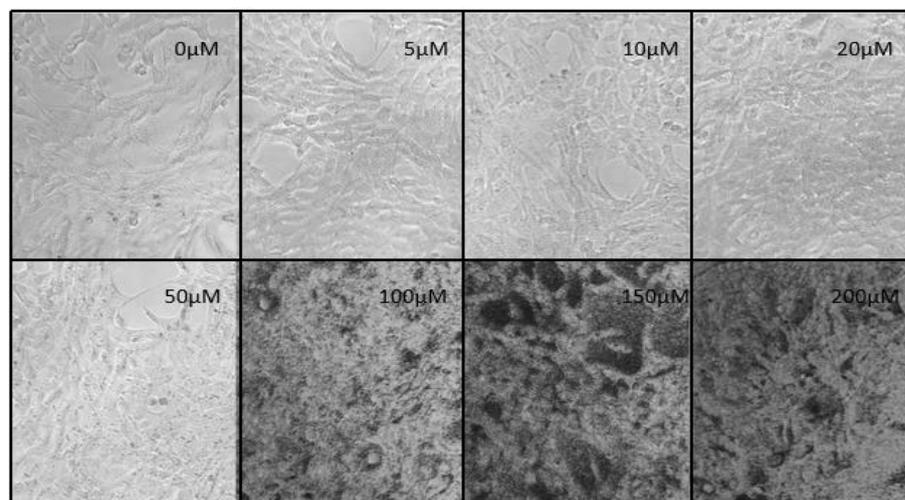


Figura 16. Citotoxicidad del compuesto **2a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

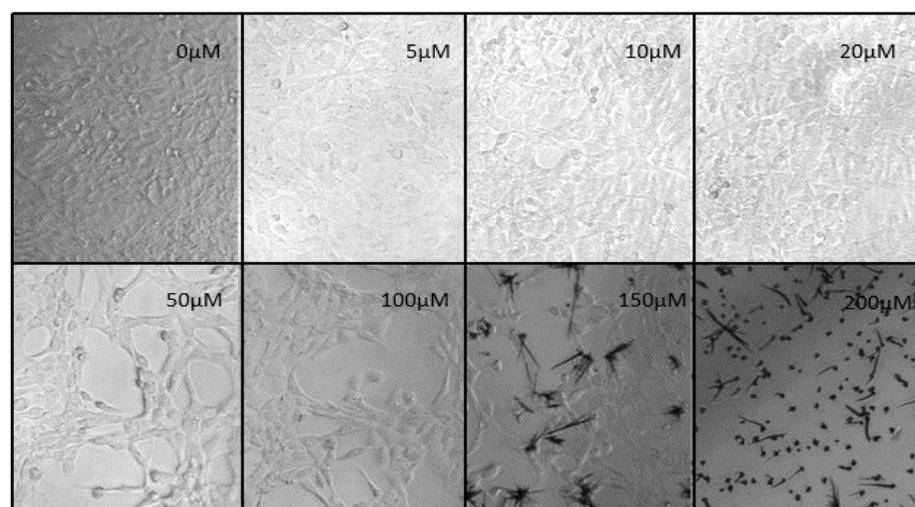


Figura 17. Citotoxicidad del compuesto **3a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

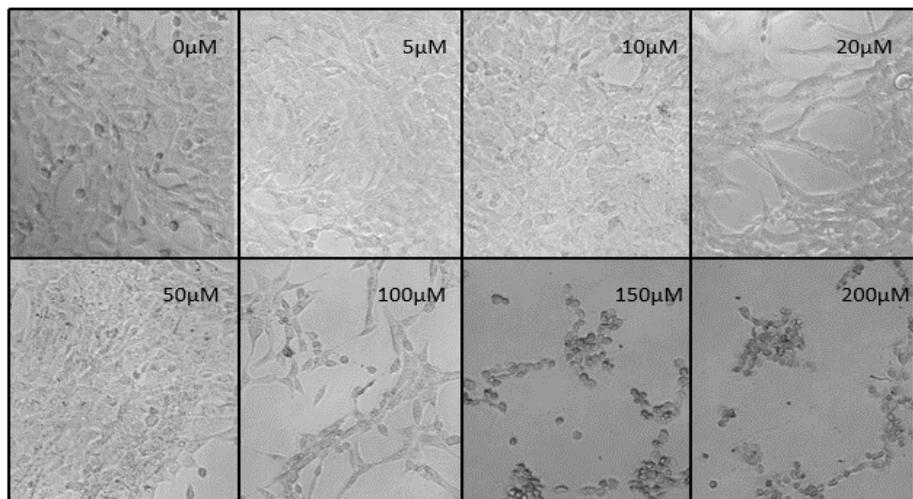


Figura 18. Citotoxicidad del compuesto **4a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

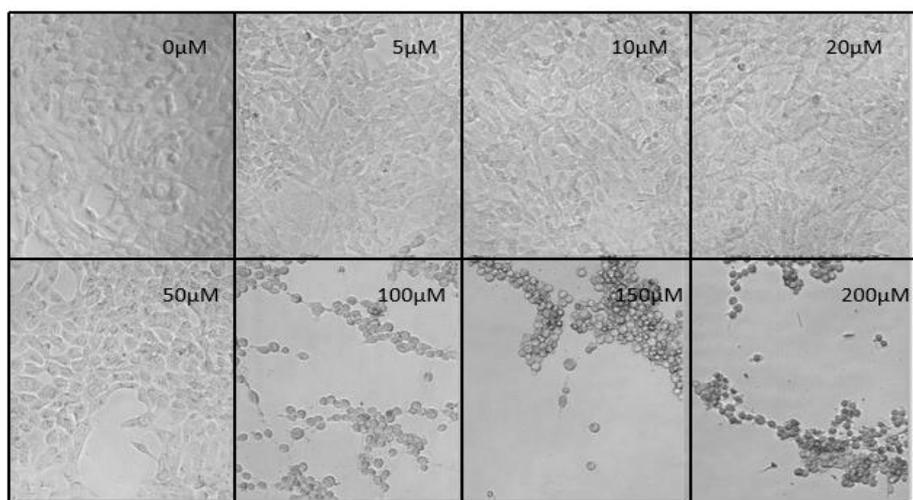


Figura 19. Citotoxicidad del compuesto **5a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

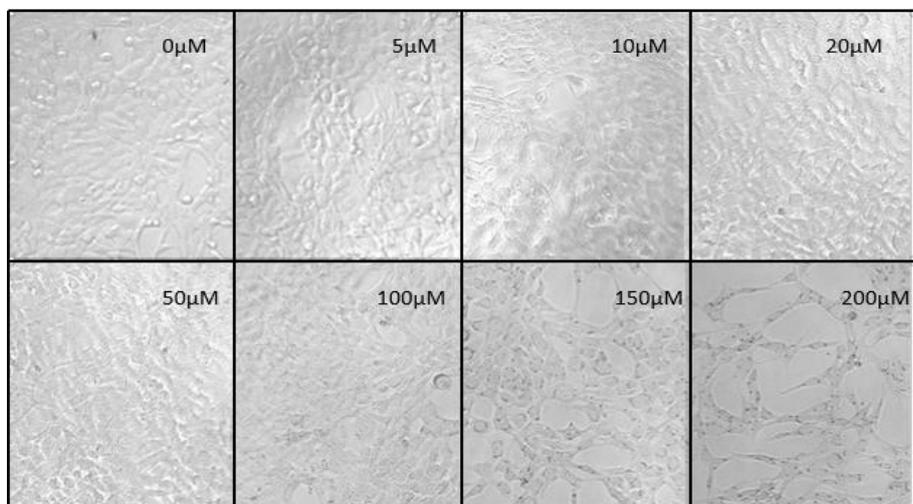


Figura 20. Citotoxicidad del compuesto **6a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

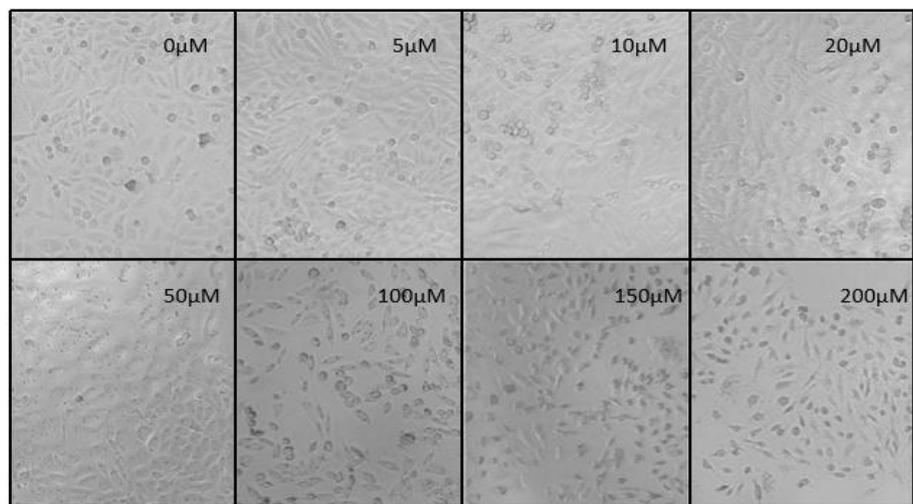


Figura 21. Citotoxicidad del compuesto **7a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

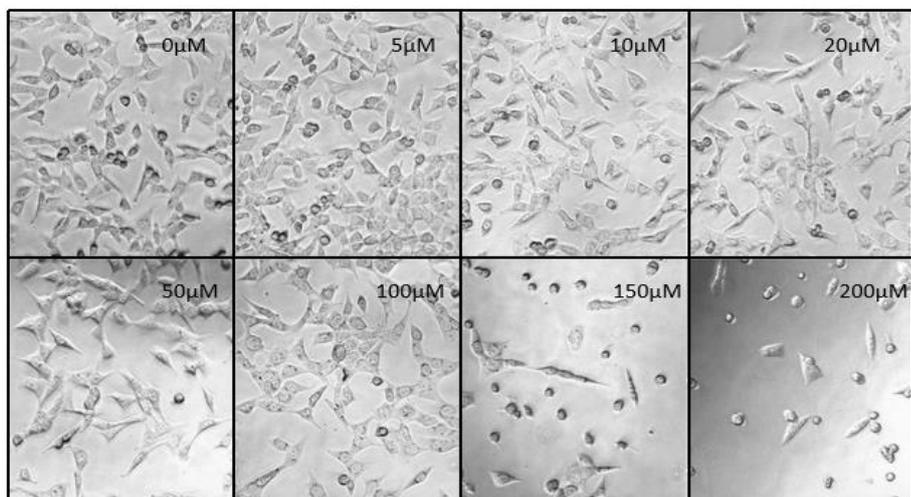


Figura 22. Citotoxicidad del compuesto **1b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

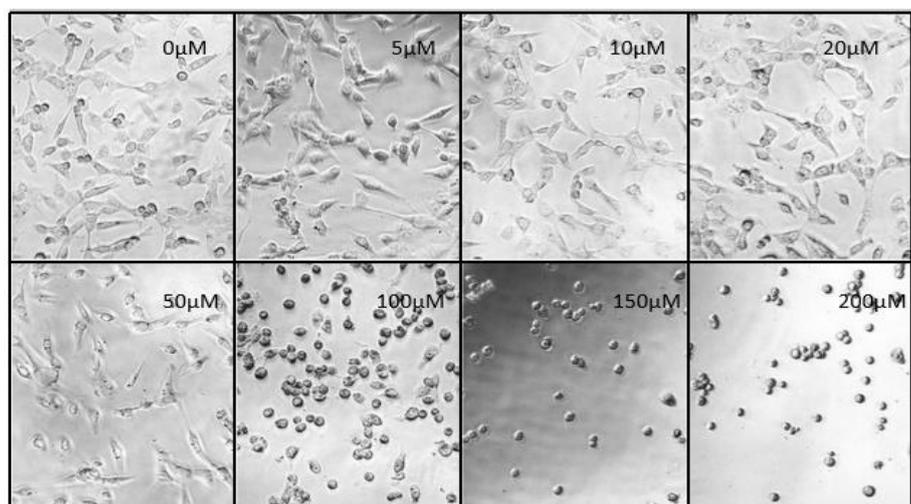


Figura 23. Citotoxicidad del compuesto **2b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

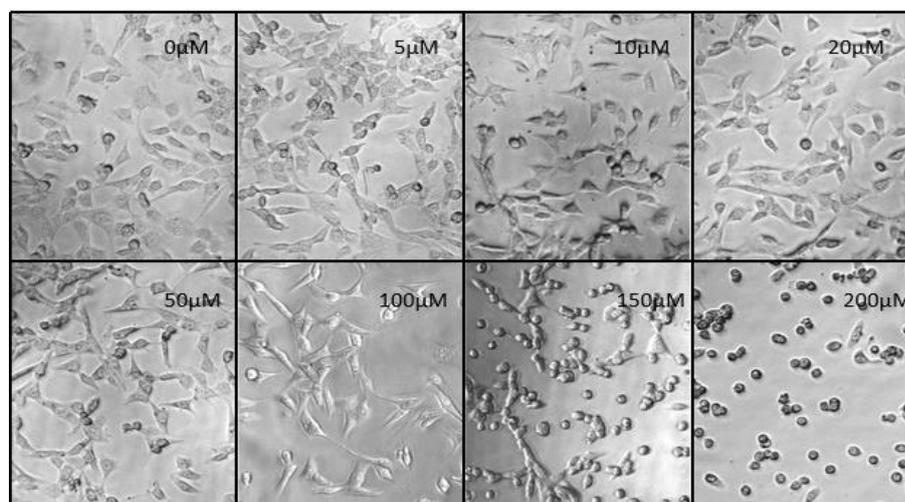


Figura 24. Citotoxicidad del compuesto **3b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

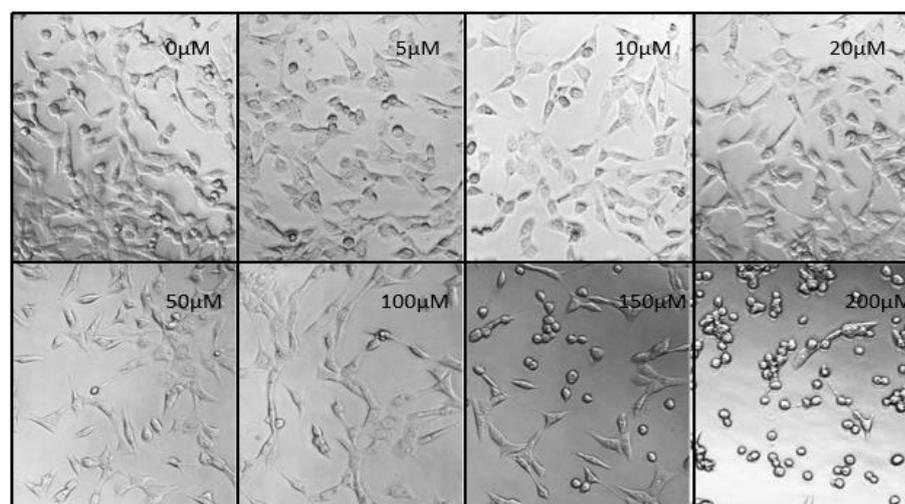


Figura 25. Citotoxicidad del compuesto **4b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

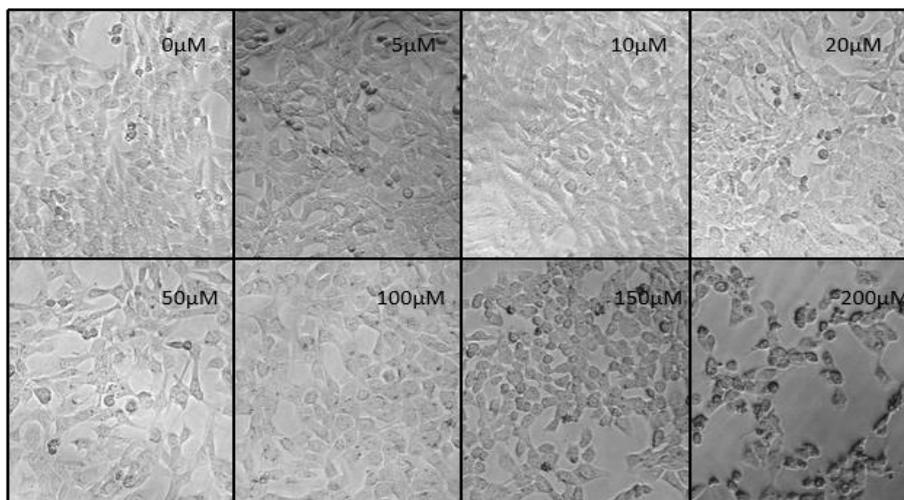


Figura 26. Citotoxicidad del compuesto **5b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

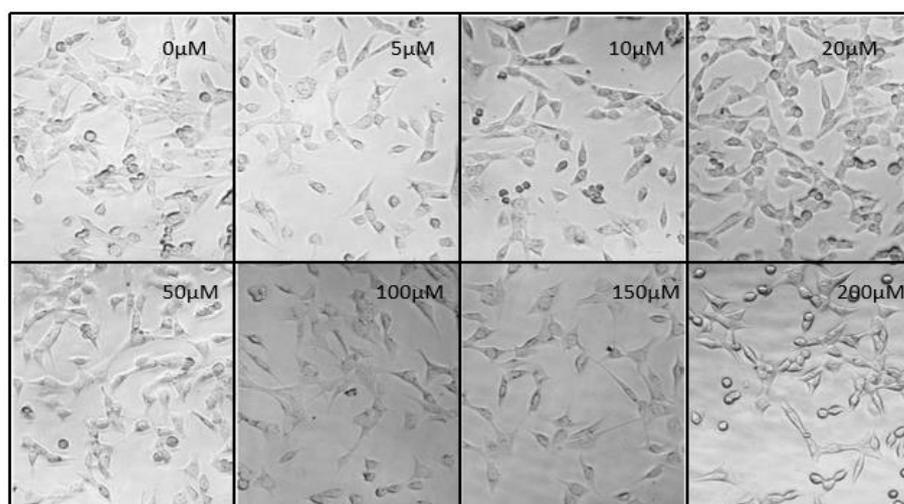


Figura 27. Citotoxicidad del compuesto **6b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

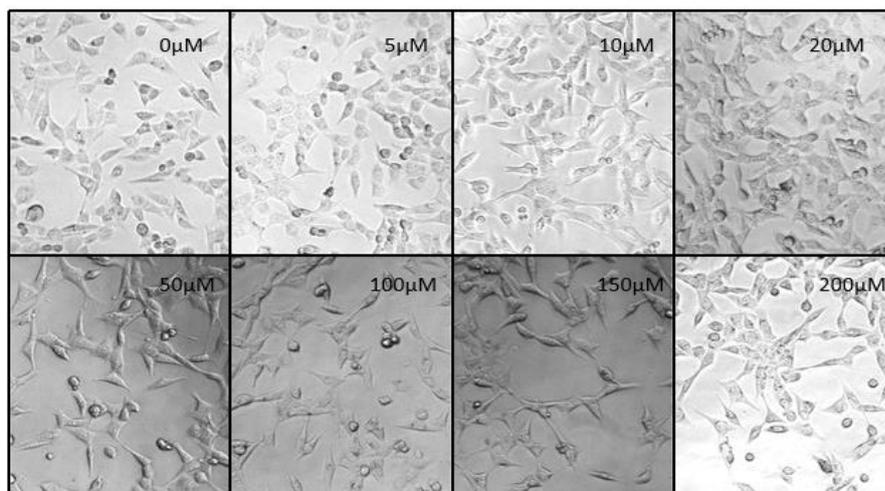


Figura 28. Citotoxicidad del compuesto **7b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular SH-SY5Y. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

IV.3.2. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) en la línea celular HT-22.

En cuanto a la línea celular HT-22 tanto la serie **a** como la serie **b** muestran la DL50 por encima de 200 μM exceptuando la curcumina y los compuestos **2a**, **4a**, **7a** y **2b** tal y como se muestra en la tabla 10.

Compuesto	DL50 (μM)*
Curcumina	83,52 \pm 9,372
1a	> 200
2a	155,4 \pm 16,45
3a	> 200
4a	154,6 \pm 20,53
5a	> 200
6a	> 200
7a	199,4 \pm 24,17
1b	> 200
2b	109,6 \pm 11,05
3b	> 200
4b	> 200
5b	> 200
6b	> 200
7b	> 200

Tabla 10. Citotoxicidad de la curcumina y de la serie **a** y **b** sobre la línea neuronal HT-22. Valores de DL50, definidos como la cantidad de compuesto necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT.

A partir de los resultados obtenidos podemos determinar que los compuestos muestran menor citotoxicidad para esta línea que para la línea neuronal SH-SY5Y y que la adición del grupo fenilo o trifluorometilo no afecta de forma significativa en la citotoxicidad de los compuestos.

Por lo que se puede ver que la sustituciones realizadas tanto en la serie **a** como en la serie **b** disminuyen la citotoxicidad con respecto a la curcumina.

En las siguientes figuras se observa, al igual que para las SH-SY5Y, las imágenes tomadas al microscopio invertido de contraste de fases (Leica DM300) de la citotoxicidad de nuestros compuestos, en ellas se puede observar que la serie **b** posee menor citotoxicidad y que algunos compuestos de la serie **a** como el **1a**, **2a** y **3a** cristalizan, pudiendo ser esto un factor influyente en la citotoxicidad de la línea celular HT-22 al igual que ocurre en las SH-SY5Y.

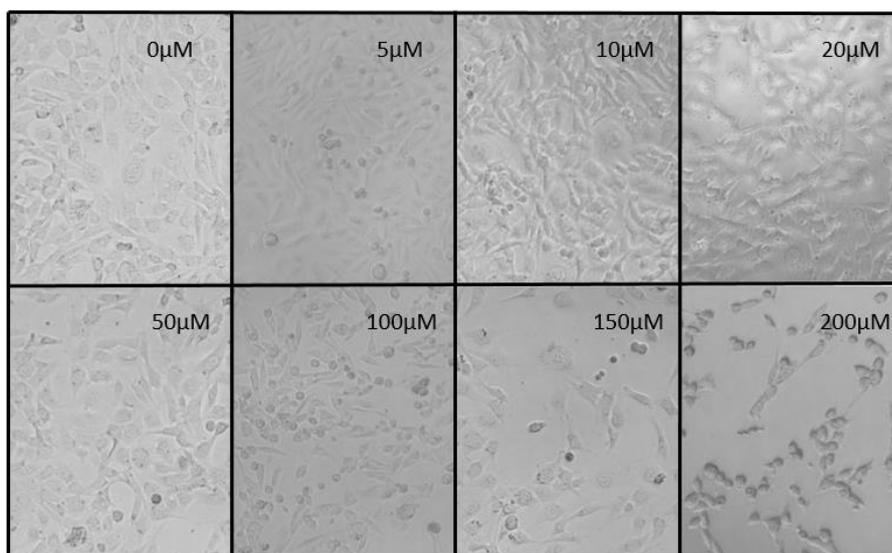


Figura 29. Citotoxicidad de la curcumina a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

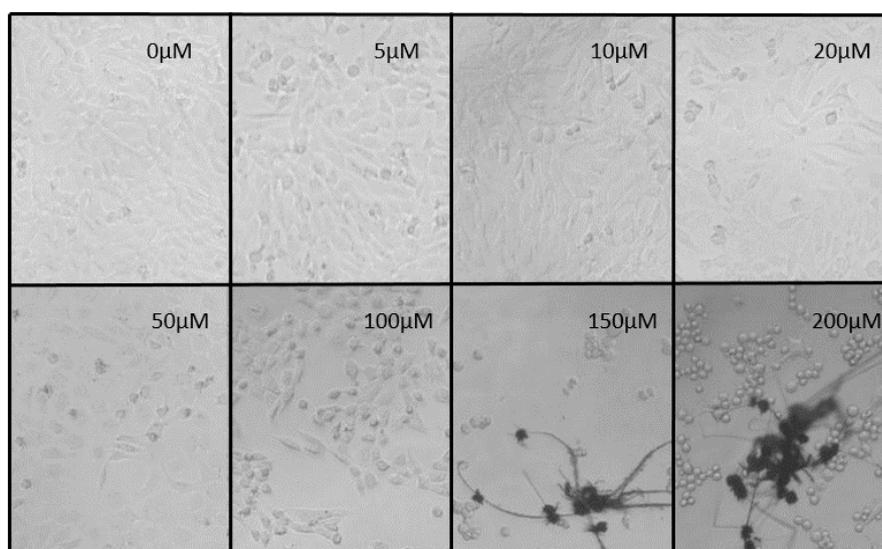


Figura 30. Citotoxicidad del compuesto **1a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

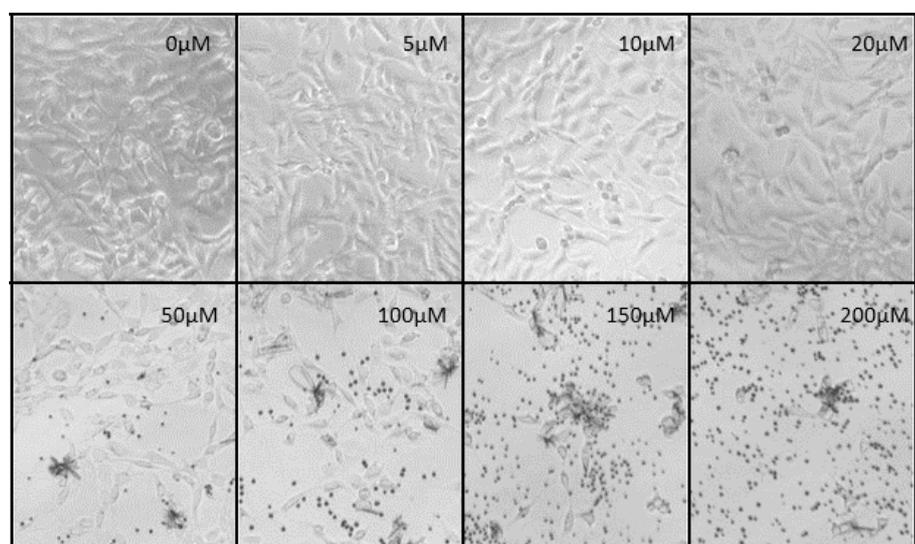


Figura 31. Citotoxicidad del compuesto **2a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

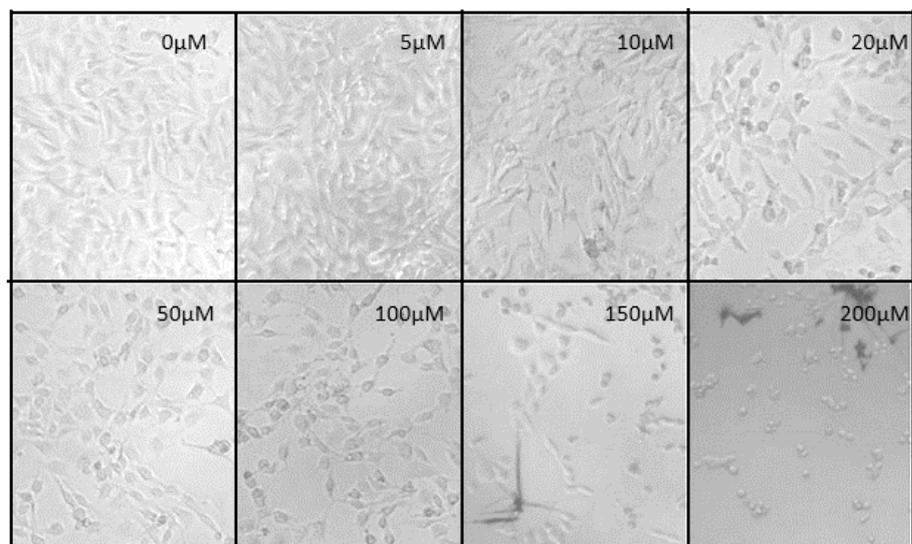


Figura 32. Citotoxicidad del compuesto **3a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. *Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.*

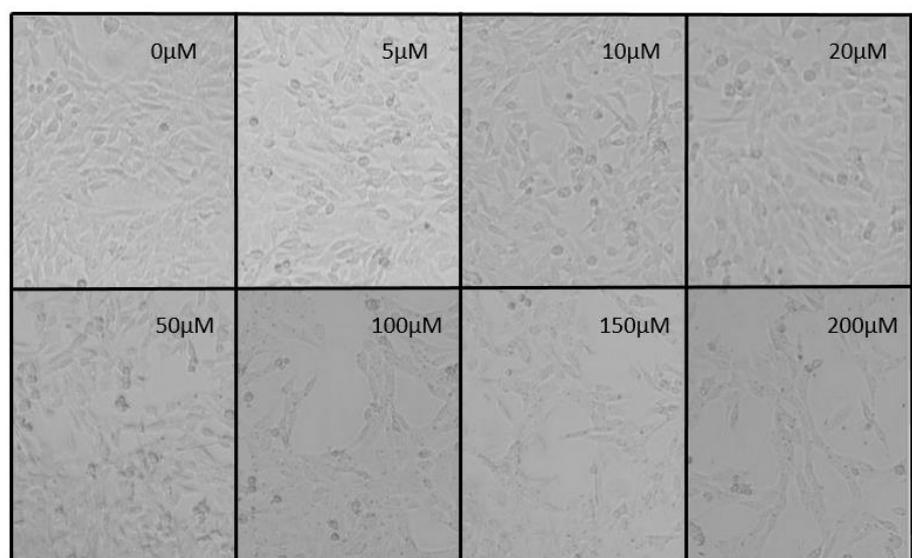


Figura 33. Citotoxicidad del compuesto **4a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. *Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.*

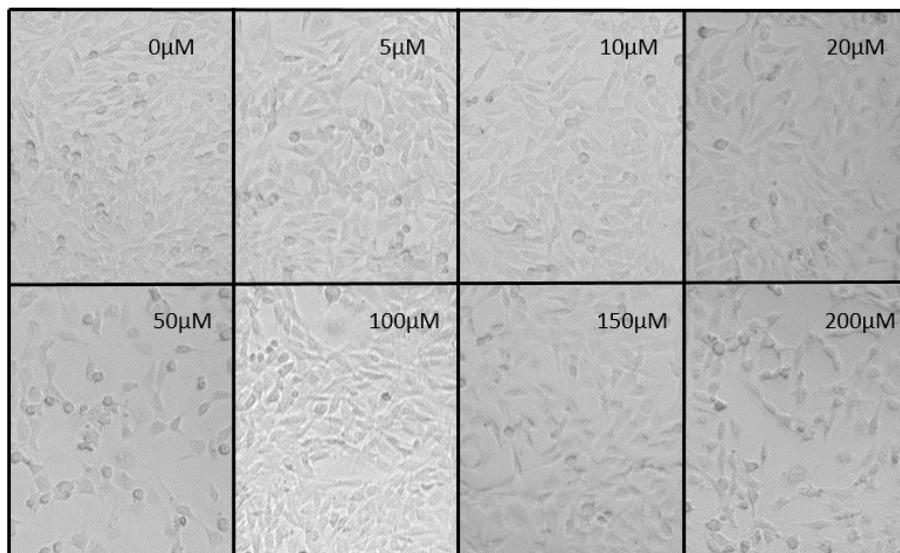


Figura 34. Citotoxicidad del compuesto **5a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

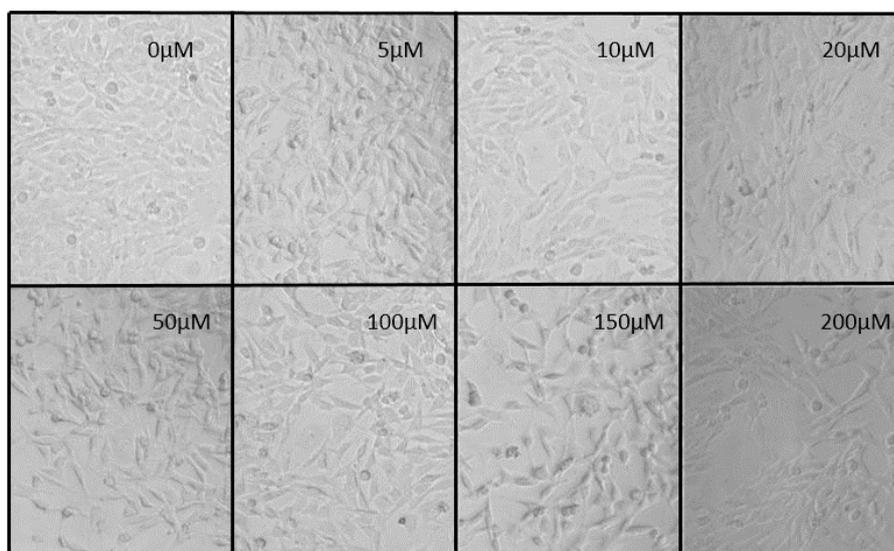


Figura 35. Citotoxicidad del compuesto **6a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

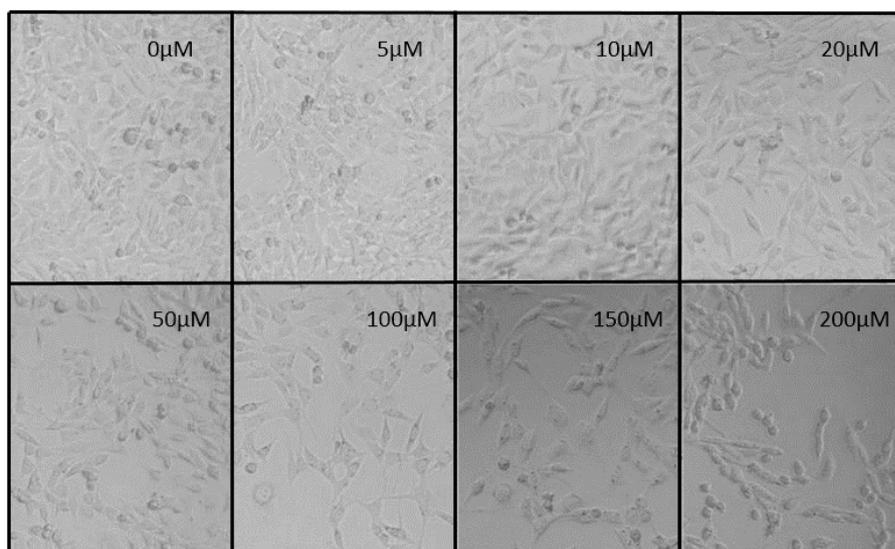


Figura 36. Citotoxicidad del compuesto **7a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

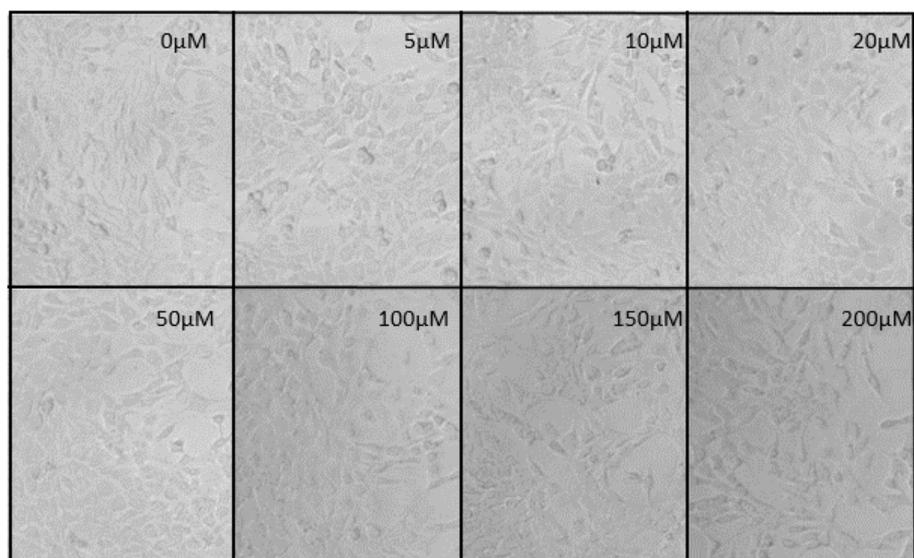


Figura 37. Citotoxicidad del compuesto **1b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

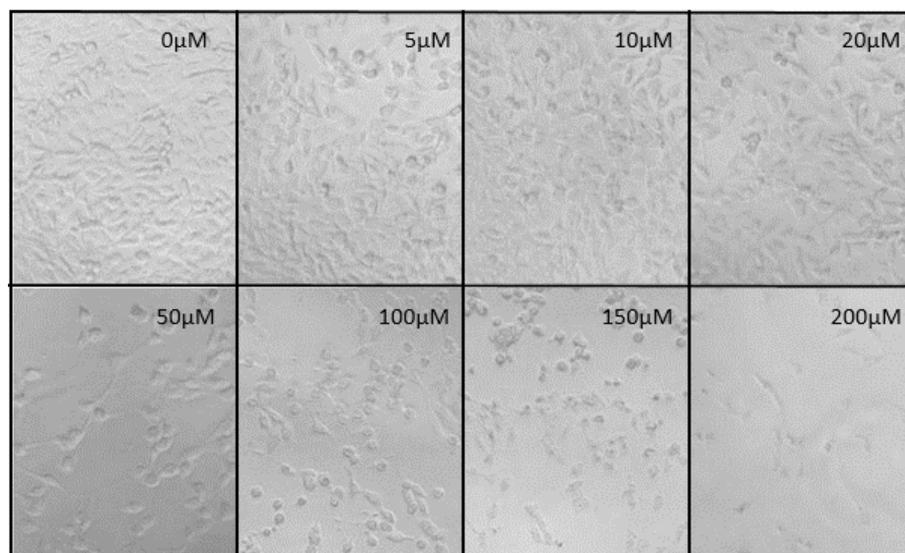


Figura 38. Citotoxicidad del compuesto **2b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

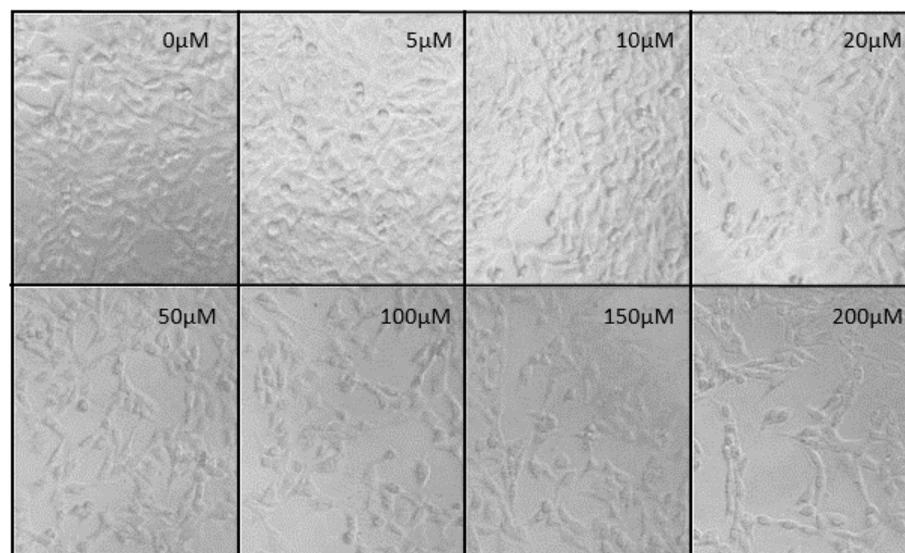


Figura 39. Citotoxicidad del compuesto **3b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

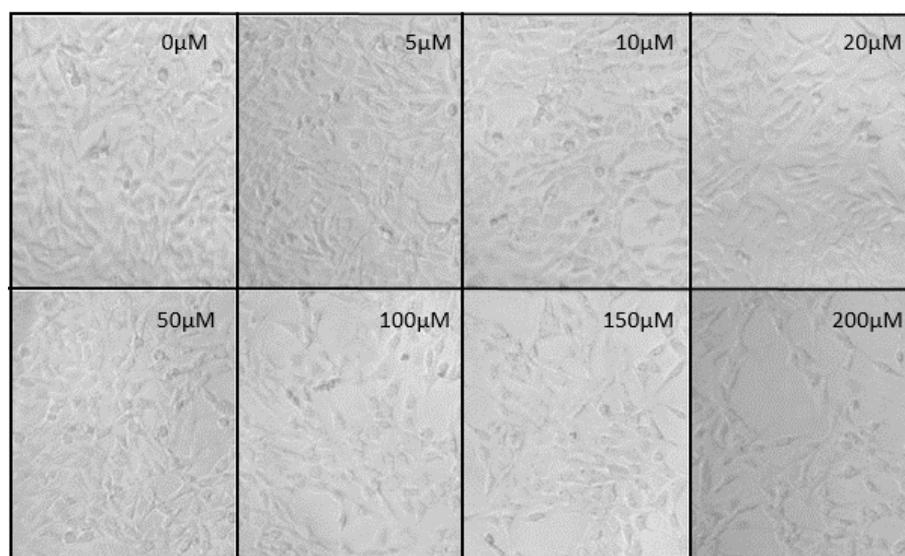


Figura 40. Citotoxicidad del compuesto **4b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

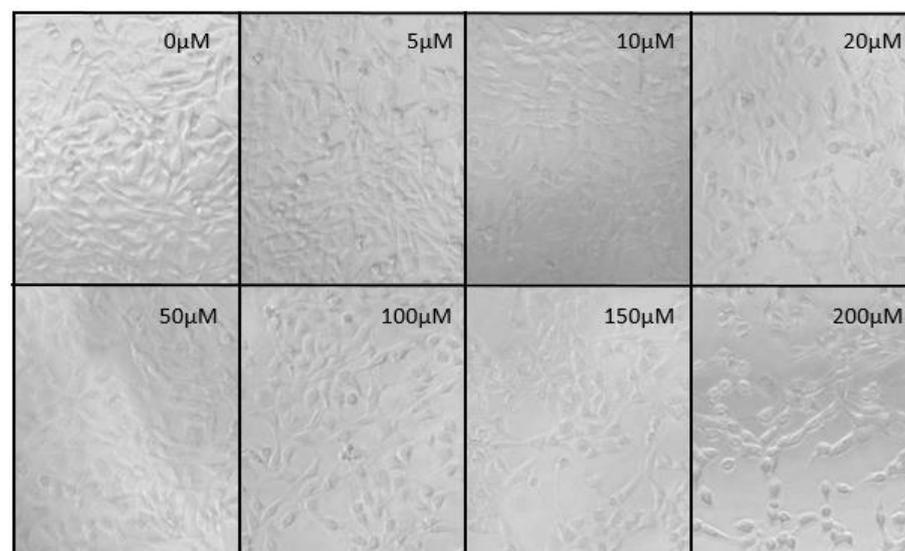


Figura 41. Citotoxicidad del compuesto **5b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

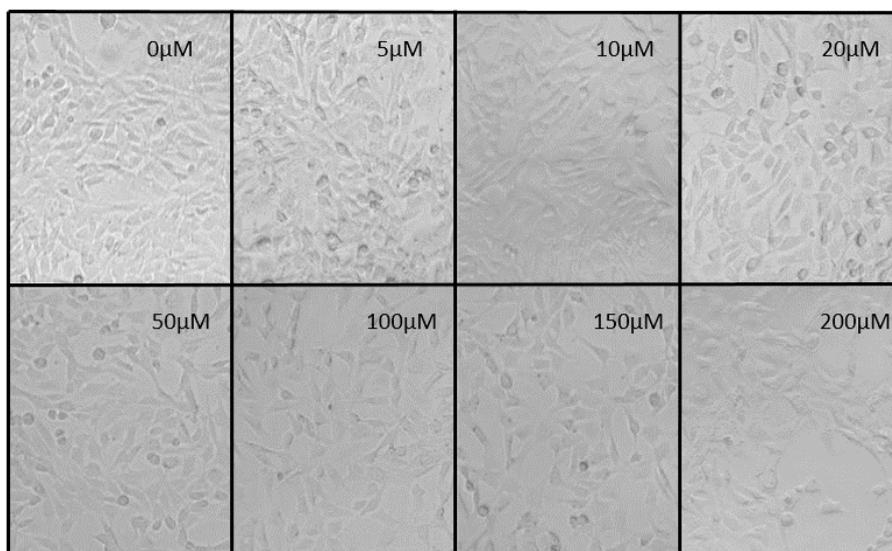


Figura 42. Citotoxicidad del compuesto **6b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x

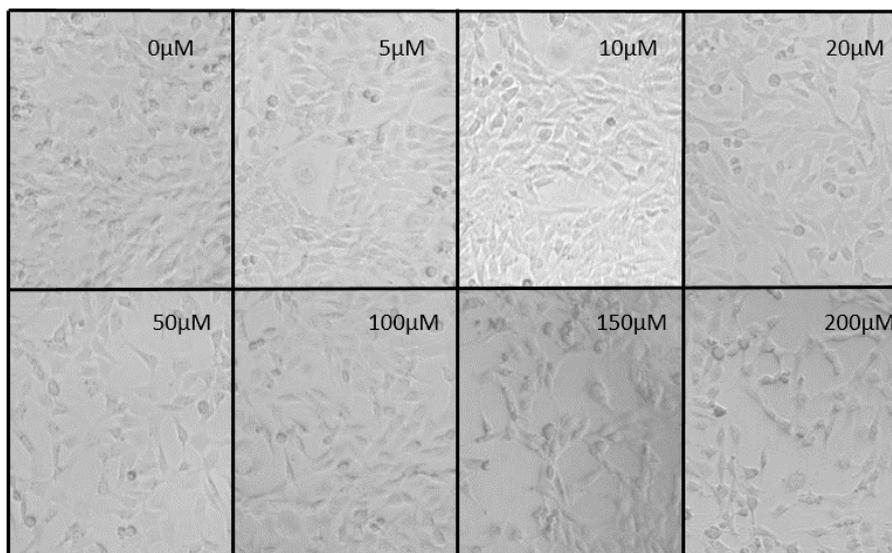


Figura 43. Citotoxicidad del compuesto **7b** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HT-22. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

IV.3.3. Determinación de la dosis letal 50 (DL50) en la línea celular HepG2.

En la tabla 11, se muestra que tanto la curcumina como la serie **a** y la serie **b** poseen una DL50 por encima de 100 μM .

Compuesto	DL50 (μM)*
Curcumina	136,0 \pm 31,77
1a	> 200
2a	> 200
3a	> 200
4a	187,7 \pm 20,53
5a	> 200
6a	> 200
7a	> 200
1b	> 200
2b	126,5 \pm 8,64
3b	184,4 \pm 14,53
4b	> 200
5b	> 200
6b	> 200
7b	> 200

Tabla 11. Citotoxicidad de la curcumina y de la serie **a** y **b** sobre la línea neuronal HepG2. Valores de DL50, definidos como la cantidad de compuesto necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50%. Los valores son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes llevados a cabo por cuadruplicado. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT.

En esta línea celular, por lo tanto, encontramos que todos los compuestos a excepción del compuesto **2b** presentan una menor citotoxicidad en comparación con la curcumina.

En las figuras 44, 45 y 46 se muestra las imágenes de microscopía electrónica donde se valora la capacidad de precipitación de los compuestos **1a**, **2a** y **3a**.

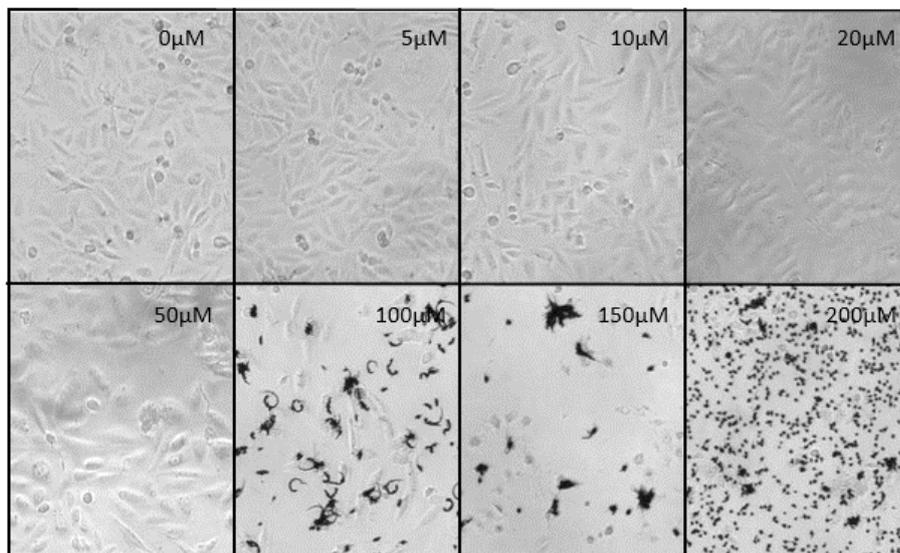


Figura 44. Citotoxicidad del compuesto **1a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HepG2. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

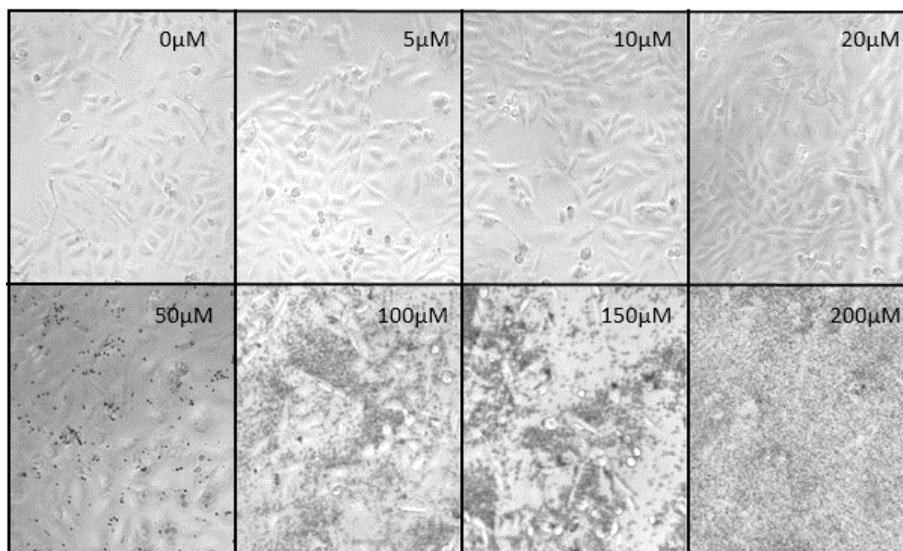


Figura 45. Citotoxicidad del compuesto **2a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HepG2. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

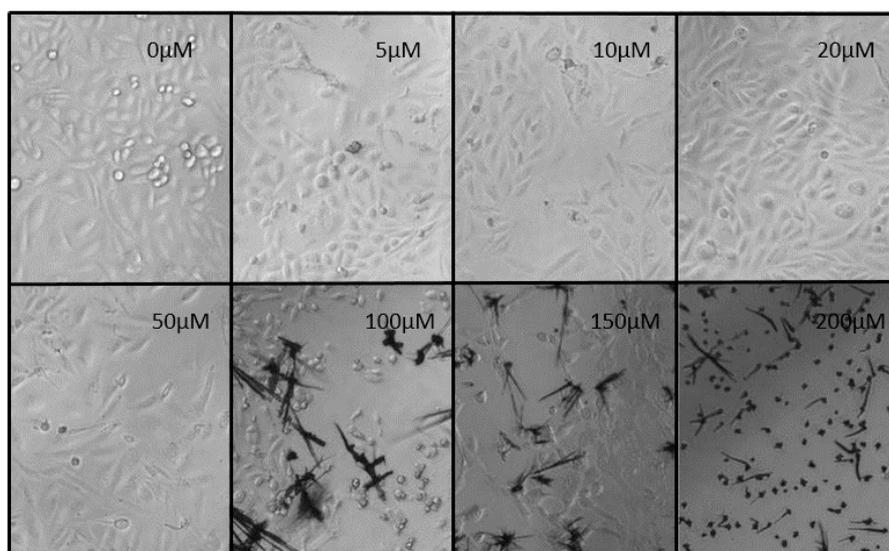


Figura 46. Citotoxicidad del compuesto **3a** a 0, 5, 10, 20, 50, 100, 150 y 200 μM sobre la línea celular HepG2. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

IV.4. Estudios de neuroprotección frente a H₂O₂.

IV.4.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50).

Para establecer la DL50, concentración a la cual hay una viabilidad del 50% se realizaron las curvas de muerte.

IV.4.1.1. Línea celular SH-SY5Y.

En cuanto a la curva de muerte de H₂O₂ sobre la línea celular SH-SY5Y en la figura 47 se muestra el ajuste correspondiente de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Habiéndose obtenido el valor de DL50 en $237 \pm 10,7 \mu\text{M}$ y estableciéndose como valor por defecto de DL50 200 μM .

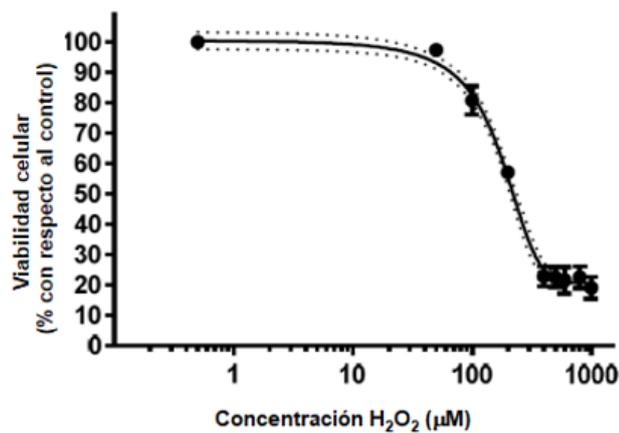


Figura 47. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de H₂O₂ tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9896$).

IV.4.1.2. Línea celular HT-22.

En referencia a los resultados obtenidos para la curva de muerte de H_2O_2 sobre la línea celular HT-22 en la figura 48 se muestra la curva obtenida con el ajuste correspondiente de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Habiéndose obtenido el valor de DL50 en $674,4 \pm 13,39 \mu M$ y estableciéndose como valor por defecto de DL50 $700 \mu M$.

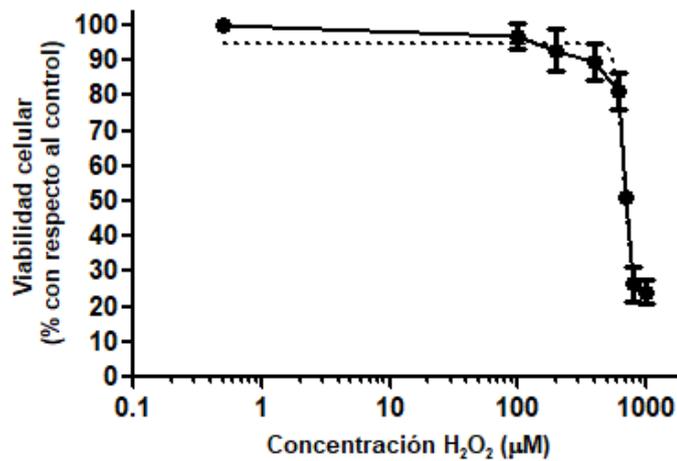


Figura 48. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de H_2O_2 tras 24h de incubación sobre las HT-22. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9511$).

IV.4.2. Neuroprotección en condiciones de EO inducido por H₂O₂.

IV.4.2.1. Línea celular SH-SY5Y.

Para estudiar el posible efecto protector frente al EO, se llevaron a cabo los ensayos de neuroprotección con las 1,3-β-dicetonas que se muestran en la tabla 12.

Compuesto	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM
Curcumina	+	+	-	-
1a	+	-	-	-
2a	-	-	-	-
3a	+	-	-	-
4a	+	-	-	-
5a	-	-	-	-
6a	+	+	-	-
7a	+	+	-	-
1b	+	+	-	-
2b	-	-	-	-
3b	+	+	-	-
4b	+	+	-	-
5b	-	-	-	-
6b	+	+	+	+
7b	+	+	+	+

Tabla 12. Actividad neuroprotectora en la línea neural SH-SY5Y bajo condiciones de estrés oxidativo (H₂O₂ 200 μM). La viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo de MTT.

Los resultados apuntan que tras la adición de H₂O₂ 200 μM la mayoría de los derivados presentan actividad neuroprotectora a concentraciones de 5 μM y 10 μM, a excepción de los compuestos **2a**, **5a** y **2b**, **5b**. Además se puede observar que los derivados más prometedores eran **6b** y **7b**, ya que muestran neuroprotección tanto a 5 μM como en 10 μM y también a concentraciones más altas de 20 μM y 40 μM.

Los ensayos de neuroprotección frente a H_2O_2 200 μM ampliando el rango de concentración utilizado con los compuestos **6b** y **7b** (0, 5, 10, 20, 40 y 50 μM) se muestran en la figura 49.

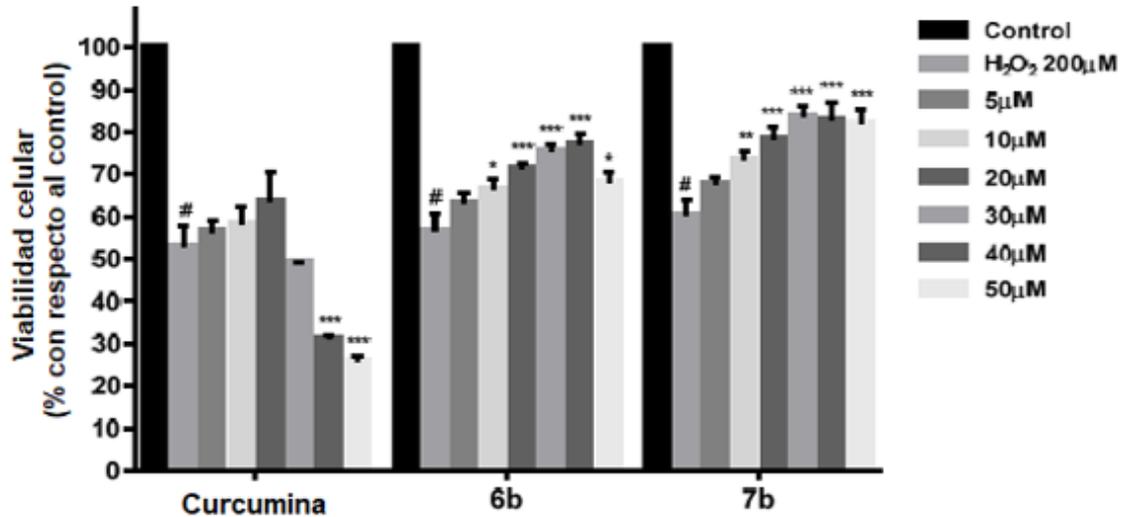


Figura 49. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por H_2O_2 en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h, tras lo cual se trataron la células con 200 μM de H_2O_2 durante 24h. Los datos representados son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. [#] $p < 0.001$ control con H_2O_2 200 μM . ^{*} $p > 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y con H_2O_2 200 μM .

Los resultados indican que el pretratamiento con **6b** y **7b** en todas las concentraciones ensayadas mejoran la viabilidad celular con respecto a las células tratadas con H_2O_2 200 μM , teniendo **7b** el mejor perfil de inhibición de muerte celular a 10 μM ($p < 0.01$), 20 μM , 30 μM , 40 μM y 50 μM ($p < 0.001$).

Los resultados sobre el efecto de protección de los compuestos **6b** y **7b** para evitar la muerte celular inducida por H_2O_2 200 μM se expresan en la figura 50. Se determinó la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio celular y como se muestra, tanto **6b** como **7b** redujeron la producción de LDH en todas las concentraciones probadas, siendo este efecto más significativo a 30 μM , 40 μM ($p < 0.01$) y 50 μM ($p < 0.001$).

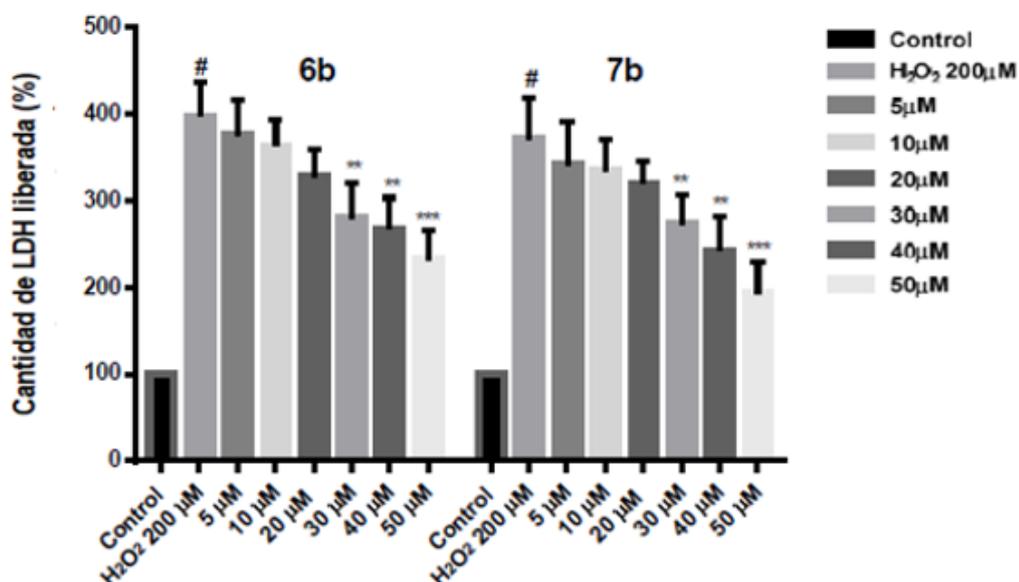


Figura 50. Efecto neuroprotector de **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por H_2O_2 en la línea celular SH-SY5Y expresado como la cantidad de LDH liberada. La viabilidad celular fue determinada mediante la cantidad de LDH liberada. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h, tras lo cual se trataron la células con 200 μM de peróxido durante 24h. Los datos representados son la media \pm DS de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 200 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y con H_2O_2 200 μM .

Los ensayos de viabilidad celular se muestran a continuación en las siguientes imágenes. Se compara la neuroprotección frente a peróxido 200 μM de los compuestos **6b** y **7b** frente al efecto de la curcumina. Las figuras 51, 52 y 53 evidencian como la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, al disminuir la viabilidad celular.

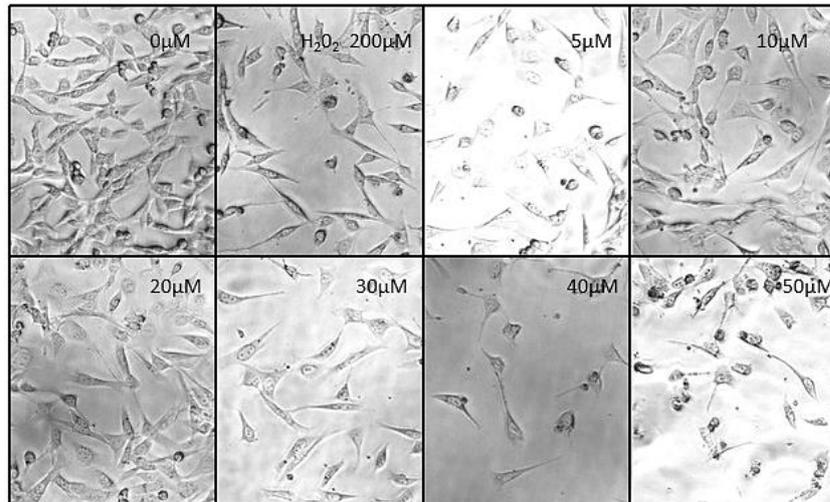


Figura 51. Protección de la curcumina frente a H_2O_2 200 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con H_2O_2 200 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

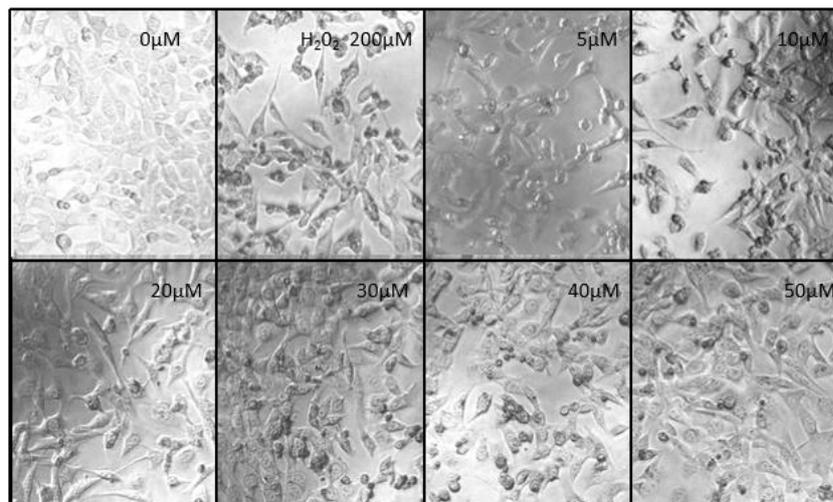


Figura 52. Protección del compuesto **6b** frente a H_2O_2 200 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con H_2O_2 200 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

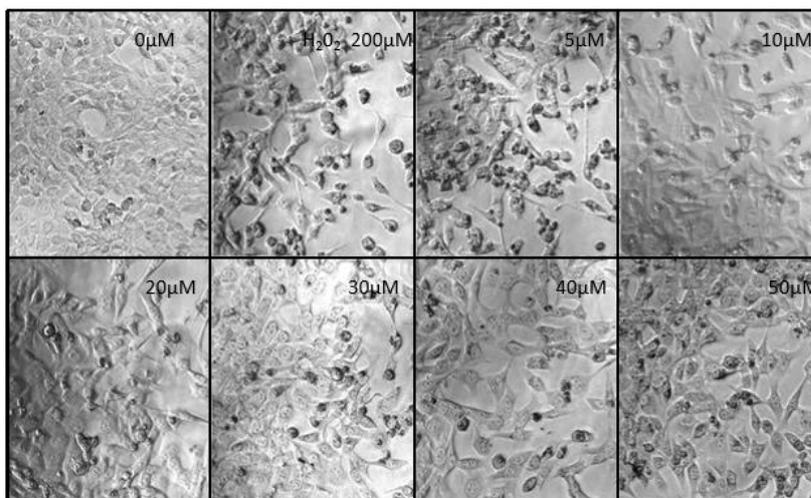


Figura 53. Protección del compuesto **7b** frente a H₂O₂ 200 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con H₂O₂ 200μM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

IV.4.2.2. Línea celular HT-22.

La figura 54 muestra los resultados de neuroprotección realizados tras la someter a las células a un EO inducido por H₂O₂ 700 μM. Observándose que el pretratamiento con **6b** y **7b** en todas las concentraciones ensayadas mantiene constante la viabilidad celular en comparación con la curcumina.

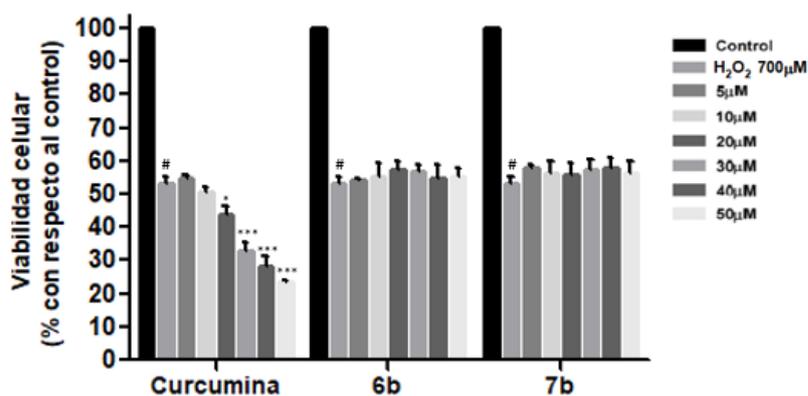


Figura 54. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por H₂O₂ en la línea celular HT-22. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 700 μM de H₂O₂ durante 24h. Los datos representados son la media ± DS de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. [#]p<0.001 control con H₂O₂ 700 μM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 células células tratadas con el compuesto y con H₂O₂ 700 μM.

En las siguientes figuras (55, 56 y 57) se muestran las imágenes de microscopio de los ensayos de neuroprotección frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno 700 μM para los compuestos **6b**, **7b** comparados con la curcumina. En ellas se puede observar que la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, sobre las células HT-22.

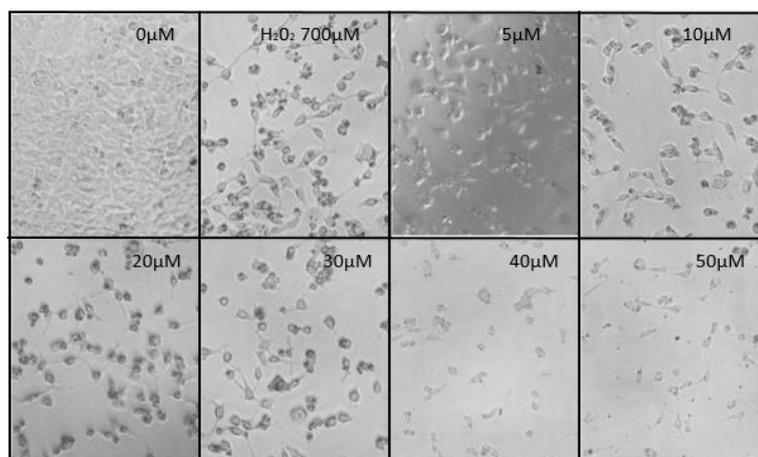


Figura 55. Protección de la curcumina frente a H_2O_2 700 μM en la línea celular HT-22. 0, control con H_2O_2 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

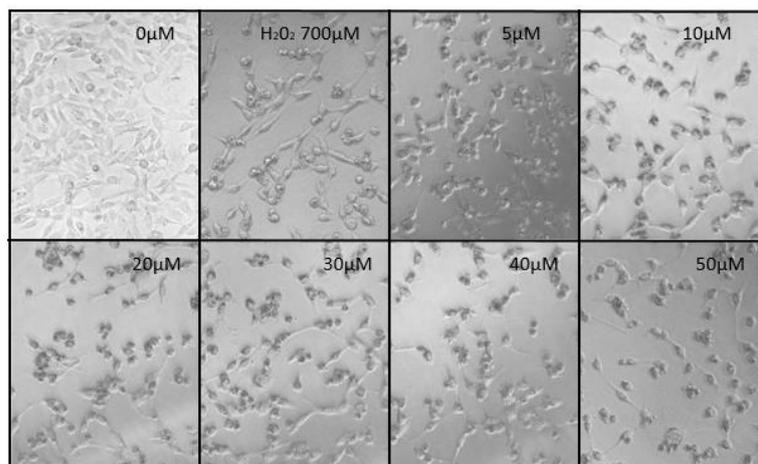


Figura 56. Protección del compuesto **6b** frente a H_2O_2 700 μM en la línea celular HT-22. 0, control con H_2O_2 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

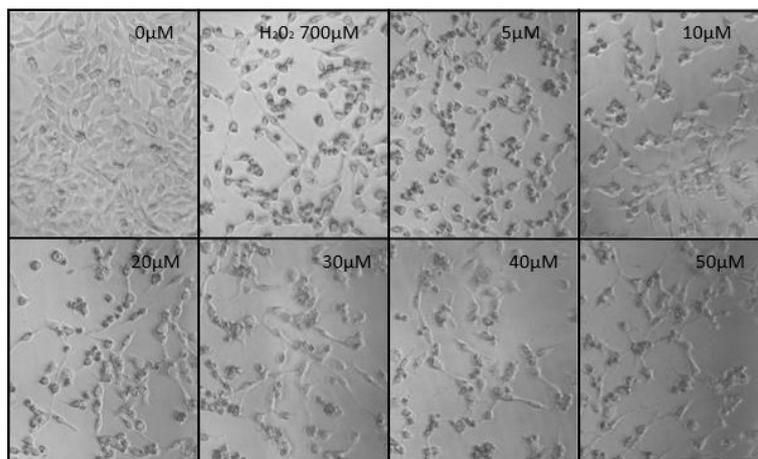


Figura 57. Protección del compuesto **7b** frente a H_2O_2 700 μM en la línea celular HT-22. 0, control con H_2O_2 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

IV.5. Ensayos para la determinación de la solubilidad y estabilidad.

Entre los parámetros fisicoquímicos más importantes en el descubrimiento de fármacos, la solubilidad y la estabilidad química en medios acuosos son determinantes a la hora de caracterizar la biodisponibilidad de un fármaco. Teniendo en cuenta que las β -dicetonas **6b** y **7b** eran las que mejor perfil AOX poseían y presentaban menor citotoxicidad, se determinó su solubilidad y estabilidad, ya que como hemos comentado anteriormente son parámetros fundamentales. Para determinar la solubilidad de estas moléculas en medio acuoso (PBS) se siguió el procedimiento descrito por Hoelke y col.¹⁸²

La solubilidad máxima lograda para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina disueltas en PBS 10 mM se muestran en la tabla 13, en la que se observa que tanto **6b** como **7b** poseen una solubilidad mucho que la curcumina.

Compuesto	Solubilidad (µg/ml)
Curcumina	24,0 ± 3,0
6b	281,0 ± 9,0
7b	298,2 ± 7,0

* Valores representados: media ± desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

Tabla 13. Solubilidad máxima de la curcumina y de los compuestos **6b** y **7b** en PBS 10mM. Los valores son la media ± la desviación estándar de dos experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado.

Para conocer la integridad del compuesto, se determinó la estabilidad química en medio acuoso (PBS 10 mM) tras 6, 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos para los compuestos **6b**, **7b** (a 400 µM) y curcumina (a 50 µM) se muestran en la tabla 14, en la que podemos observar que tanto **6b** como **7b** son más estables comparados con la curcumina, ya que poseen una concentración constante con respecto al tiempo.

Compuesto	Cantidad de compuesto restante (%)			
	0h	6h	24h	48h
Curcumina	100	55,9 ± 10,6	42,9 ± 9,0	38,1 ± 7,4
6b	100	96,1 ± 0,5	92,2 ± 1,6	90,4 ± 3,0
7b	100	95,7 ± 1,0	90,9 ± 1,2	87,8 ± 2,3

* Valores representados: media ± desviación estándar de dos experimentos realizados por triplicado.

Tabla 14. Estabilidad de la curcumina y de los compuestos **6b** y **7b** en PBS 10mM. Los valores son la media ± la desviación estándar de dos experimentos diferentes llevados a cabo por triplicado.

A la vista de los resultados se evidencia que los derivados **6b** y **7b** poseen una mejor solubilidad y estabilidad en solución acuosa tamponada (PBS 10 mM) que la curcumina, lo que refuerza las propiedades drug-like de la serie química de las β-dicetonas.

IV.6. Determinación de la capacidad de quelación de hierro.

Como es conocido el el hierro promueve la producción de ROS al reaccionar con peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton para para producir el radical hidroxilo (OH^\cdot), que es altamente tóxico.^{183,184,185}

Por lo que determinamos la capacidad que poseen nuestros compuestos de quelar el Fe^{2+} y evitar así esta reacción. Se determinó la capacidad de quelación sobre el Fe^{2+} a 50 μM y 200 μM . En la figura 58A se muestran los resultados obtenidos de las muestras disueltas en agua, mientras que la figura 58B se muestran los resultados obtenidos de las muestras disueltas en metanol y agua en proporción 1:1, en ambos experimentos se usó como control el EDTA.

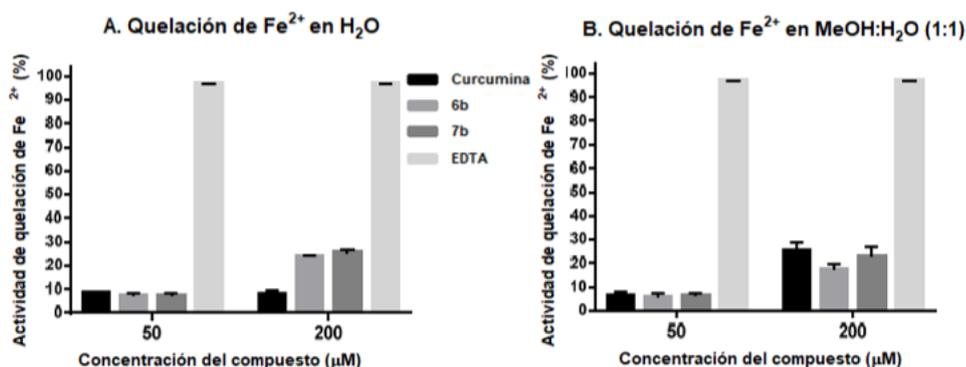


Figura 58. Determinación de la capacidad de quelación sobre el Fe^{2+} . En la gráfica A se muestran los resultados de los compuestos disueltos en agua. En la gráfica B se muestran los resultados de los compuestos disueltos en agua y metanol en proporción 1:1. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado, mostrando un $p < 0,001$.

Estos resultados evidencian que en solución acuosa (figura 58A) los compuestos **6b** y **7b** a baja concentración (50 μM), muestran una capacidad de unión al Fe^{2+} similar a la de curcumina (aproximadamente un 8%), mientras que a concentraciones altas (200 μM) su capacidad de quelación (25- 26%) es más alto que el de la curcumina en disolución acuosa (figura 58A). En cuanto al ensayo con MeOH: H₂O (1:1), (figura 58B), se observa que los tres compuestos muestran un patrón de unión a Fe^{2+} similar tanto a 50 μM como a 200 μM . Además los resultados indican que la curcumina a 200 μM tiene una capacidad de quelación similar a la descrita en la literatura.

IV.7. Estudios de neuroprotección frente a los inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

IV.7.1. Determinación de la dosis letal 50 (DL50).

Para establecer la DL50, concentración a la cual hay una viabilidad del 50% se realizaron las curvas de muerte.

IV.7.1.1. Línea celular SH-SY5Y.

Con respecto al resultado obtenido para rotenona, en la figura 59 se muestra la curva de muerte con el ajuste correspondiente de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Habiéndose obtenido el valor de DL50 en $10,84 \pm 1,04 \mu\text{M}$ y estableciéndose como valor por defecto de DL50 $10 \mu\text{M}$ para todos los experimentos posteriores de protección como agente inductor de EO.

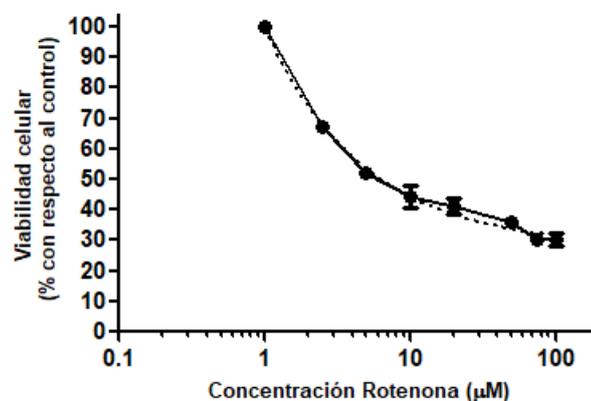


Figura 59. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μM) de rotenona tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9890$).

En cuanto a la curva de muerte de rotenona/oligomicina en la figura 60 se muestra la curva con el ajuste correspondiente.

Se obtuvo el valor de DL50 en $5,797:0,89 \pm 0,96:0,12 \mu\text{M}$ y estableciéndose como valor por defecto de DL50 $5:1 \mu\text{M}$ para todos los experimentos posteriores de protección como agente inductor de EO.

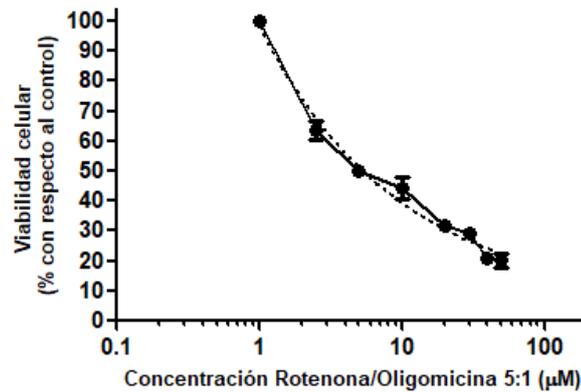


Figura 60. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, µM) de rotenona/oligomicina en proporción 5:1 tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media ± la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9849$).

En referencia a la curva de muerte de MPP⁺ al realizarse el ajuste correspondiente tal y como se muestra en la figura 61 se obtuvo el valor de DL50 en $656,0 \pm 87,12$ µM y estableciéndose como valor por defecto de DL50 700 µM para los experimentos posteriores.

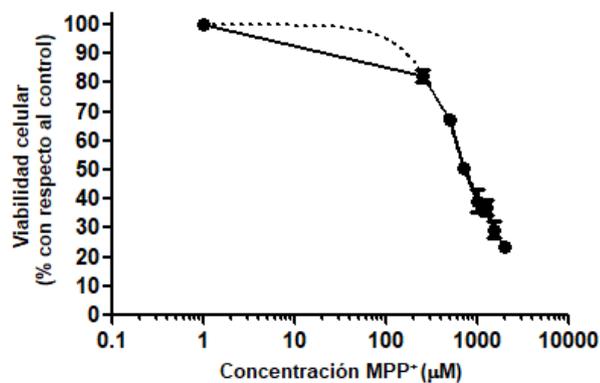


Figura 61. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, µM) de MPP⁺ tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media ± la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9802$).

En cuanto a la curva de muerte de la 6-hidroxidopamina en la figura 62 se muestra el ajuste correspondiente de la curva en el cual se obtuvo como valor de DL50 en $275,20 \pm 16,8$ µM, estableciéndose como valor por defecto de DL50 250 µM para los experimentos posteriores.

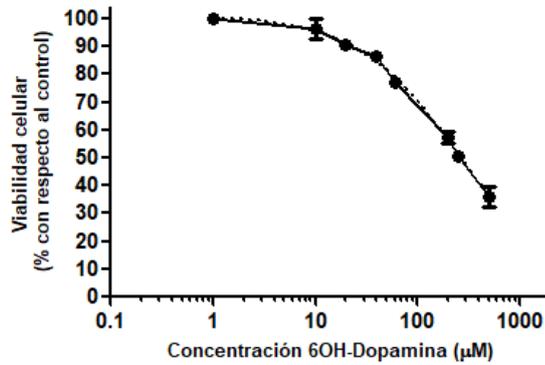


Figura 62. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, µM) de 6-hidroxi-dopamina tras 24h de incubación sobre las SH-SY5Y. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media ± la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9899$).

IV.7.1.2. Línea celular HT-22.

Con respecto al resultado obtenido para el experimento de rotenona/oligomicina sobre la línea celular HT-22 en la figura 63 se muestra la curva obtenida con el ajuste correspondiente. Obteniéndose como valor de DL50 en $14,98:0,95 \pm 4,03:0,03 \mu\text{M}$ y estableciéndose como valor por defecto de DL50 10:1 µM.

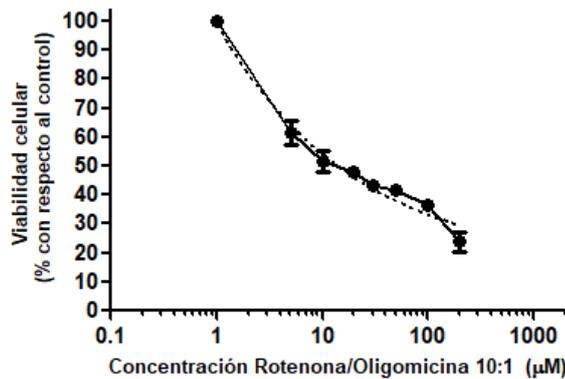


Figura 63. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, µM) de rotenona/oligomicina en proporción 10:1 tras 24h de incubación sobre las HT-22. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media ± la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9702$).

IV.7.2. Neuroprotección frente inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

IV.7.2.1. Línea celular SH-SY5Y.

Neuroprotección frente a rotenona.

La figura 64 muestra los resultados de neuroprotección obtenidos para la línea celular SH-SY5Y tras la adición de rotenona 5 μ M para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina en comparación con las células control. En ella se observa que el pretratamiento tanto con **6b** como **7b** a las concentraciones de 10 μ M, 20 μ M y 40 μ M la viabilidad celular con respecto a las células tratadas con rotenona 5 μ M, viéndose mayor protección en ambos compuestos a 20 μ M en comparación con curcumina.

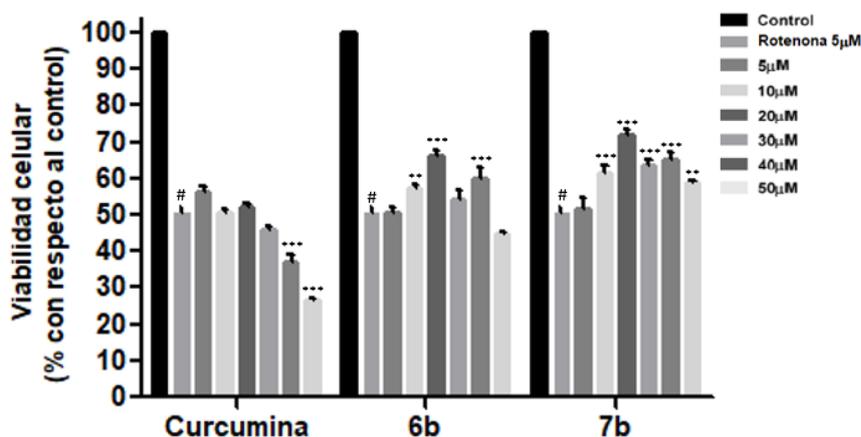


Figura 64. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por rotenona en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 5 μ M de rotenona durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con rotenona 5 μ M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y con rotenona 5 μ M.

En las siguientes figuras (65, 66 y 67) se muestran las imágenes de los ensayos de neuroprotección frente a rotenona 5 μM para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina.

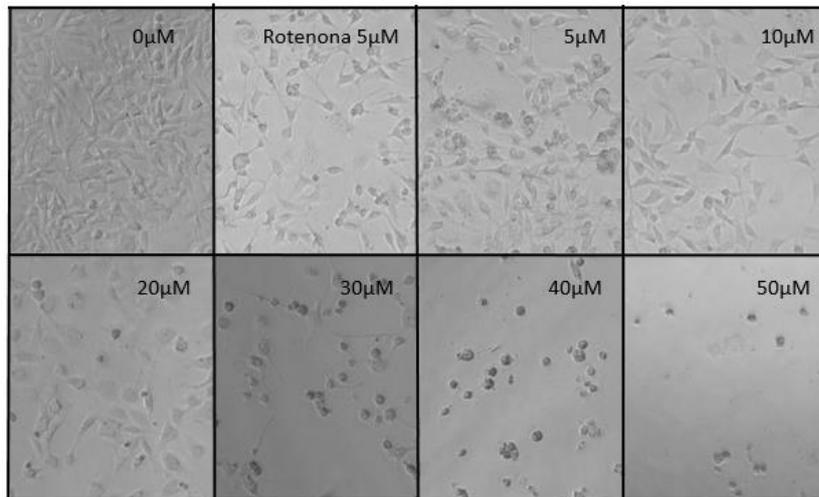


Figura 65. Experimento de protección de la curcumina frente a rotenona 5 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona 5 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

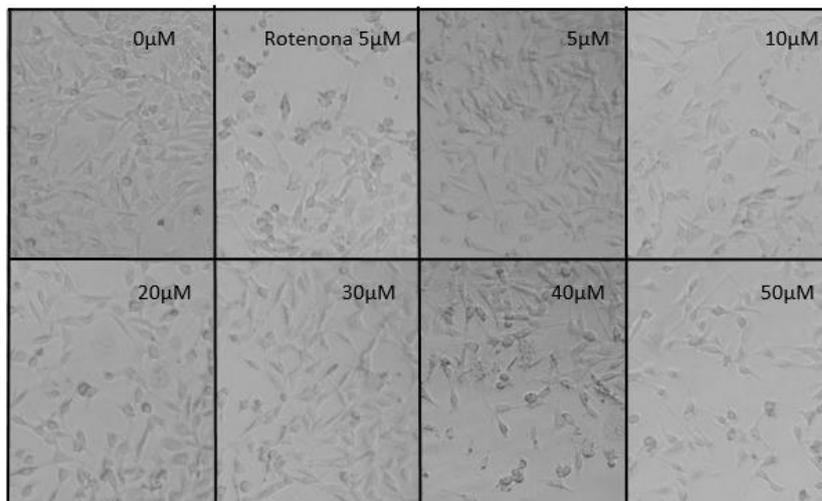


Figura 66. Experimento de protección del compuesto **6b** frente a rotenona 5 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona 5 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

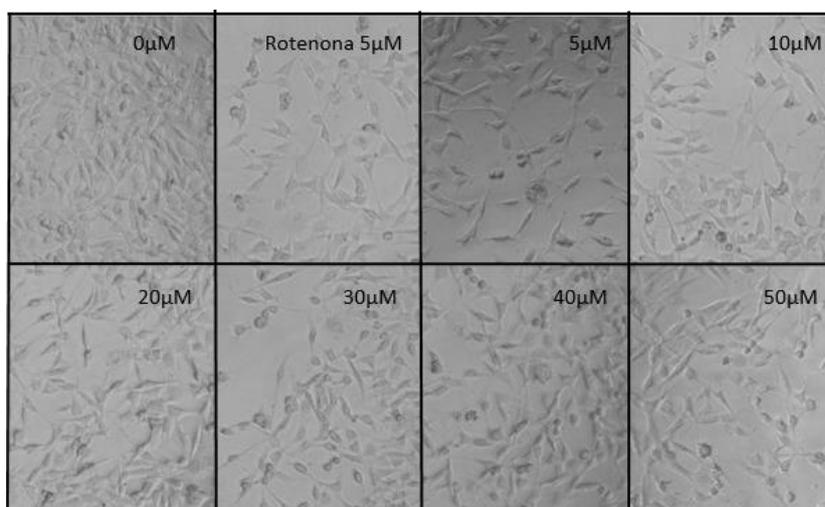


Figura 67. Experimento de protección del compuesto **7b** frente a rotenona 5 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona 5 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

En las imágenes se puede observar como la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, ya que se disminuye la viabilidad celular.

Neuroprotección frente a rotenona/oligomicina.

La figura 68 muestra los resultados de neuroprotección obtenidos para la línea celular SH-SY5Y tras la adición de rotenona/oligomicina 5:1 μM para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina en comparación con las células control. En ella podemos observar que el pretratamiento con **6b** y **7b** en todas las concentraciones ensayadas mantiene la viabilidad celular en comparación con la curcumina y que el compuesto **7b** mejora la viabilidad celular a 10 μM y 20 μM con respecto a las células tratadas con rotenona/oligomicina 5:1 μM y en comparación con la curcumina, viéndose una mayor protección a 20 μM .

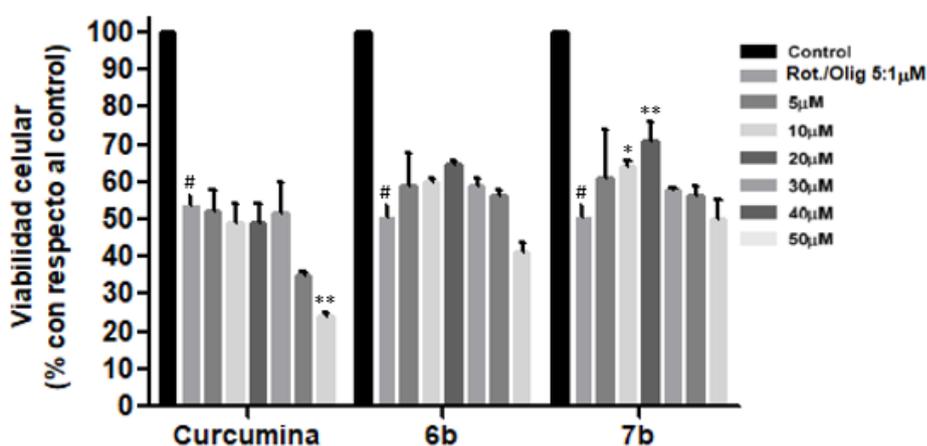


Figura 68. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por rotenona/oligomicina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 5:1 μM de rotenona/oligomicina durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con rotenona/oligomicina 5: 1 μM * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y con rotenona/oligomicina 5: 1 μM .

En las siguientes figuras 69, 70 y 71 se muestran las imágenes de microscopía correspondientes a los experimentos de neuroprotección frente a rotenona/oligomericina.

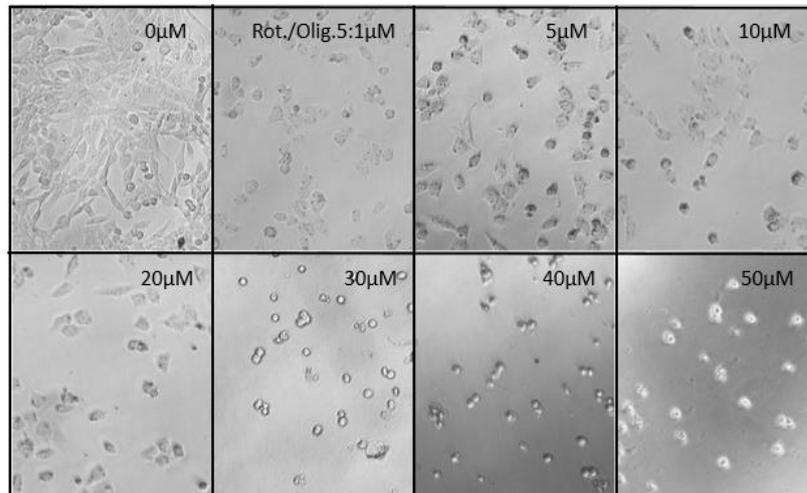


Figura 69. Experimento de protección de la curcumina frente a rotenona/oligomericina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona/oligomericina 5:1 μM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

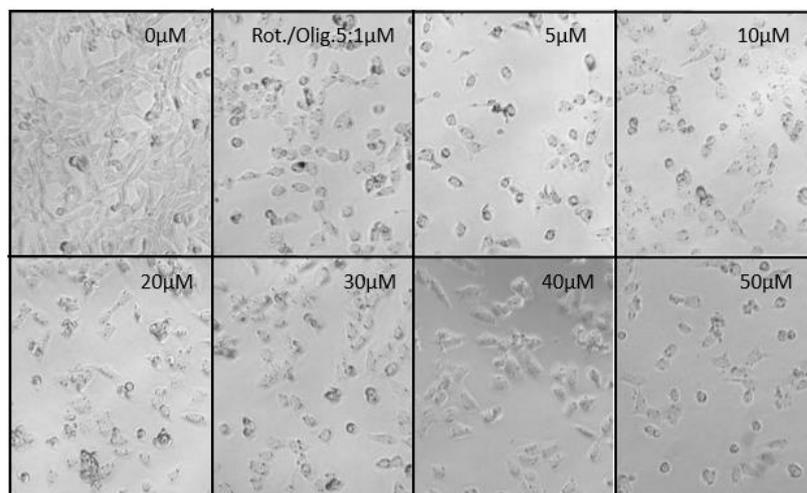


Figura 70. Experimento de protección del compuesto **6b** frente a rotenona/oligomericina 5:1 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona/oligomericina 5:1 μM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

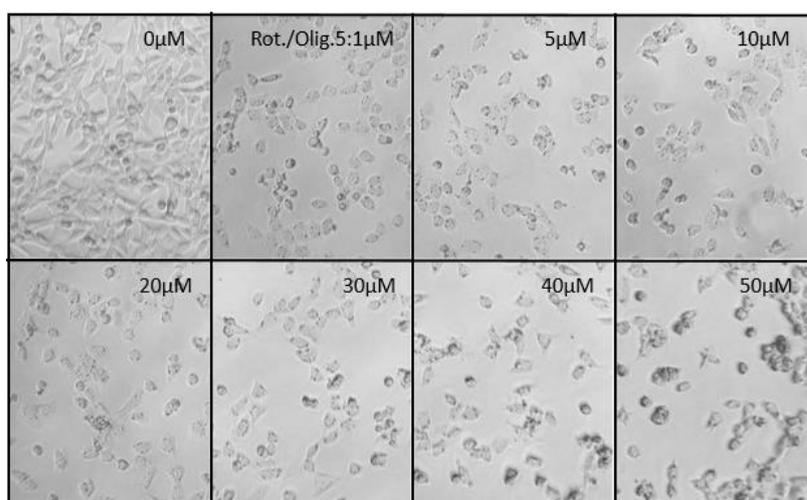


Figura 71. Experimento de protección del compuesto **7b** frente a rotenona/oligomicina 5:1 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con rotenona/oligomicina 5:1 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

En las imágenes se observa que los compuestos **6b** y **7b** tienen mayor habilidad de protección para mantener la viabilidad celular que cuando se utiliza curcumina.

Neuroprotección frente a MPP⁺.

La figura 72 muestra los resultados de neuroprotección obtenidos para la línea celular SH-SY5Y tras la adición de MPP⁺ a 700 μ M. En ella se observa que el pretratamiento con **6b** a 20 μ M mejora significativamente la viabilidad celular en comparación con MPP⁺ 700 μ M. Y en el caso del compuesto **7b** esta mejora se ve a concentraciones de 10 μ M y 20 μ M.

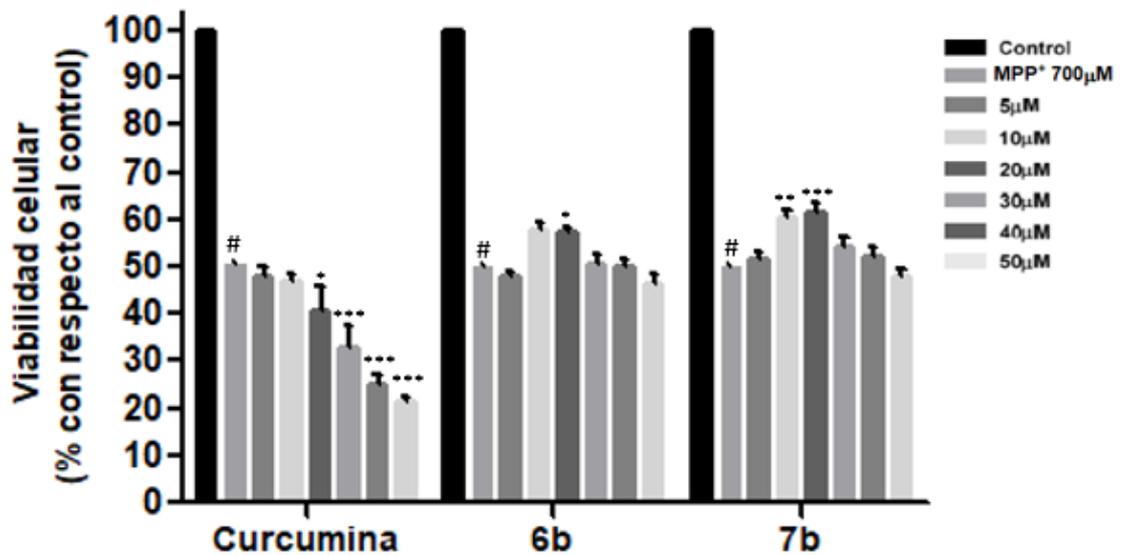


Figura 72. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por MPP⁺ 700 μ M en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con MPP⁺ 700 μ M durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # p <0.001 control con MPP⁺ 700 μ M. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 células tratadas con el compuesto y con MPP⁺ 700 μ M.

En las siguientes figuras (73, 74 y 75) se muestran las imágenes de los ensayos de neuroprotección frente a MPP⁺ 700 μ M para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina. Se puede observar como la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, ya que se disminuye la viabilidad celular.

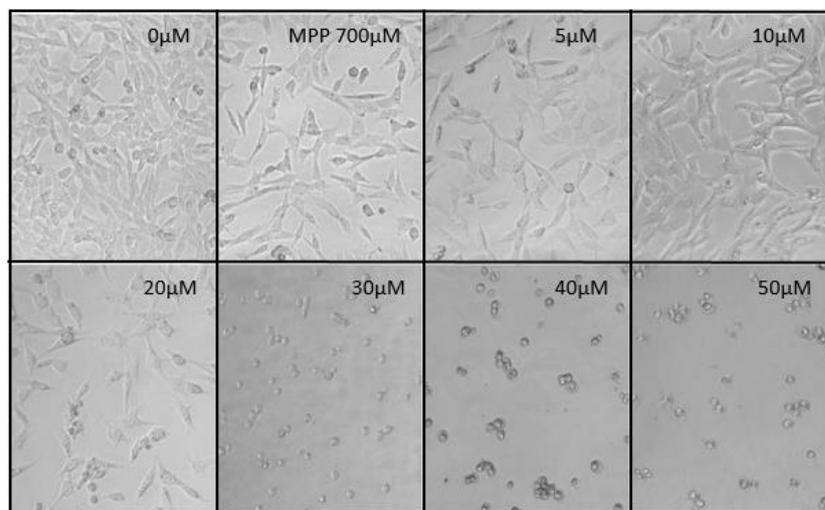


Figura 73. Experimento de protección de la curcumina frente a MPP⁺ 700 μ M en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con MPP⁺ 700 μ M, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

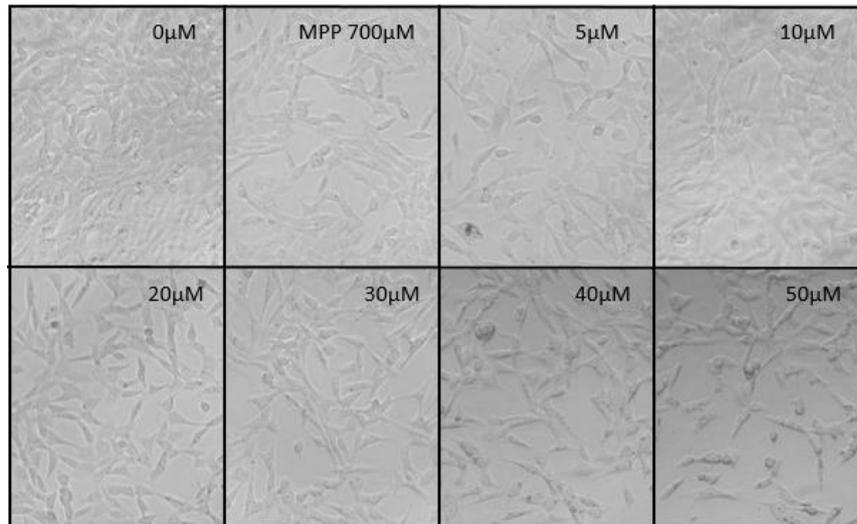


Figura 74. Experimento de protección del compuesto **6b** frente a MPP^+ 700 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con MPP^+ 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

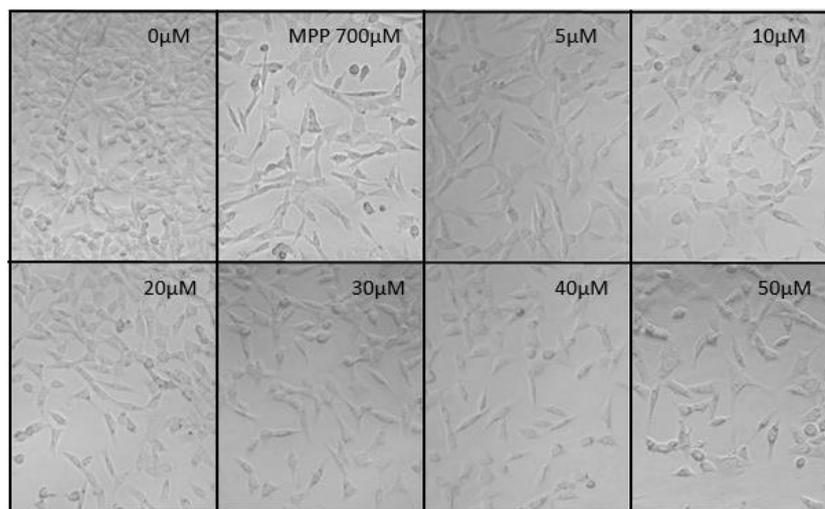


Figura 75. Experimento de protección del compuesto **7b** frente a MPP^+ 700 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con MPP^+ 700 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM . Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

Neuroprotección frente a 6-hidroxidopamina.

La figura 76 muestra los resultados de neuroprotección obtenidos frente a a 250 μM de 6-hidroxidopamina. En ella se observa que el pretratamiento únicamente el pretratamiento con **7b** a 20 μM mejora significativamente la viabilidad celular en comparación con 6-hidroxidopamina 250 μM .

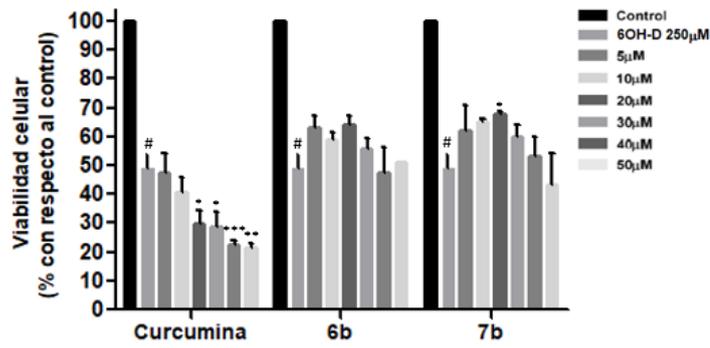


Figura 76. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por 6-hidroxiopamina 250 μM en la línea celular SH-SY5Y. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con 6-hidroxiopamina 250 μM durante 24h. Los datos representados son la media ± la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. #p<0.001 control con 6-hidroxiopamina 250 μM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 células tratadas con el compuesto y con 6-hidroxiopamina 250 μM.

En las siguientes figuras 77, 78 y 79 se muestran las imágenes de los ensayos de neuroprotección frente a 6-hidroxiopamina 250 μM para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina.

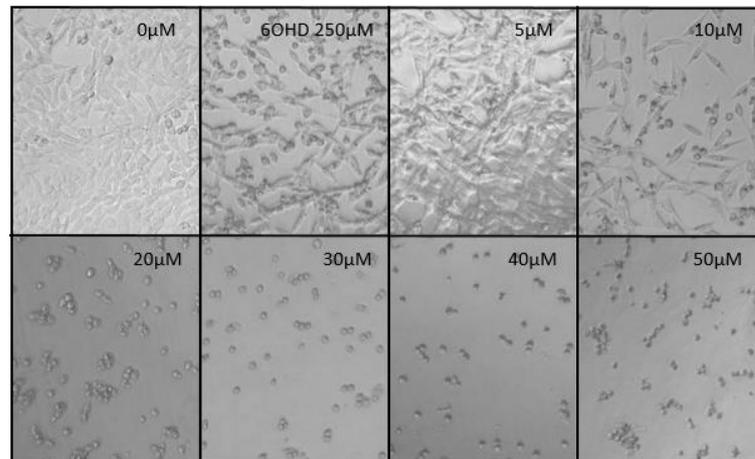


Figura 77. Experimento de protección de la curcumina frente a 6-hidroxiopamina 250 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con 6-hidroxiopamina 250 μM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM de curcumina. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

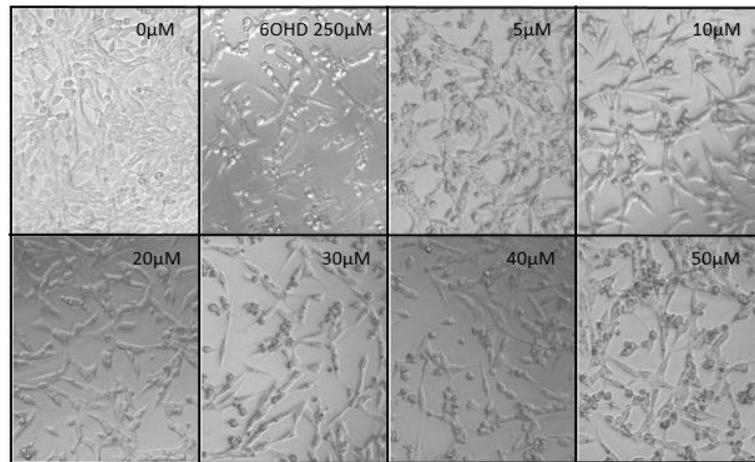


Figura 78. Experimento de protección del compuesto **6b** frente a 6-hidroxidopamina 250 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con 6-hidroxidopamina 250 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM de curcumina. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

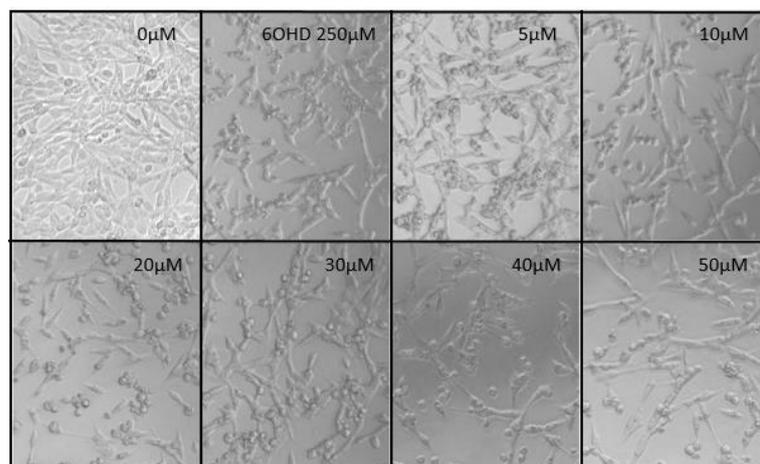


Figura 79. Experimento de protección del compuesto **7b** frente a 6-hidroxidopamina 250 μM en la línea celular SH-SY5Y. 0, control con 6-hidroxidopamina 250 μM , 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM de curcumina. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

Se puede observar como la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, ya que se disminuye la viabilidad celular.

IV.7.2.2. Línea celular HT-22.

Neuroprotección frente a rotenona/oligomicina.

La figura 80 muestra los resultados de neuroprotección obtenidos para la línea celular HT-22 tras la adición de rotenona/oligomicina 10:1 μM . En ella se observa que el pretratamiento con **6b** y **7b** a todas las concentraciones ensayadas mantiene la viabilidad celular en comparación con la curcumina viéndose diferencias significativas con respecto al control con Rotenona:Oligomicina 10:1 μM únicamente para el compuesto **7b** a 20 μM .

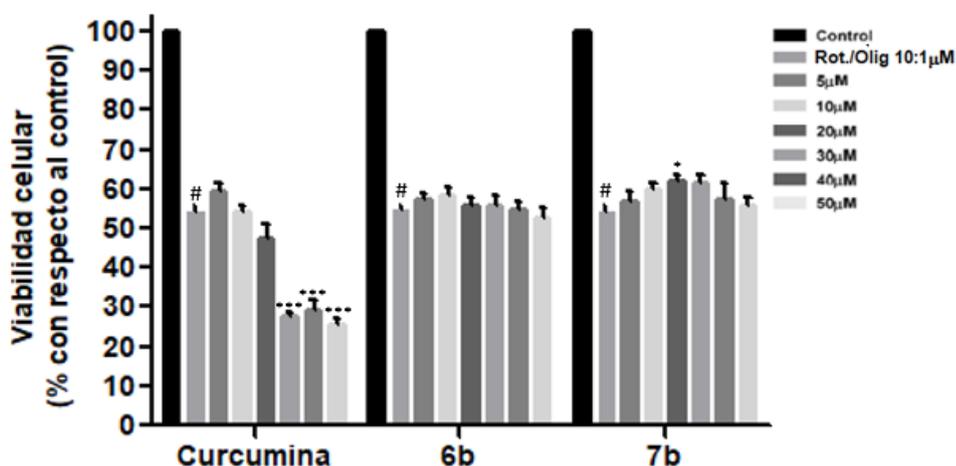


Figura 80. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por rotenona/oligomicina 10:1 μM en la línea celular HT-22. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con rotenona/oligomicina 10:1 μM durante 24h. Los datos representados son la media \pm desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. [#] $p < 0.001$ control con rotenona/oligomicina 10:1 μM , ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y con rotenona/oligomicina 10:1 μM .

En las siguientes figuras se muestran las imágenes de los ensayos de neuroprotección para los compuestos **6b**, **7b** y curcumina, en ellas se puede observar como la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, ya que se disminuye la viabilidad celular.

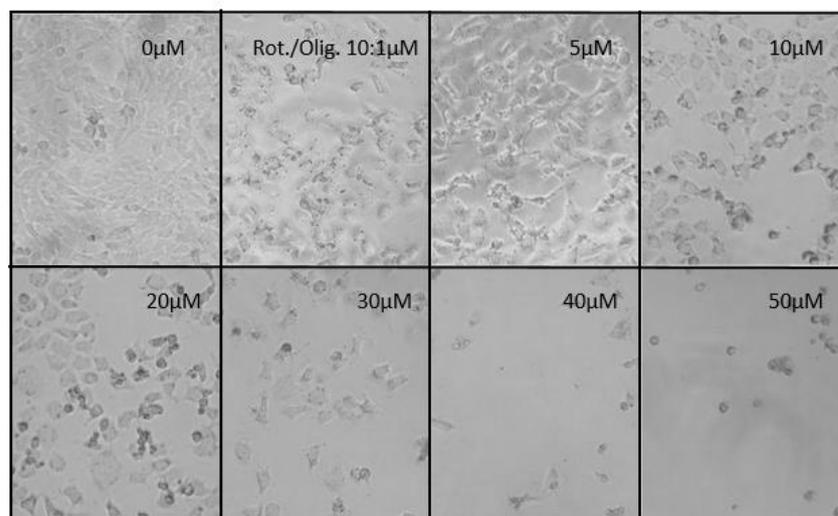


Figura 81. Experimento de protección de la curcumina frente a rotenona/oligomicina 10:1 µM en la línea celular HT-22. 0, control con rotenona/oligomicina 10:1 µM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

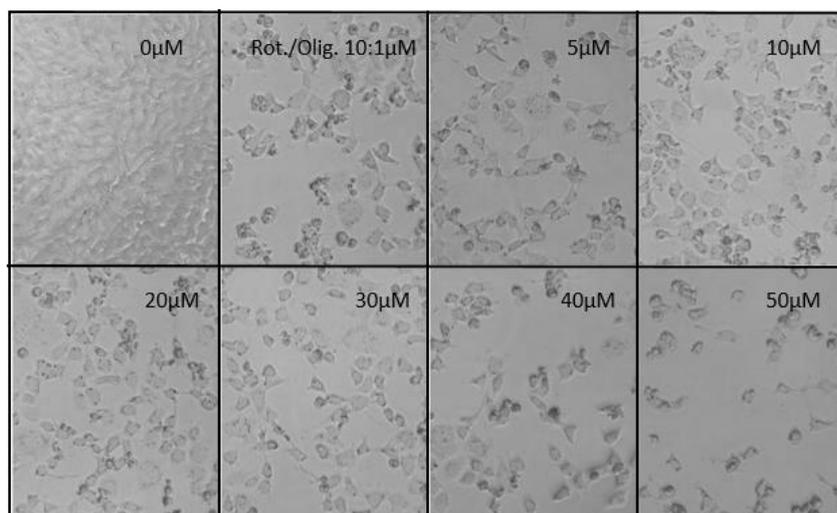


Figura 82. Experimento de protección del compuesto **6b** frente a rotenona/oligomicina 10:1 μM en la línea celular HT-22. 0, control con rotenona/oligomicina 10:1 μM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

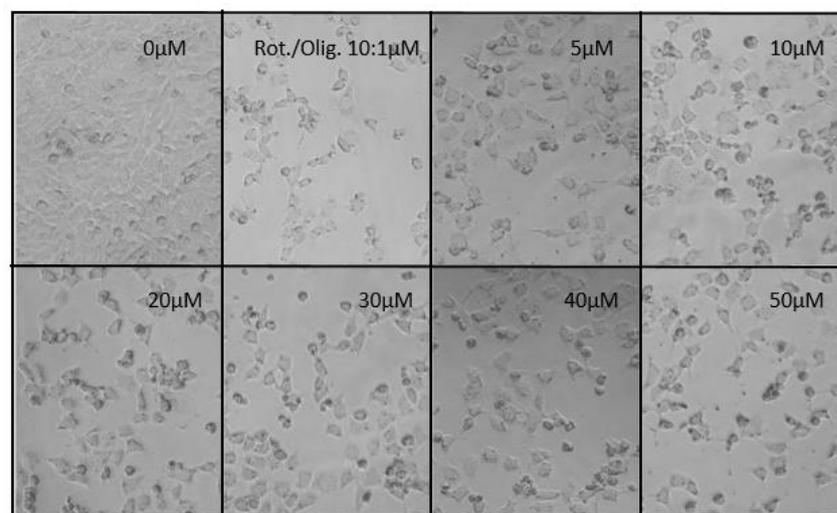


Figura 83. Experimento de protección del compuesto **7b** frente a rotenona/oligomicina 10:1 μM en la línea celular HT-22. 0, control con rotenona/oligomicina 10:1 μM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

IV.7.3. Neuroprotección frente a neurotoxicidad inducida por glutamato.

En cuanto a neurocitotoxicidad inducida por glutamato en la línea celular HT-22 se ha obtenido el valor de DL50 en $9,53 \pm 0,82$ mM y estableciéndose como valor por defecto de DL50 10 mM. En la figura 84 se muestra la curva con el ajuste correspondiente.

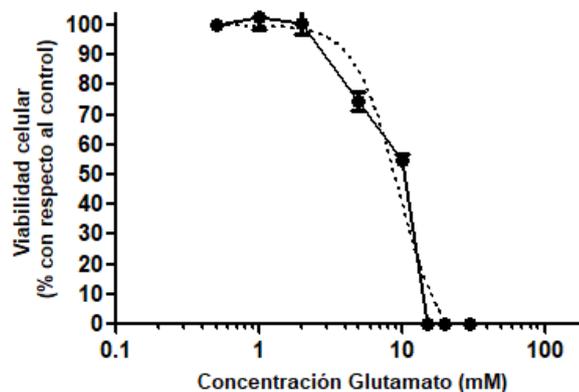


Figura 84. Determinación de la dosis letal 50 (DL50, μ M) de glutamato tras 24h de incubación sobre las HT-22. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT. Los valores representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos diferentes realizados por cuadruplicado ($r^2:0,9611$).

En la figura 85 se muestran los resultados de neuroprotección obtenidos tras la adición de glutamato 10 mM. En ella se observa que el pretratamiento con 6b a 30 μ M y 40 μ M protege frente a glutamato 10 mM. Sin embargo el pretratamiento con **7b** protege a menor concentración (10 y 20 μ M) siendo 20 μ M la que mejor protección presenta ($p<0.001$).

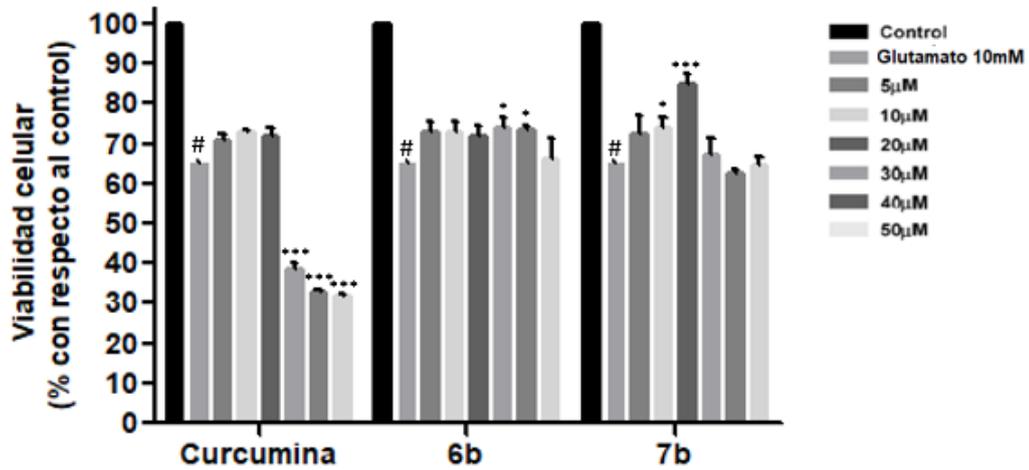


Figura 85. Efecto neuroprotector de la curcumina, **6b** y **7b** contra la citotoxicidad inducida por glutamato 10 mM en la línea celular HT-22. La viabilidad celular fue determinada por MTT. Los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h tras la incubación se trataron la células con glutamato 10 mM durante 24h. Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de cuatro experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$; control con glutamato 10mM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con el compuesto y glutamato 10mM.

En las siguientes figuras 86, 87 y 88 se muestran las imágenes al microscopio de los ensayos de neuroprotección para la curcumina y los compuestos **6b** y **7b**.

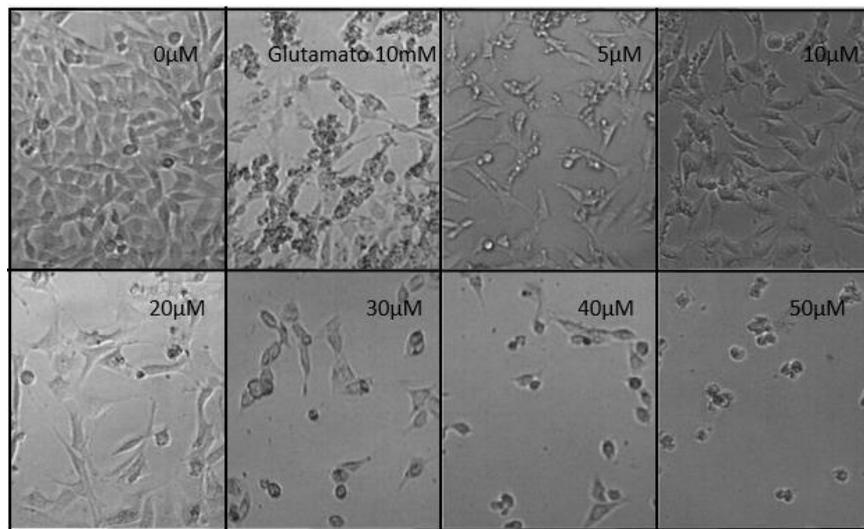


Figura 86. Experimento de protección de la curcumina frente a glutamato 10mM en la línea celular HT-22. 0, control con glutamato 10 mM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

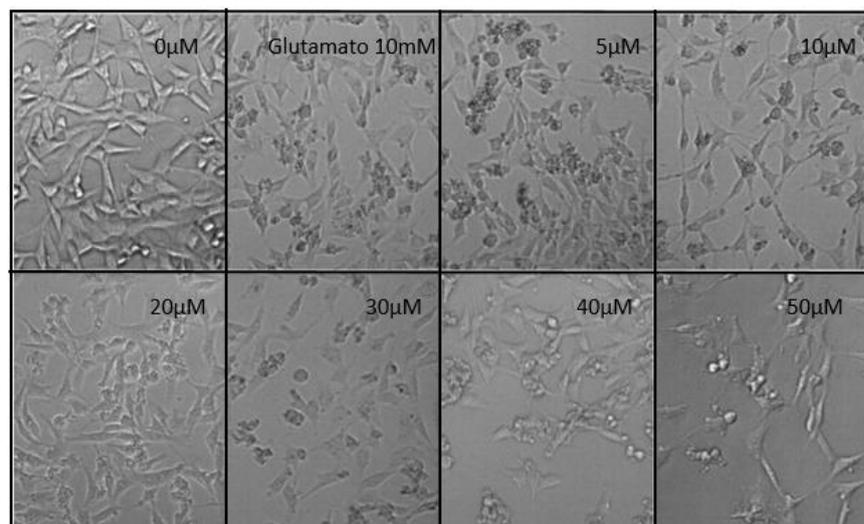


Figura 87. Experimento de protección del compuesto **6b** frente a glutamato 10mM en la línea celular HT-22. 0, control con glutamato 10 mM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µM. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

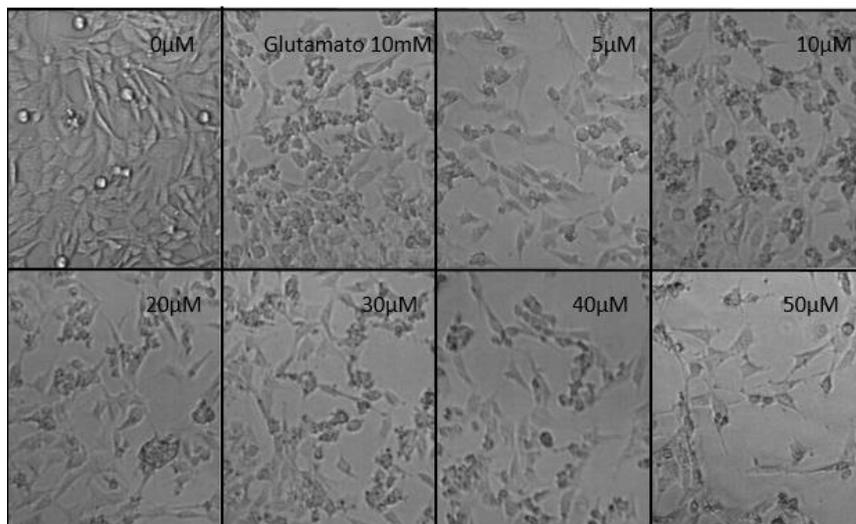


Figura 88. Experimento de protección del compuesto **7b** frente a glutamato 10mM en la línea celular HT-22. 0, control con glutamato 10 mM, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M. Imágenes realizadas en el microscopio invertido de fases (Leica DM300) a 20x.

En ellas se puede observar como la curcumina posee menor capacidad neuroprotectora y que a altas concentraciones es más citotóxica que los compuestos **6b** y **7b**, ya que se disminuye la viabilidad celular.

IV.8. Cuantificación intracelular de ROS.

Para la cuantificación intracelular de ROS en la línea celular SH-SY5Y, se hicieron ensayos en condiciones de daño crónico y agudo.

En el estudio en condiciones de daño crónico, se realizó un tratamiento previo con los compuestos **6b** y **7b** de 24 horas, y posteriormente se realizó la exposición a H_2O_2 400 μ M durante 4 horas.

En el estudio, en condiciones de daño agudo, se realizó un tratamiento previo de 6h con los compuestos **6b** y **7b** seguido de 2 h de H_2O_2 a 500 μ M.

En la figura 89 se muestran los resultados obtenidos para la condición crónica, observándose como el pretratamiento con los compuestos produjo una reducción significativa del nivel de ROS, siendo más significativa esa reducción para **7b** ($p < 0.001$).

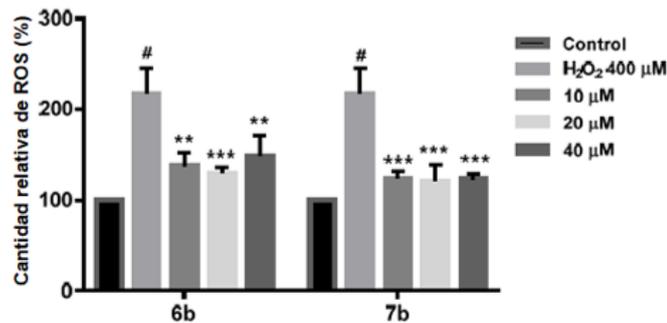


Figura 89. Disminución intracelular de ROS mediada por los compuestos **6b** y **7b** en la línea celular SH-SY5Y tras el tratamiento durante 4h de 400 μM de H₂O₂ y con previo tratamiento con los compuestos **6b** y **7b** durante 24h. La cantidad intracelular de ROS fue determinada mediante el método DFCH-DA. Los datos representados son la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H₂O₂ 400 μM.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H₂O₂ 400 μM.

En la figura 90 se muestran los resultados obtenido para la condición aguda, observándose que el pretratamiento con los compuestos **6b** y **7b** han mostrado una disminución significativa del nivel de ROS siendo esta mayor para el compuesto **7b**.

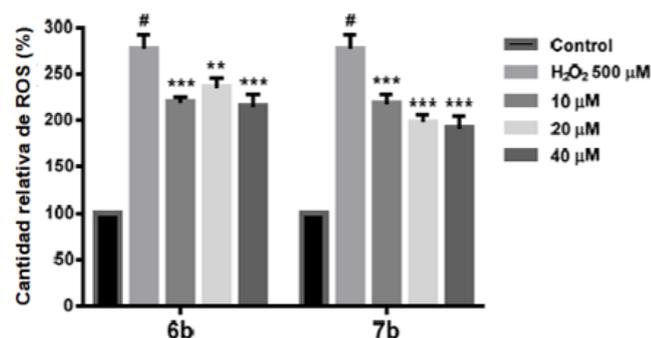


Figura 90. Disminución intracelular de ROS mediada por los compuestos **6b** y **7b** en la línea celular SH-SY5Y tras el tratamiento durante 2h de 500 μM de H₂O₂ y con previo tratamiento con los compuestos **6b** y **7b** durante 6h. La cantidad intracelular de ROS fue determinada mediante el método DFCH-DA. Los datos representados son la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H₂O₂ 500 μM.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H₂O₂ 500 μM.

IV.9. Valoración de la integridad de la membrana mitocondrial midiendo su potencial de membrana ($\Delta\psi_m$).

IV.9.1. Ensayo por espectroscopia de fluorescencia.

Con el fin de determinar la despolarización del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), se realizaron ensayos en condiciones de daño crónico, para asegurar que los compuestos logran una mejor reducción de los niveles intracelulares de ROS. En la figura 91 se observa que el H_2O_2 a 200 μM disminuye el potencial de membrana en un 62%, por otro lado también se evidenció que el pretratamiento con los compuestos **6b** y **7b** durante 24 h recuperaba el potencial de membrana en aproximadamente un 20%.

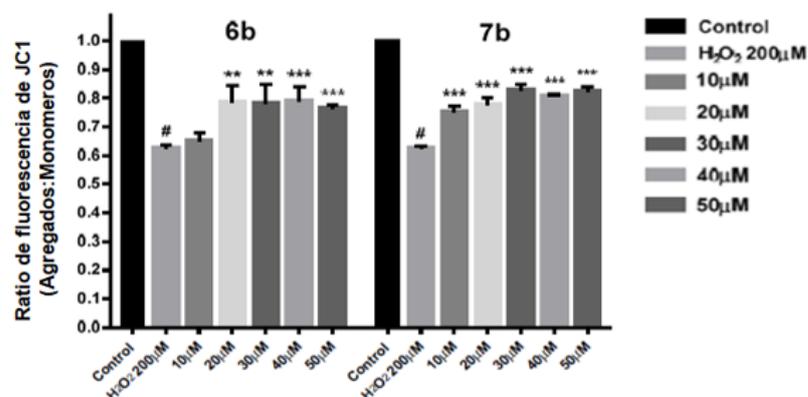


Figura 91. Prevención de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) mediada por los compuestos **6b** y **7b** en la línea celular SH-SY5Y tras el tratamiento durante de 24h de H_2O_2 200 μM . Las células fueron tratadas con los compuestos **6b** y **7b** durante 24h, después se incubaron 24h más H_2O_2 . La pérdida del $\Delta\psi_m$ fue determinada mediante la sonda JC-1. El $\Delta\psi_m$ se expresa como relación de fluorescencia de JC-1 en términos de fluorescencia roja a fluorescencia verde (agregados: monómeros). Los datos representados son la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 200 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 200 μM .

IV.9.2. Ensayo por citometría de flujo.

Con el objetivo de confirmar los resultados de recuperación del potencial de membrana se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo con el compuesto **7b** en la línea celular SH-SY5Y. Una de las sondas más utilizadas para evaluar el estado del $\Delta\psi_m$ es JC1, se trata de una sonda permeable y catiónica que entra de forma selectiva en la mitocondria. Las células sanas presentan un alto $\Delta\psi_m$ por lo que JC1 entra de forma selectiva en la mitocondria y forma agregados (J-agregados) que emiten fluorescencia roja cuyo pico máximo de emisión es de 590 nm (canal FL-2). Sin embargo en células dañadas cuyo potencial de membrana es bajo, JC1 permanece en forma monomérica (J-monómeros) emitiendo fluorescencia verde cuyo pico de máximo de emisión es de 527 nm (canal FL-1).

La relación entre la fluorescencia roja y la fluorescencia verde (FL-2/FL-1) permite realizar un estudio comparativo del potencial de membrana entre distintas poblaciones celulares, lo que permite determinar el daño producido por las radicales libres.^{32,165,166}

Los resultados obtenidos para 30.000 eventos se muestran en la figura 92, en ella se observa que la población de células disminuye bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 400 μM y que esta aumenta cuando se realiza un tratamiento previo con el compuesto **7b** a 20 y 40 μM .

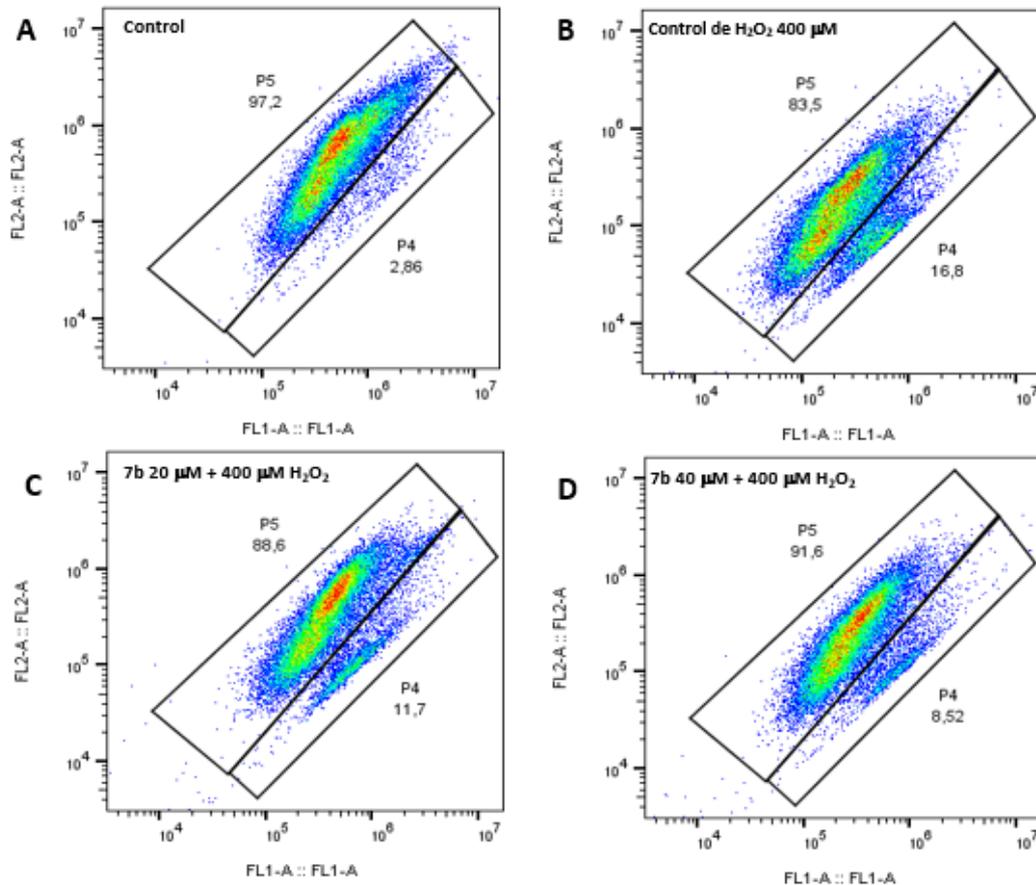


Figura 92. Efecto neuroprotector de los compuesto **7b** frente H_2O_2 a 400 μM durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. El compuesto fue administrado a 20 y 40 μM durante 24h antes del tratamiento con H_2O_2 . El potencial de membrana fue determinado mediante citometría de flujo usando la sonda JC-1. Se representa las poblaciones en cada región FL-1 la cual da fluorescencia verde (J-monómeros) y FL-2 la cual da fluorescencia roja (J-agregados). Los datos representados son la media de los 30.000 eventos \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **A:** células control, **B:** células tratadas con H_2O_2 a 400 μM **C:** células tratadas con **7b** 20 μM y con H_2O_2 a 400 μM **D:** células tratadas con **7b** 40 μM y con H_2O_2 a 400 μM .

El análisis cuantitativo de estos resultados se representa en la figura 90. En ella se observa que el control con H₂O₂ 400 μM presentó un aumento significativo en la relación FLA-1/FLA-2, mientras que las células tratadas previamente con **7b** a 20 μM y 40 μM exhiben una reducción de esa relación. A partir de estos experimentos de citometría de flujo, podemos evidenciar que tras el tratamiento con el compuesto **7b** a 20 μM y 40 μM se produce una recuperación significativa del potencial de membrana en células SH-SY5Y en condiciones de EO inducidas por H₂O₂ 400 μM.

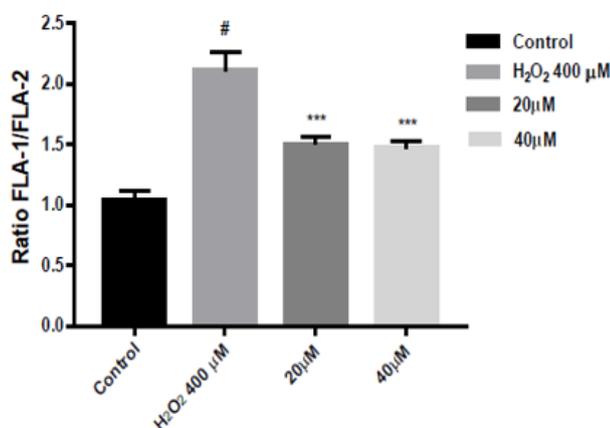


Figura 93. Efecto neuroprotector de los compuestos **6b** y **7b** frente H₂O₂ a 400 μM durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa cuantitativamente la relación FL-1/FL-2. Los compuestos fueron administrados a 20 y 40 μM durante 24h antes del tratamiento con H₂O₂. Los datos se representan como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. #p<0.001 control con H₂O₂ 400 μM.; *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.001 células tratadas con los compuesto y con H₂O₂ 400 μM.

IV.10. Cuantificación de biomarcadores celulares de daño oxidativo.

En estos ensayos se incluye el compuesto sin el estresor con el objetivo de estudiar el efecto *persé* del compuesto sobre los biomarcadores celulares.

IV.10.1. Cuantificación de MDA.

Para la detección de MDA en la línea celular SH-SY5Y, se realizaron ensayos en condiciones de daño crónico y agudo. Para la condición crónica se trataron las células con los compuestos **6b** y **7b** a 10 μM y 20

μM y posteriormente se adicionó peróxido a $400 \mu\text{M}$ durante 4 h. En el caso del tratamiento agudo se realizó una protección previa durante 6h con los compuestos **6b** y **7b** y posteriormente se adicionó peróxido a $500 \mu\text{M}$ durante 2 h. Se determinó la cantidad de MDA mediante fluorimetría.

En la figura 94 se representa el tratamiento crónico, en ella se observa que el pretratamiento de las células con el derivado **7b** a $20 \mu\text{M}$ consiguió disminuir significativamente los niveles de MDA en comparación con aquellas células tratadas con H_2O_2 , y que el tratamiento únicamente con los compuestos y sin el estresor (H_2O_2) muestran niveles similares de peroxidación lipica a los observados en el control de células sanas.

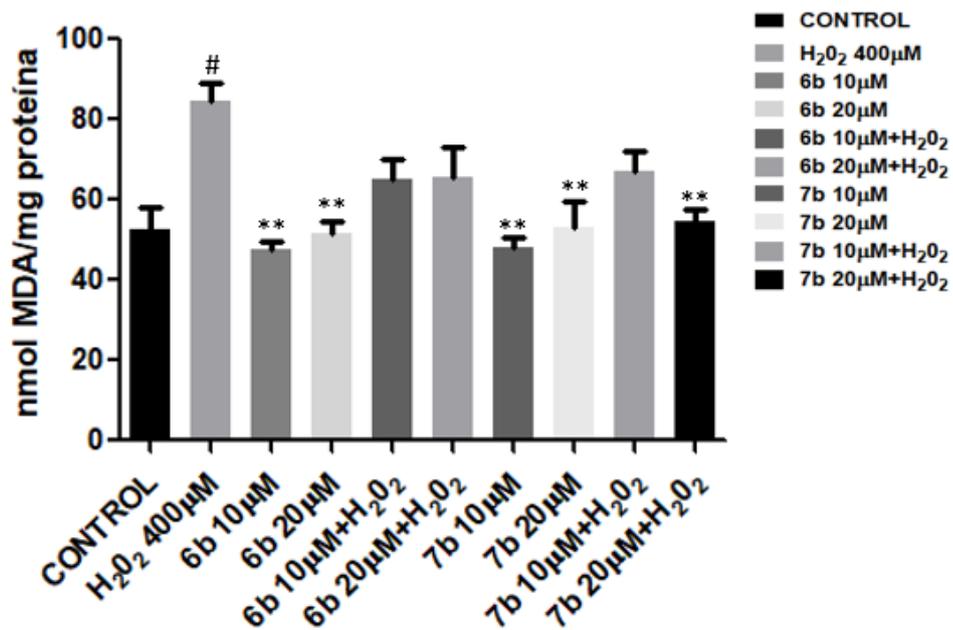


Figura 94. Efecto neuroprotector de los compuestos **6b** y **7b** frente a H_2O_2 $400 \mu\text{M}$ durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la concentración de MDA (nM) frente a la cantidad de proteína (mg/ml), los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h antes del tratamiento con H_2O_2 . Los datos se representan como la media \pm la desviación típica de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 $400 \mu\text{M}$.; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 $400 \mu\text{M}$.

En la figura 95 se muestran los resultados obtenidos para el tratamiento agudo, se puede observar también como el compuesto **7b** a 20 μM disminuye la cantidad de MDA en comparación con las células tratadas con H_2O_2 , y que el tratamiento únicamente con los compuestos y sin el estresor (H_2O_2) muestran niveles similares de peroxidación lipídica a los del control de células sanas.

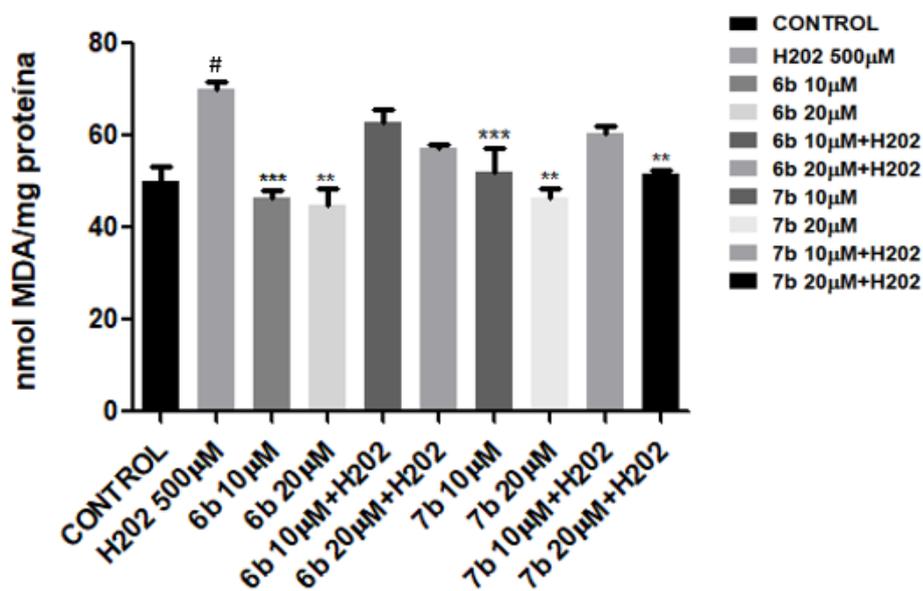


Figura 95. Efecto neuroprotector de los compuestos **6b** y **7b** frente a peróxido 500 μM durante 2h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la concentración de MDA (nM) frente a la cantidad de proteína (mg/ml), los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 6h antes del tratamiento con peróxido. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 500 μM . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 500 μM .

IV.10.2. Determinación de las defensas celulares endógenas a través de la relación GSH/GSSG.

Este ensayo se llevó a cabo en las mismas condiciones que las anteriores.

En la figura 96 se representa los resultados del tratamiento en condiciones crónicas, observándose que el tratamiento con **7b** a 10 μM y 20 μM aumenta la relación GSH/GSSG con respecto a las células tratadas con H_2O_2 400 μM , y que el tratamiento únicamente con los compuestos y sin el estresor (H_2O_2) muestran una relación GSH/GSSG similar a los observados en el control de células sanas.

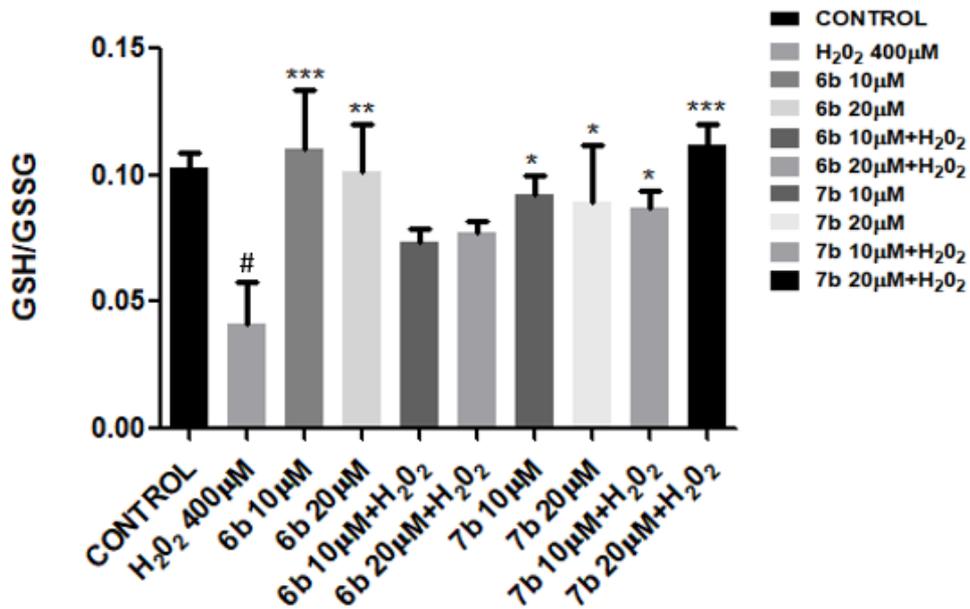


Figura 96. Efecto neuroprotector de los compuestos **6b** y **7b** frente a peróxido 400 μM durante 4h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la relación GSH/GSSG, los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 24h antes del tratamiento con peróxido. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 400 μM ; $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 400 μM .

En la figura 97 se representa el tratamiento agudo, en ella se puede observar también que el tratamiento con los derivados **6b** y **7b** a 20 μM disminuye la relación de GSH/GSSG con respecto a H_2O_2 500 μM .

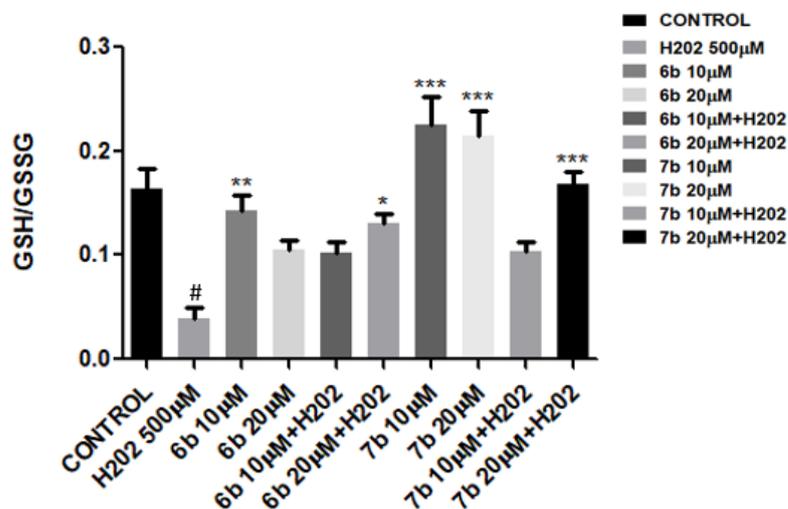


Figura 97. Efecto neuroprotector de los compuestos **6b** y **7b** frente a peróxido 500 μM durante 2h en la línea celular SH-SY5Y. Se representa la relación GSH/GSSG, los compuestos fueron administrados a diferentes concentraciones durante 6h antes del tratamiento con peróxido. Los datos se representan como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0.001$ control con H_2O_2 500 μM . $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ células tratadas con los compuesto y con H_2O_2 500 μM .

IV.11. Cuantificación de la expresión de las enzimas endógenas de defensa antioxidante.

Al objeto de estudiar la actividad reguladora de la expresión de las vías endógenas de defensa por parte de los derivados **6b** y **7b** se llevó a cabo un estudio mediante la técnica de *Western blot* para determinar los niveles de expresión de las enzimas Hmox-1, Nrf2 y Keap1. En estos ensayos se incluye el compuesto sin el estresor con el objetivo de estudiar el efecto *persé* del compuesto sobre la expresión de las enzimas endógenas de la defensa AOX.

Los resultados obtenidos para la Hmox-1 se muestran en la figura 98, en ella podemos observar como en condiciones crónicas de estrés oxidativo los compuestos disminuyen la expresión de esta proteína frente al control con H₂O₂, lo que indica que los compuestos reducen los niveles de dicha enzima. Se observa que el tratamiento solo con los compuestos mantiene niveles similares del enzima Hmox-1 a los observados para el control sin EO, habiéndose encontrado que en condiciones de presión bajo H₂O₂ ambos compuestos, pero sobretodo el derivado **6b**, disminuyen los niveles de Hmox-1 significativamente en comparación a los niveles del control con H₂O₂.

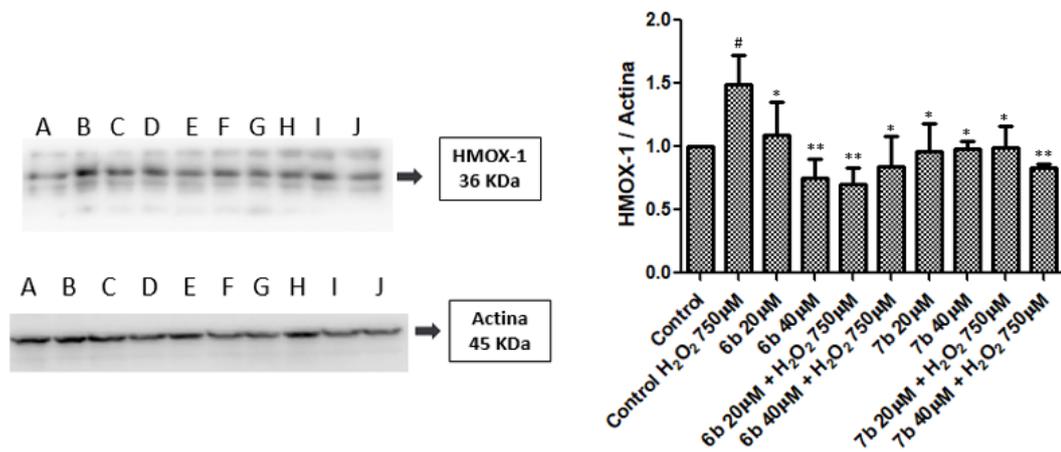


Figura 98. Cuantificación de la cantidad de proteína HMOX-1 mediante Western-Blot en diferentes condiciones. En la parte de la izquierda aparece la imagen del gel, cada carril es una condición: **A:** control, **B:** control con H₂O₂ 750 µM, **C:** células tratadas con **6b** 20 µM, **D:** células tratadas con **6b** 40 µM, **E:** células tratadas previamente con **6b** 20 µM y posteriormente con H₂O₂ 750 µM, **F:** células tratadas previamente con **6b** 40 µM y posteriormente con H₂O₂ 750 µM, **G:** células tratadas con **7b** 20 µM, **H:** células tratadas con **7b** 40 µM, **I:** células tratadas previamente con **7b** 20 µM y posteriormente con H₂O₂ 750 µM, **J:** células tratadas previamente con **7b** 40 µM y posteriormente con H₂O₂ 750 µM. En la parte de la derecha de la imagen aparece la relación normalizada entre HMOX-1/Actina. #p<0.01 control con H₂O₂ 750 µM. *p<0.05, **p<0.01, células tratadas con los compuesto y con H₂O₂ 750 µM.

En la figura 99 se muestran los resultados obtenidos para Nrf2. Observándose, como en condiciones crónicas de estrés oxidativo aumenta la cantidad de Nrf2 y como los compuestos disminuyen la expresión de esta proteína frente al control con H₂O₂. Por otro lado se observa que el tratamiento solo con los compuestos mantiene niveles similares a los del control sin H₂O₂.

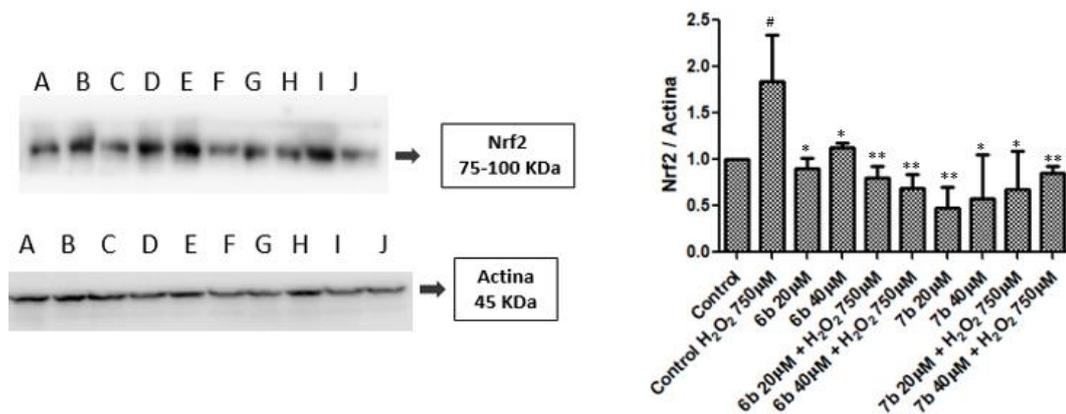


Figura 99. Cuantificación de la cantidad de Nrf2 mediante Western-Blot en diferentes condiciones. En el lado izquierdo de la figura se representa la imagen del gel, cada carril es una condición: **A:** control **B:** control con H₂O₂ 750 μM, **C:** células tratadas con **6b** 20 μM, **D:** células tratadas con **6b** 40 μM, **E:** células tratadas previamente con **6b** 20 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM, **F:** células tratadas previamente con **6b** 40 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM, **G:** células tratadas con **7b** 20 μM, **H:** células tratadas con **7b** 40 μM, **I:** células tratadas previamente con **7b** 20 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM, **J:** células tratadas previamente con **7b** 40 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM. En la parte de la derecha de la imagen aparece la relación normalizada entre Nrf2/Actina. [#]p<0.001 control con H₂O₂ 750 μM. ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.01, células tratadas con los compuesto y con H₂O₂ 750 μM.

Los resultados obtenidos para la proteína Keap1 se muestran en la figura 100. En ella podemos observar como en condiciones crónicas de estrés oxidativo los dos compuestos son capaces de disminuir la producción de esta proteína y que el tratamiento únicamente con los compuestos mantiene valores similares a los obtenidos para el control de células sanas.

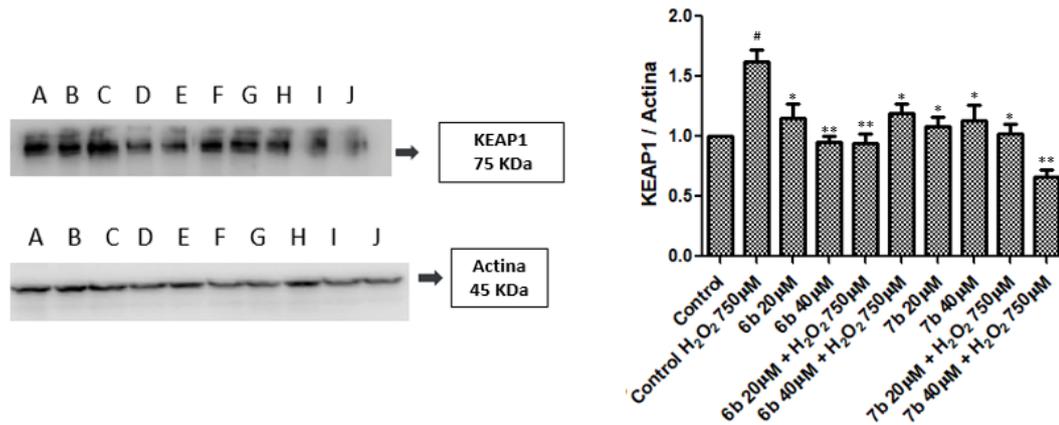


Figura 100. Cuantificación de la cantidad de KEAP1 mediante Western-Blot en diferentes condiciones. En el lado izquierdo de la figura se representa la imagen del gel, cada carril es una condición: **A:** control **B:** control con H₂O₂ 750 μM, **C:** células tratadas con **6b** 20 μM, **D:** células tratadas con **6b** 40 μM, **E:** células tratadas previamente con **6b** 20 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM, **F:** células tratadas previamente con **6b** 40 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM, **G:** células tratadas con **7b** 20 μM, **H:** células tratadas con **7b** 40 μM, **I:** células tratadas previamente con **7b** 20 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM, **J:** células tratadas previamente con **7b** 40 μM y posteriormente con H₂O₂ 750 μM. En la parte de la derecha de la imagen aparece la relación normalizada entre Keap1/Actina. #p<0.05 control con H₂O₂ 750 μM. *p<0.05, **p<0.01, células tratadas con los compuesto y con H₂O₂ 750 μM.

V.DISCUSIÓN

V.DISCUSIÓN

En el siglo XX se ha producido uno de los fenómenos biológicos más importantes sucedidos a lo largo de la historia en nuestra especie, ya que en las sociedades avanzadas la esperanza de vida ha sufrido un aumento considerable en un breve periodo de tiempo. A principios del siglo XX la esperanza de vida al nacer era de poco más de 40 años, y actualmente se ha duplicado hasta los aproximadamente 80 años. Debido a los continuos avances científicos y técnicos, junto con la mejora en la alimentación, en las condiciones higiénicas, en el acceso al agua potable y en el control de las enfermedades infecciosas, se ha conseguido ese avance espectacular en la esperanza de vida, principalmente en los países industrializados. Sin embargo, este aumento de forma tan rápida ha generado otros problemas ya que nuestra biología es mucho más lenta en sus procesos de cambio, por lo que no ha tenido tiempo de adaptarse a esa nueva duración de la vida, mostrando ineludiblemente sus limitaciones a la hora de dar soporte a un cuerpo que no está programado para durar tanto. Así, es interesante comprobar como las END poseen una alta prevalencia y se estima que en un futuro sus cifras aumentarían de manera alarmante. Como la etiología de estas enfermedades es aún desconocida, se ha establecido como objetivo terapéutico prioritario, en la actualidad y en un futuro próximo, el prevenir o retrasar su aparición y mejorar la calidad de vida de los pacientes que las padezcan.

Estudios epidemiológicos y experimentales demuestran diversos factores de riesgo y posibles causantes de las END, como la edad, los defectos genéticos, la autoinmunidad, la deficiencia de minerales, el estrés oxidativo, etc. Uno de los factores de riesgo más estudiados hoy en día y en el que es interesante ahondar es el EO, ya que la generación de radicales libres (RNS, RCS y ROS) se está produciendo de manera constante en el organismo en condiciones fisiológicas. Estos radicales son combatidos por los sistemas antioxidantes de defensa del organismo

pero cuando se produce un desequilibrio entre estos sistemas de defensa y la producción de los radicales, se genera una sobreproducción de ROS que desencadena un EO perjudicial para el organismo, ya que provoca daños en proteínas, lípidos, ADN y promueve potencialmente la apertura del poro de transición mitocondrial, lo cual a su vez puede estimular la producción de más especies reactivas de oxígeno (ROS) y generar un ciclo vicioso. Se ha visto que este EO podría contribuir al padecimiento de ciertas patologías tales como las END (EA y EP).¹⁸⁶

En la actualidad, numerosos estudios han demostrado que una buena forma de disminuir el EO es mediante el uso de agentes antioxidantes de manera exógena. Uno de los AOX más estudiados y que más interés ha despertado en los últimos años ha sido la curcumina, la cual ha demostrado ser beneficiosa en numerosas patologías como por ejemplo las END. Sin embargo, esta molécula posee ciertas limitaciones ya que presenta una mala biodisponibilidad a nivel sistémico y del SNC, como consecuencia de sus malas propiedades fisicoquímicas como su baja solubilidad y estabilidad química, junto con un mal perfil de propiedades ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación y Toxicidad). Todo ello conlleva a que presente malas características farmacocinéticas y farmacodinámicas, lo que le imposibilitan alcanzar los órganos diana y mantener niveles de exposición adecuados para poder ejercer así su acción AOX.¹⁴⁴ Por ello, es necesario diseñar y desarrollar nuevos quimiotipos derivados de la curcumina, con propiedades AOX similares a esta pero con funcionalidad estructural diferente, lo que permitirá así generar nuevas entidades químicas más atractivas, desde el punto de vista de las propiedades drug-like.

Con este objetivo de partida, en el presente trabajo se ha evaluado el potencial AOX y neuroprotector de nuevas 1,3- β -dicetonas asimétricas, diseñadas y sintetizadas por el Grupo de Sistemas Supramoleculares Bioorgánicos de la UNED, ^{138,139} las cuales poseen modificaciones estructurales innovadoras sobre el esqueleto fundamental de la curcumina. (Figura 101)

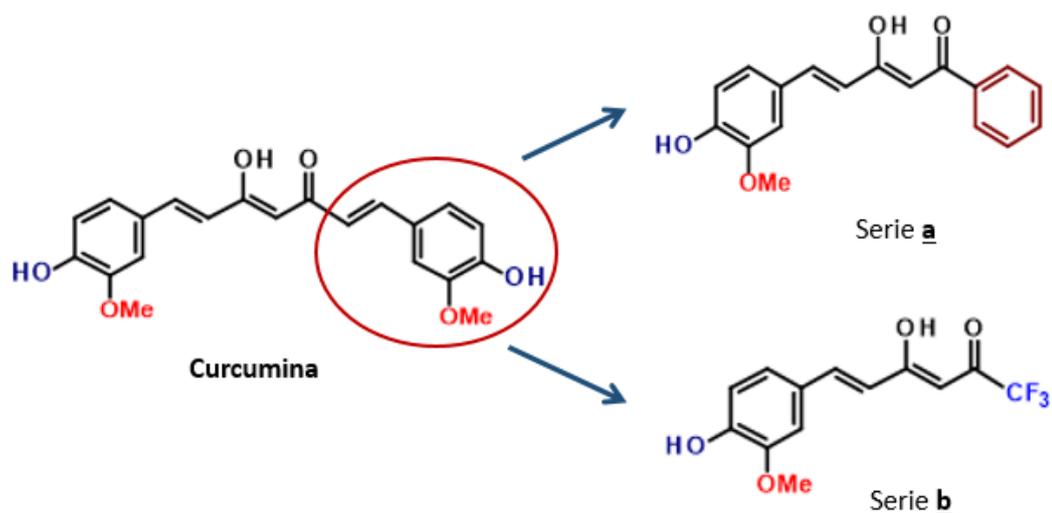


Figura 101. Cambios estructurales en la curcumina para generar las 1,3- β -dicetonas de las series a y la b.

Estos cambios estructurales de la curcumina dan como resultado los derivados **1a** y **1b** tal y como se muestra en la figura 102.

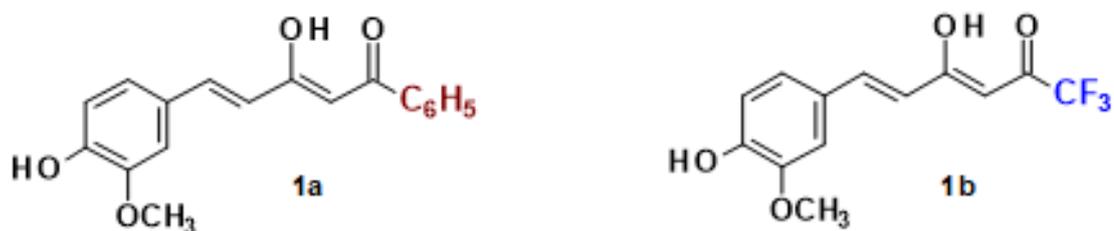


Figura 102. 1,3- β -dicetonas **1a** y **1b**

Posteriormente, se diseñaron y realizaron las diferentes sustituciones en el anillo fenólico de los derivados 1b y 1b, al objeto de conseguir los restantes derivados de ambas series. (Figura 103).

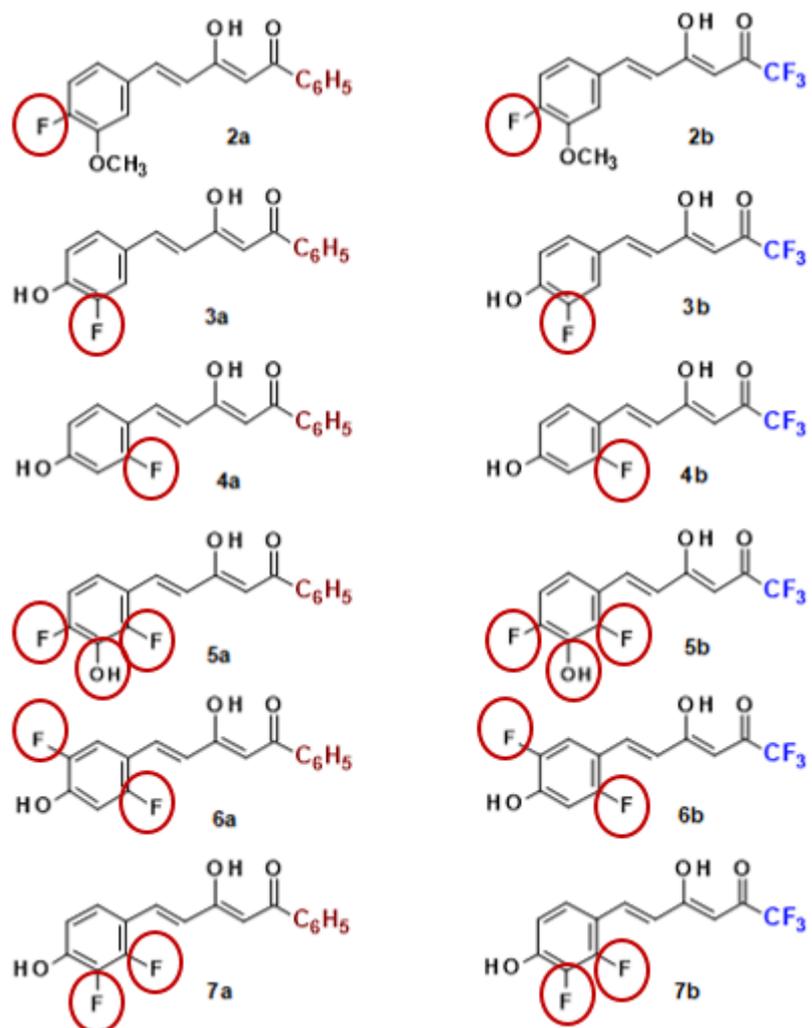


Figura 103. Estructuras de las 1,3-β-dicetonas

Una vez obtenidos los diferentes compuestos, se determinó en primer lugar la capacidad AOX de todos ellos mediante tres métodos diferentes (ABTS, FRAP y DPPH), y posteriormente se realizaron estudios para evaluar su citotoxicidad así como su potencial neuroprotector sobre las líneas neuronales SH-SY5Y y HT-22.

Los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados mediante los métodos ABTS y FRAP confirmaron el carácter AOX de las 1,3-β-

dicetonas además de confirmar la capacidad AOX de curcumina y trolox, empleados en el presente proyecto como controles, de acuerdo con los resultados descritos en la literatura.^{178,179}

A partir de los resultados mostrados en la tabla 6, se puede concluir que la sustitución del grupo alilo en el lado derecho de la curcumina por fenilo (Ph, compuestos **1a-7a**) o por trifluorometilo (CF₃, compuestos **1b-7b**) da como resultado un aumento en la IC50 en el ensayo ABTS. Los derivados **1a**, **3a**, **6a**, **7a**, **1b**, **7b** poseen una IC50 en este ensayo, similar o ligeramente superior al de curcumina, viéndose en general que la serie **1a** con el grupo fenilo, posee mejor actividad inhibitoria del radical ABTS^{•+} en comparación con la serie **1b** con el sustituyente CF₃. Del mismo modo, en el ensayo FRAP se observó una tendencia similar a la observada en los resultados del ABTS, siendo el orden de poder reductor del Fe⁺³ el siguiente: curcumina > **1a** ≈ **1b** > **3a** ≈ **3b** > **6a** ≈ **7a** > **6b** ≈ **7b**.

Por otro lado, la sustitución del radical hidroxilo (-OH) por flúor en los derivados **2a** y **2b** dio lugar a la pérdida total de la actividad antioxidante en comparación con los derivados **1a** y **1b**, tanto en el ensayo de ABTS como en el de FRAP, ya que en estos ensayos es necesaria la presencia de un OH fenólico para que se dé la reacción.^{187,188} Así mismo, la sustitución del grupo OMe en posición 3 por flúor en los derivados **3a** y **3b** produce una ligera disminución de la capacidad de AOX en el ensayo ABTS en comparación con los derivados **1a** y **1b**, siendo esa actividad similar en ambas series Ph y CF₃. Del mismo modo, se observa una pérdida del carácter AOX en los compuestos **4a** y **4b** (los cuales poseen el átomo de flúor en la posición 2 del anillo aromático) en comparación con sus análogos **3a** y **3b**.

La introducción de un segundo átomo de flúor en el anillo fenólico dio lugar a los derivados **6a**, **6b** y **7a**, **7b**, los cuales han mostrado una ligera mejora en la actividad AOX tanto en el ensayo ABTS como en el FRAP.

Por último, el cambio del grupo OH de la posición 4 (para) del anillo fenólico a la posición 3 (meta) en los derivados **7a** y **7b**, dio como resultado los compuestos **5a** y **5b**, los cuales mostraron una pérdida casi total de la actividad AOX en ambos ensayos.

Con respecto al ensayo de determinación de la carácter AOX mediante el método DPPH, el cual mide la actividad AOX de un compuesto como la capacidad de éste para donar un átomo de hidrógeno o un electrón al radical DPPH[•] ^{143,189} los compuestos **1a** y **1b** fueron las únicas β -dicetonas que han mostrado actividad en este ensayo, con valores de IC50 ligeramente mayores a los de curcumina y el trolox, tal y como se muestra en la tabla 7. El hecho de que solo **1a** y **1b** hayan mostrado capacidad reductora en el ensayo de DPPH era de esperar, teniendo en cuenta que mantienen el grupo metoxi en posición alfa al OH fenólico en para, por lo que se mantiene la capacidad donadora de protones y con ello la capacidad de reducir el radical DPPH[•]. Además de ello, la falta de actividad captadora de radical DPPH[•] observada para los derivados fluorados, confirma un aumento de la acidez en los compuestos fenólicos, producido por la introducción de átomos de flúor en el anillo aromático de la izquierda de la molécula, lo que hace que el hidrógeno fenólico sea menos lábil, de acuerdo con resultados previos.¹⁹⁰

A partir de lo anteriormente expuesto sobre los resultados obtenidos de los estudios para la determinación del carácter AOX, podemos concluir que los derivados curcuminoides 1,3- β -dicetónicos asimétricos constituye una nueva alternativa interesante a la curcumina como compuestos AOX, ya que poseen una capacidad AOX significativa similar a aquella, pero con funcionalidades estructurales diferentes.

Para estudiar el potencial terapéutico de todos los compuestos sintetizados, se calcularon sus parámetros fisicoquímicos y se compararon con los de curcumina (datos mostrados en la tabla 8). A partir de los parámetros calculados, podemos concluir que todos los compuestos poseen propiedades *drug-like*, con pesos moleculares (PM) más pequeños que los de la curcumina, con buena lipofilia (MlogP) y con buen coeficiente de distribución a pH 7,4 (logD), y que cumplen con los criterios actualmente aceptados para compuestos dirigidos al SNC, es decir, $PM \leq 360$, $MlogP \leq 3.0$, $logD \leq 2$, $HBD \leq 2$, $NO \leq 2$, $TPSA > 40 \text{ \AA}^2$ y $\leq 90 \text{ \AA}^2$.^{180,181} Vale la pena mencionar la mejora observada en esos parámetros fisicoquímicos después de la sustitución del anillo de fenilo de la serie **a** por el grupo CF_3 en la serie **b**. Por otro lado, el área polar superficial total (TPSA) se ha utilizado como un predictor de la capacidad de un fármaco para atravesar la barrera hematoencefálica, según la cual aquellas compuestos dirigidos al SNC poseen áreas de superficie polar más bajas. Para que una molécula sea capaz de introducirse en el SNC su TPSA debe ser $> 40 \text{ \AA}^2$ y $\leq 90 \text{ \AA}^2$, de acuerdo con el rango más aceptado en la actualidad.^{180,181} En cuanto a los resultados obtenidos en este trabajo, podemos ver que las 1,3- β -dicetonas poseen mejor TPSA en comparación con curcumina, siendo los derivados de la serie **1b** con el grupo CF_3 los que presentan el perfil más compensado en PM, MlogP, logD y TPSA, y de entre ellos, los compuestos **6b** y **7b** son los más prometedores, considerando en conjunto sus propiedades fisicoquímicas calculadas y sus actividades antioxidantes.

Una vez visto que los quimiotipos sintetizados poseen un buen perfil de propiedades fisicoquímicas y una capacidad AOX significativa, se procedió a determinar la citotoxicidad de dichos compuestos frente a líneas celulares. Para ello se realizaron estudios *in vitro*, en líneas celulares establecidas como las líneas neuronales SH-SY5Y y HT-22 y la línea de hepatocitos HepG2, al objeto de determinar la DL50 (dosis a la que hay un 50% de viabilidad celular) y determinar así el rango de

concentraciones de cada producto a los cuales no presentan citotoxicidad, para posteriormente llevar a cabo los experimentos de neuroprotección.

En los ensayos realizados de citotoxicidad en la línea celular SH-SY5Y (tabla 9), podemos observar que la DL50 de la curcumina es aproximadamente 50 μM , frente a los derivados sintetizados cuyo rango esta entre 75-200 μM . En cuanto a la línea neuronal HT-22 (tabla 9), la DL50 de la curcumina es de aproximadamente 85 μM , frente a los derivados sintetizados que muestran la DL50 por encima de 200 μM exceptuando en los compuestos **2a**, **4a**, **7a** y **2b** que se encuentra en el rango de 100-200 μM . Y por último, para la línea celular HepG2 (tabla 10), la DL50 para la curcumina es de 136 μM mientras que para la mayoría de los derivados se encuentra por encima de 200 μM , exceptuando para los compuestos **4a**, **2b** y **3b**. A partir de estos resultados podemos concluir que la sustitución del grupo fenilo por el grupo trifluorometilo en las β -dicetonas dio lugar a una disminución en el citotoxicidad frente a estas líneas celulares. Además de ello, dentro de cada serie química la introducción de un segundo átomo de flúor en el anillo de fenilo al lado izquierdo de la molécula disminuye la citotoxicidad de la molécula. Por otro lado, en todas las líneas celulares, se observó una ligera precipitación de los compuestos **1a**, **2a** y **3a**, lo que indicaría una baja solubilidad en medios tamponados.

A partir de los resultados del presente estudio podemos concluir que curcumina es el compuesto más tóxico en las líneas celulares ensayadas, y que la introducción del grupo trifluorometilo en el anillo aromático fenólico disminuye la citotoxicidad de los compuestos, al mostrar los derivados del quimiotipo de la serie **b** una menor citotoxicidad que los correspondientes de la serie **a**, lo que podría estar relacionado con la menor lipofilia de los compuestos con el grupo trifluorometilo (serie **b**).

Con el objetivo de probar nuestra hipótesis de trabajo, se llevaron a cabo estudios de neuroprotección con las 1,3- β -dicetonas en condiciones de estrés oxidativo. Para ello todos los derivados se ensayaron *in vitro* frente a la línea celular neuronal SH-SY5Y en condiciones de EO inducido por H₂O₂ al objeto de evaluar la influencia sobre la actividad neuroprotectora de las modificaciones estructurales puntuales, realizadas en cada uno de los quimiotipos estudiados. Para poder realizar estos estudios se llevaron a cabo previamente curvas de muerte del agente inductor de EO (H₂O₂), a partir de las cuales se determinó que la DL50 del H₂O₂ en la línea celular SH-SY5Y era de 200 μ M.

Una vez determinada la DL50 del H₂O₂, se evaluó el carácter neuroprotector de cada uno de los compuestos de ambas series. En la tabla 12 se muestran los resultados de los ensayos de neuroprotección tras la adición de H₂O₂ 200 μ M, posterior al tratamiento previo con cada uno de los compuestos durante 24 horas. A partir de estos datos y teniendo en cuenta las estructuras de los compuestos se observan las siguientes relaciones estructura-actividad:

1. La mayoría de los derivados muestran cierta actividad neuroprotectora a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, a excepción de los compuestos **2a**, **5a** y **2b** y **5b**. Esto es debido a la falta del grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo aromático de la izquierda.
2. En cuanto a los derivados **1a** y **1b** conservan en las posiciones 3 y 4 la misma sustitución que la curcumina y han mostrado menos actividad que esta, lo cual es debido a la sustitución introducida en el lado derecho de la curcumina.
3. En los derivados **3a** y **3b** el grupo metoxi de la posición 3 del anillo aromático de la izquierda de la molécula se ha sustituido por flúor, lo que demuestra que la sustitución del grupo flúor es bien tolerada.
4. En referencia a los compuestos **4a** y **4b** la introducción del flúor en la posición 2 del anillo aromático muestra que la actividad

observada es compatible en el derivado **4b** con la mostrada para curcumina.

5. En cuanto a los derivados **6a** y **6b**, en los que se ha introducido el átomo de flúor en las posiciones 2 y 5 del anillo aromático de la parte izquierda de la molécula, se observa una mejora en su actividad lo que demuestra que la introducción del segundo átomo de flúor en la posición 5 del anillo aromático aumenta el carácter neuroprotector con respecto a los derivados **4a** y **4b**.
6. Con respecto a los derivados **7a** y **7b**, en los cuales se mantiene el grupo hidroxilo en la posición 4 y se introducen 2 átomos de flúor en las posiciones 2 y 3 del anillo aromático, se consigue una mejora de la actividad protectora en comparación con los derivados **3a**, **3b**, **4a** y **4b**, y en comparación con los derivados **5a** y **5b**; por lo que esto demuestra que el mantenimiento del grupo hidroxilo en la posición 4 es esencial para la actividad neuroprotectora.

Teniendo en cuenta las propiedades AOX, drug-like, la citotoxicidad y los datos de neuroprotección obtenidos hasta el momento, podemos concluir que los derivados más prometedores a considerar como punto de partida con potencial terapéutico son **6b** y **7b**, por lo que se progresaron a estudios posteriores *in vitro* con el objetivo de profundizar en el estudio de su actividad neuroprotectora.

Siguiendo en esta línea, a continuación se realizaron ensayos de neuroprotección en línea SH-SY5Y con los compuestos **6b** y **7b** utilizando concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 50 μM y en condiciones de EO con H_2O_2 200 μM . Los resultados obtenidos (figura 37) ponen de manifiesto que el pretratamiento con **6b** y **7b** a todas las concentraciones ensayadas mejora significativamente la viabilidad celular con respecto a las células control tratadas solo con H_2O_2 200 μM , mostrando el compuesto **7b** el mejor perfil de viabilidad celular. Estos resultados se corroboraron posteriormente, con los obtenidos para dichos compuestos, en el estudio

realizado de viabilidad celular mediante el ensayo de LDH (Figura 49 y 50).

Para evaluar el carácter neuroprotector de los compuestos **6b** y **7b** en la línea celular de hipocampo de ratón HT-22, se realizaron previamente las curvas de muerte del agente inductor de EO (H_2O_2), donde se estableció que su DL50 era de 700 μM . En La figura 54 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo de neuroprotección de ambos compuestos frente a una concentración de H_2O_2 de 700 μM , y en ella se observa que el pretratamiento con **6b** y **7b** no mejoró la viabilidad celular con respecto al control tratado exclusivamente con H_2O_2 700 μM de manera estadísticamente significativa.

Posteriormente se procedió a determinar la solubilidad, la estabilidad y la capacidad de quelación del Fe^{2+} de los compuestos **6b** y **7b**. A partir de los resultados obtenidos (tablas 13 y 14) se concluyó que estos derivados presentaban el mejor perfil de propiedades drug-like, tal y como se ha demostrado en los resultados mostrados, ya que ambos poseen mejor solubilidad y estabilidad en medio tamponado que la curcumina. Por otro lado, también se observó que los derivados **6b** y **7b** a baja concentración (50 μM), muestran una capacidad de unión al Fe^{2+} (7-8%) similar a la de curcumina (8%), mientras que al elevar su concentración (200 μM) su capacidad de quelación (25- 26%) es más alto que el de la curcumina, gracias a su mejor solubilidad en agua. En cuanto al ensayo de quelación análogo, llevado a cabo en la mezcla de MeOH:H₂O (1:1) para los tres compuestos, se muestra un patrón de unión a Fe^{2+} similar tanto a 50 μM como a 200 μM (figura 58). A partir de estos resultados se puede concluir que los compuestos **6b** y **7b** poseen mejor capacidad de quelación sobre el hierro que la curcumina en medio acuoso, siendo esta característica interesante por su potencial de quelación de Fe^{2+} intracelular.

Los resultados obtenidos para los compuestos **6b** y **7b** tanto desde el punto de vista de su capacidad AOX, así como de su mejor perfil en lo

que respecta a las propiedades drug-like, la solubilidad, la estabilidad y la citotoxicidad han favorecido su progresión a otros estudios *in vitro* de protección en las líneas celulares SH-SY5Y y HT-22, en condiciones de estrés oxidativo producido por inhibidores de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, tales como rotenona, oligomicina, 6-hidroxidopamina y MPP⁺. Por otro lado se realizaron además, estudios de excitotoxicidad por glutamato en la línea celular HT-22.

Para poder realizar estos estudios, se realizaron una vez más, curvas de muerte de los distintos inhibidores de la cadena mitocondrial de transporte electrónico a diferentes concentraciones, con el fin de determinar la DL50.

- En cuanto a la línea celular SH-SY5Y a partir de experimentos dosis-respuesta, se estableció que la DL50 de rotenona es de 5 μM (figura 64), la de rotenona/oligomicina de 5:1 μM (figura 68), la de MPP⁺ de 700 μM (figura 72) y por último para la 6-hidroxidopamina se determinó en 250 μM (figura 76). Los resultados obtenidos para valorar la capacidad de protección de los compuestos **6b** y **7b** bajo la condición de estrés oxidativo inducido por rotenona 5 μM han demostrado que el pretratamiento con ambos derivados mejoró significativamente la viabilidad celular, teniendo el mejor perfil de inhibición de muerte celular para la concentración 20 μM (figura 64). Además, cuando se potenció el daño oxidativo de la rotenona añadiendo oligomicina (5:1 μM), los resultados han evidenciado que en ese caso es el compuesto **7b** el que mejora significativamente la viabilidad celular, viéndose una mayor protección a 20 μM (figura 68). Ahondando en la capacidad protectora de los compuestos, en el caso de la protección frente a MPP⁺ 700 μM , se vió que tanto **6b** como **7b** mostraron protección a 20 μM , mostrando el mejor perfil protector el compuesto **7b** (figura 72). Por último, frente a 6-hidroxidopamina los resultados han

indicado que únicamente **7b** a 20 μM muestra protección (figura 76).

- En los estudios similares realizados en la línea celular HT-22, a partir de experimentos dosis-respuesta se estableció que la DL50 para la combinación rotenona/oligomicina era de 10:1 μM (figura 80), y que para glutamato la DL50 era de 10 mM (figura 85). Los resultados obtenidos para valorar la capacidad de protección de los compuestos **6b** y **7b** en la línea HT-22 en condiciones de estrés oxidativo causado por la combinación rotenona/oligomicina, pusieron de manifiesto que únicamente el compuesto **7b** a una concentración de 20 μM mostraba diferencias significativas frente al control (figura 80). Por otro lado, los resultados obtenidos en el ensayo de protección de los derivados **6b** y **7b** frente a excitotoxicidad inducida por glutamato han evidenciado que tal y como se muestra en la figura 85, el compuesto **6b** muestra protección a la concentración de 30 μM y 40 μM , mientras que el compuesto **7b** ejerce una mayor protección y a menores concentraciones (10 μM y 20 μM).

Tomando estos resultados en conjunto, se puede concluir que es el compuesto **7b** el que muestra mejor capacidad de protección en distintas condiciones de estrés oxidativo tanto en la línea celular SH-SY5Y como en la línea HT-22, así como frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato. Estos datos están en concordancia con su baja actividad citotóxica y con su estructura química donde se confirmaría que el mantenimiento del grupo hidroxilo en la posición 4, junto con la introducción de flúor en las posiciones 2 y 3, mantienen la actividad neuroprotectora e incluso la mejorarían en comparación con su análogo **6b**.

Una vez determinado que **6b** y **7b** poseen un papel importante en el control del daño oxidativo mediado por distintos estresores como por ejemplo H_2O_2 , rotenona o glutamato, se procedió al estudio de los posibles mecanismos celulares implicados en el control del daño oxidativo mediado por ROS y su efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial. Se ha descrito en la bibliografía que el EO aumenta los niveles de ROS, lo que puede causar una pérdida del potencial de membrana y en consecuencia disfunción mitocondrial lo que puede causar la muerte celular.¹⁹¹ Al objeto de evaluar si los compuestos con actividad neuroprotectora del presente trabajo eran capaces de reducir los niveles intracelulares de ROS, en condiciones de EO inducido por H_2O_2 , se evaluaron dichos niveles mediante DFCH-DA en células SH-SY5Y pretratadas con los derivados **6b** y **7b** comparándolas con controles no tratados. Los resultados obtenidos durante el tratamiento crónico con H_2O_2 , ponen de manifiesto que a todas las dosis ensayadas con previo tratamiento con los compuestos, se obtuvo una reducción significativa del nivel de ROS, siendo más significativa la reducción con el compuesto **7b** (figura 89). En la figura 90, se observan los resultados obtenidos en los experimentos similares realizadas en condiciones de tratamiento agudo con H_2O_2 , y en ellos se observó también como el pretratamiento con los compuestos **6b** y **7b** demostró una disminución significativa del nivel de ROS, siendo más eficaz el compuesto **7b**. En general, se observa que esta disminución de ROS es más eficaz en el tratamiento crónico que en el agudo, por lo que de estos resultados se podría concluir que los compuestos **6b** y **7b** reducen los niveles de ROS intracelulares, y que un período previo de tratamiento más largo con los compuestos podría ser necesario para lograr una mejor reducción de los niveles intracelulares de ROS.

En cuanto a la determinación del potencial de membrana mitocondrial, se han utilizado dos técnicas diferentes de análisis, una por espectroscopia de fluorescencia y otra por citometría de flujo. Ambas aproximaciones

experimentales se realizaron en condiciones de estrés oxidativo crónico al haber establecido a partir de los resultados anteriores que los compuestos podrían ser más eficaces con tiempos de exposición más largos frente a las células SH-SY5Y.

A partir de los estudios llevados a cabo para la determinación de los cambios del potencial de membrana mitocondrial en condiciones de despolarización por estrés oxidativo mediante espectroscopia de fluorescencia, se observó, tal como se ve en la figura 91, que la inducción de EO con H_2O_2 200 μM dio lugar a una disminución del potencial de membrana de un 62%, mientras que el pretratamiento de las células con el derivado **6b** a partir de concentraciones de 20 μM y con el derivado **7b** a partir de concentraciones de 10 μM , se produjo una recuperación del potencial de membrana de entre un 18 a un 25%. Estos resultados confirmaron el efecto neuroprotector de **6b** y **7b** en línea SH-SY5Y, ya que disminuyen los niveles de ROS intracelulares y además permiten la recuperación del potencial de membrana bajo condiciones de estrés oxidativo mediado por H_2O_2 200 μM . Teniendo en cuenta que el compuesto **7b** recupera de manera más eficaz el potencial de membrana mitocondrial dañado por ROS, realizamos la técnica de citometría de flujo para confirmar estos resultados. En la figura 92 se observa una disminución en la población celular bajo condiciones de EO inducido por H_2O_2 400 μM , y que el pretratamiento con el compuesto **7b** a 20 μM y 40 μM la evita. Además el análisis cuantitativo corrobora los resultados anteriores (figura 93), evidenciando que el pretratamiento con el derivado **7b** aumenta el porcentaje de células sanas frente a las células dañadas como consecuencia de su exposición al peróxido de hidrógeno. Estos resultados confirman que el pretratamiento con el compuesto **7b** a 20 μM y 40 μM produce una recuperación significativa del potencial de membrana en la línea neuronal SH-SY5Y, respaldando que el compuesto **7b** sea uno de los mejores derivados de curcumina con posibilidades de

ser utilizado como agente preventivo para evitar las enfermedades que cursen con daño neuronal mediado por acumulación de radicales libres.

Una vez que se confirmó que **6b** y **7b** disminuyen la cantidad de ROS y mejoran el potencial de membrana se pasó a la realización de estudios para la cuantificación de biomarcadores celulares de daño oxidativo en células SH-SY5Y pretratadas con dichos compuestos en condiciones de EO. Para ello se procedió a la determinación de la cantidad de MDA y de la relación GSH/GSSG en condición de daño crónico y agudo. En estos ensayos se incluye el compuesto sin el estresor con el objetivo de estudiar el efecto persé del compuesto sobre los niveles de MDA en comparación con las células control sin estresor. En cuanto a la detección de MDA en la línea celular SH-SY5Y, en la figura 94 obtenida a partir de los resultados del tratamiento crónico con H₂O₂ se observa que el tratamiento previo con **7b** a 20 µM disminuye la cantidad de MDA con respecto al control con H₂O₂ de manera estadísticamente significativa. En la figura 95 se representa el tratamiento agudo, y en ella se puede observar también que únicamente el tratamiento con **7b** a 20 µM disminuye la cantidad de MDA con respecto al control con H₂O₂ de manera estadísticamente significativa. Además, en ambos ensayos el tratamiento de las células únicamente con los compuestos y sin el estresor mostró niveles muy similares de peroxidación lipídica en comparación al control de células sanas.

En cuanto a los niveles observados de GSH y GSSH en dichos experimentos realizados en células SH-SY5Y los resultados muestran que la relación entre ambos marcadores disminuye drásticamente en condiciones de EO, habiéndose observado una recuperación de dicha relación en todos los tratamientos (agudo y crónico) en los que se han utilizado dichos compuestos. En estos ensayos también se incluyó el compuesto sin el estresor con el objetivo de estudiar el efecto único del

compuesto sobre el ratio GSH/GSSG en comparación con las células control sin estresor. La figura 96 muestra los resultados del tratamiento crónico, y en ella se observa que el tratamiento con **7b** a 10 y 20 μM aumenta el ratio GSH/GSSG con respecto al control con H_2O_2 de forma significativa, lo que es indicativo de un aumento en de la defensa endógena celular AOX. En cuanto al tratamiento agudo los resultados obtenidos se representan en la figura 97, a partir de la cual se puede observar también, que únicamente el tratamiento con los derivados **6b** y **7b** a 20 μM disminuyen la relación GSH/GSSG con respecto al control con H_2O_2 de manera estadísticamente significativa. En ambos ensayos se observó que el tratamiento exclusivamente con los compuestos y sin el estresor muestra un ratio similar al del control de células sanas.

Al objeto de estudiar el efecto de los compuestos **6b** y **7b** sobre los niveles de expresión de las enzimas involucradas en las vías celulares de defensa endógena, se ha estudiado su expresión mediante la técnica *Western blot* en la línea SH-SY5Y bajo condiciones de daño crónico inducido por H_2O_2 . Para ello se llevó a cabo la determinación de Hmox-1, Nrf2 y Keap1 (datos mostrados en las figuras 98, 99, 100). A partir de estos estudios se ha encontrado que ambos compuestos son capaces de actuar sobre las vías endógenas de defensa celular. A partir de estos resultados se puede concluir, que en condiciones de EO por peróxido de hidrógeno ambos productos a las concentraciones de 20 μM y 40 μM reducen los niveles de expresión de estas enzimas de forma significativa, lo que corrobora el carácter AOX de dichos compuestos. El tratamiento de las células SH-SY5Y con ambos productos, sin presión de peróxido de hidrógeno, ha mostrado además niveles de expresión de dichas proteínas similares al control celular sin estrés oxidativo, lo que confirmaría que dichos compuestos a dichas concentraciones no interfieren en las vías de expresión de las defensas endógenas.

VI.CONCLUSIONES

VI.CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo de investigación desarrollado para esta tesis se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. La serie de las nuevas 1,3- β -dicetonas asimétricas, han mostrado interesantes propiedades antioxidantes en los ensayos ABTS, FRAP y DPPH.
2. Los ensayos de citotoxicidad realizados en las líneas celulares neuronales SH-SY5Y y HT-22 y en la línea hepática HepG2 han mostrado que los derivados de la serie **b** (CF₃) poseen menor citotoxicidad que los derivados de la serie **a** (Ph).
3. Por otro lado, a diferencia de los problemas fisicoquímicos que posee la curcumina, los compuestos **6b** y **7b** han demostrado una buena solubilidad y estabilidad química en medios biorelevantes, además de tener propiedades drug-like mejoradas en comparación a aquella.
4. Asimismo se ha observado que ambos derivados (**6b** y **7b**) son quelantes de hierro y que poseen un perfil similar al de la curcumina, con un mejor comportamiento quelante en medios acuosos.
5. En los ensayos de neuroprotección frente a peróxido de hidrógeno en la línea neuronal SH-SY5Y, se han identificado los compuestos **6b** y **7b** como los derivados más prometedores para la progresión a los diferentes estudios de neuroprotección frente a los diferentes inhibidores de la cadena de transporte mitocondrial.
6. En los estudios de neuroprotección realizados con los diferentes inhibidores de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, **6b** y **7b** han demostrado actividad neuroprotectora en las líneas celulares SH-SY5Y y HT-22, en diferentes condiciones de estrés oxidativo, siendo **7b** el derivado con mejor perfil neuroprotector.
7. En cuanto a la determinación de los niveles intracelulares de ROS en la línea neuronal SH-SY5Y, en condiciones crónicas y agudas

- de EO inducido por peróxido, los derivados **6b** y **7b** han mostrado una reducción de los niveles de ROS intracelulares.
8. Los compuestos **6b** y **7b** han mostrado una recuperación significativa del potencial de membrana mitocondrial en condiciones de EO crónicas y agudas inducidas por peróxido de hidrógeno.
 9. El derivado **7b** a 20 μM ha mostrado un buen perfil de disminución de MDA y ha mejorado la relación GSH/GSSG.
 10. Por último se ha observado una activación de los niveles de expresión sobre de las enzimas implicadas en las vías endógenas de defensa antioxidante (Hmox-1, Nrf2 y Keap1) en la línea celular SH-SY5Y en condiciones de crónicas de EO inducido por peróxido de hidrógeno y previo tratamiento con los derivados **6b** y **7b**.

VII.BIBLIOGRAFÍA

VII.BIBLIOGRAFÍA

1. Zaltieri, M. *et al.* Mitochondrial Dysfunction and α -Synuclein Synaptic Pathology in Parkinson's Disease: Who's on First? *Parkinsons. Dis.* **2015**, 1–10 (2015).
2. S. costanzo, L. *Fisiología.* (2011).
3. Kovacs, G. G. *Concepts and classification of neurodegenerative diseases. Handbook of Clinical Neurology* **145**, (Elsevier B.V., 2017).
4. Emerit, J., Edeas, M. & Bricaire, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacother.* **58**, 39–46 (2004).
5. Segura, T., Galindo, M. F., Rallo-Gutiérrez, B., Ceña, V. & Jordán, J. [Pharmacological targets in neurodegenerative diseases]. *Rev. Neurol.* **36**, 1047–57 (2003).
6. Informe Neuroalianza - Estudio sobre las enfermedades neurodegenerativas en España y su impacto económico y social. (2016). Available at: <http://neuroalianza.org/wp-content/uploads/Informe-NeuroAlianza-Completo-v-5-optimizado.pdf>. (Accessed: 11th September 2018)
7. Datos y cifras | Español | Alzheimer's Association. Available at: <https://www.alz.org/alzheimer-demencia/hechos-y-cifras?lang=es-MX>. (Accessed: 16th November 2019)
8. Sibener, L. *et al.* Alzheimer's Disease prevalence, costs, and prevention for military personnel and veterans. *Alzheimers. Dement.* **10**, S105-10 (2014).
9. Benito-Leon, J. [Epidemiology of Parkinson's disease in Spain and its contextualisation in the world]. *Rev. Neurol.* **66**, 125–134 (2018).
10. García-Ramos, R., López Valdés, E., Ballesteros, L., Jesús, S. & Mir, P. Informe de la Fundación del Cerebro sobre el impacto social de la enfermedad de Parkinson en España. *Neurología* **31**, 401–413 (2016).
11. Marras, C. *et al.* Prevalence of Parkinson's disease across North America. *npj Park. Dis.* **4**, 21 (2018).
12. Martínez-Fernández, R., Carmen Gasca-Salas, D. C., Sánchez-Ferro, Á. & Ángel Obeso, J. Actualización en la enfermedad de Parkinson. *Revista Médica Clínica Las Condes* **3**, 363–379 (2016).
13. Fagoaga, J., Girabent-Farres, M. & Bagur-Calafat, C. [Translation and validation of the Individualised Neuromuscular Quality of Life scale for the Spanish population: quality of life assessment for persons with neuromuscular diseases]. *Rev. Neurol.* **64**, 194–200 (2017).

14. Valko, K. & Ciesla, L. Amyotrophic lateral sclerosis. *Prog. Med. Chem.* **58**, 63–117 (2019).
15. Traynor, B. J. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis mimic syndromes: a population-based study. *Arch. Neurol.* **57**, 109–13 (2000).
16. Karussis, D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. *J. Autoimmun.* **48–49**, 134–142 (2014).
17. Kritsilis, M. *et al.* Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2937 (2018).
18. Kulshreshtha, A. & Piplani, P. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Neurol. Sci.* **37**, 1403–35 (2016).
19. Lane, C. A., Hardy, J. & Schott, J. M. Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **25**, 59–70 (2018).
20. Yu, J.-T., Tan, L. & Hardy, J. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. *Annu. Rev. Neurosci.* **37**, 79–100 (2014).
21. Chico, L. *et al.* Oxidative stress and APO E polymorphisms in Alzheimer's disease and in mild cognitive impairment. *Free Radic. Res.* **47**, 569–576 (2013).
22. Johnson, K. E. Approach to the Patient with Parkinson Disease. *Prim. Care Clin. Off. Pract.* **42**, 205–215 (2015).
23. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease : Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
24. Sveinbjornsdottir, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 318–324 (2016). doi:10.1111/jnc.13691
25. Kulisevsky, J. & Pagonabarraga, J. Cognitive impairment in Parkinson's disease: tools for diagnosis and assessment. *Mov. Disord.* **24**, 1103–10 (2009).
26. Park, A. & Stacy, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J. Neurol.* **256 Suppl 3**, 293–8 (2009).
27. Kummer, A., Cardoso, F. & Teixeira, A. L. Loss of Libido in Parkinson's Disease. *J. Sex. Med.* **6**, 1024–1031 (2009).
28. Clínica de la enfermedad de Parkinson | NeuroWikia. Available at: <http://www.neurowikia.es/content/clínica-de-la-enfermedad-de-parkinson>. (Accessed: 26th September 2018)
29. Thenganatt, M. A. & Jankovic, J. Parkinson Disease Subtypes. *JAMA Neurol.* **71**, 499 (2014).
30. Olivero, P. *et al.* Proteostasis and Mitochondrial Role on Psychiatric and Neurodegenerative Disorders: Current Perspectives. *Neural*

- Plast.* **2018**, 1–10 (2018).
31. Nah, J., Yuan, J. & Jung, Y.-K. Autophagy in Neurodegenerative Diseases: From Mechanism to Therapeutic Approach. *Mol. Cells* **38**, 381–389 (2015).
 32. Jan, A. T. *et al.* Perspective Insights of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: A Critical Appraisal. *Front. Aging Neurosci.* **9**, 317 (2017).
 33. Kupfer, L., Hinrichs, W. & Groschup, M. H. Prion protein misfolding. *Curr. Mol. Med.* **9**, 826–35 (2009).
 34. Corrales MSc, L. C. & Muñoz Ariza, M. M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova* **10**, 213 (2012).
 35. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J. & Yoon, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* **24**, 325 (2015).
 36. Whitehouse, P. J. *et al.* Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* **215**, 1237–9 (1982).
 37. Iqbal, K. *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1739**, 198–210 (2005).
 38. Gomperts, S. N. Lewy Body Dementias. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **22**, 435–463 (2016).
 39. Korolev, I. O. Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Med. Student Res. J.* **04**, (2014).
 40. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (80-.)*. **308**, 1314–1318 (2005).
 41. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science (80-.)*. **297**, 353–356 (2002).
 42. Serý, O., Povová, J., Míšek, I., Pešák, L. & Janout, V. Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia Neuropathol.* **51**, 1–9 (2013).
 43. Smith, M. A. *et al.* Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J. Neurochem.* **70**, 2212–5 (1998).
 44. Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B. & Lippa, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408–14 (1982).

45. Ozawa, S., Kamiya, H. & Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **54**, 581–618 (1998).
46. Mayer, M. L. Glutamate receptor ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* **15**, 282–288 (2005).
47. Beal, M. F. Mechanisms of excitotoxicity in neurologic diseases. *FASEB Journal* **6**, 3338–3344 (1992).
48. Zarros, A. C., Kalopita, K. S. & Tsakiris, S. T. Serotonergic impairment and aggressive behavior in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. **65**, 277–86 (2005).
49. Mohandas, E., Rajmohan, V. & Raghunath, B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J. Psychiatry* **51**, 55–61 (2009).
50. Shi, L. *et al.* Cumulative effects of the ApoE genotype and gender on the synaptic proteome and oxidative stress in the mouse brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **17**, 1863–1879 (2014).
51. Perry, G. *et al.* La función del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. *Rev. Chil. Neuropsiquiatr.* **41**, 47–62 (2003).
52. Vekrellis, K., Xilouri, M., Emmanouilidou, E. & Stefanis, L. Inducible over-expression of wild type α -synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death. *J. Neurochem.* **109**, 1348–1362 (2009).
53. Bellucci, A. *et al.* Induction of the unfolded protein response by α -synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **116**, 588–605 (2011).
54. Dryanovski, D. I. *et al.* Calcium entry and α -synuclein inclusions elevate dendritic mitochondrial oxidant stress in dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* **33**, 10154–64 (2013).
55. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).
56. Cebrián, C., Loike, J. D. & Sulzer, D. Neuroinflammation in parkinson's disease animal models: A cell stress response or a step in neurodegeneration? *Curr. Top. Behav. Neurosci.* **22**, 237–270 (2014).
57. Polymeropoulos, M. H. *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* **276**, 2045–7 (1997).
58. Zeng, X.-S., Geng, W.-S., Jia, J.-J., Chen, L. & Zhang, P.-P. Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration in Parkinson Disease. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 109 (2018).

59. Ferreira, M. & Massano, J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. *Acta Neurol. Scand.* **135**, 273–284 (2017).
60. Li, L. & Hu, G. Pink1 protects cortical neurons from thapsigargin-induced oxidative stress and neuronal apoptosis. *Biosci. Rep.* **35**, 1–8 (2015).
61. Matsuda, N. *et al.* PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* **189**, 211–21 (2010).
62. Mouton-Liger, F., Jacoupy, M., Corvol, J.-C. & Corti, O. PINK1/Parkin-Dependent Mitochondrial Surveillance: From Pleiotropy to Parkinson's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 120 (2017).
63. Biosa, A. *et al.* Recent findings on the physiological function of DJ-1: Beyond Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **108**, 65–72 (2017).
64. Gandhi, S. & Abramov, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2012). doi:10.1155/2012/428010
65. Boveris, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (B. Aires)*. **58**, 350–6 (1998).
66. *Introducción a la química farmacéutica.* (McGraw-Hill/Interamericana, 2001).
67. Angoso, M. C. ¿Por qué envejecemos? (2008). Available at: http://portal.uned.es/portal/page?_pageid=93,25140344&_dad=portal&_schema=PORTAL. (Accessed: 16th November 2019)
68. Babior, B. M. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 42–7 (2004).
69. Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 774–97 (2002).
70. Edmondson, D. E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A. K. & Mattevi, A. Molecular and Mechanistic Properties of the Membrane-Bound Mitochondrial Monoamine Oxidases. *Biochemistry* **48**, 4220–4230 (2009).
71. Fernando Paredes Salido, J. José R. F. Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular. *Offam Farm. y Soc.* **21**, 96–100 (2002).
72. Di Marzo, N., Chisci, E. & Giovannoni, R. The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. *Cells* **7**, 156 (2018).
73. Fridovich, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* **201**,

- 1203–9 (1998).
74. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol.* **1**, 244–257 (2013).
 75. Johnson, M. E. & Bobrovskaya, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. *Neurotoxicology* **45**, 101–116 (2015).
 76. Duty, S. & Jenner, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1357–1391 (2011).
 77. Li, N. *et al.* Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. *J. Biol. Chem.* **278**, 8516–8525 (2003).
 78. Degli Esposti, M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 222–35 (1998).
 79. Höglinger, G. U. *et al.* Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: Interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **86**, 1297–1307 (2003).
 80. Ruas, J. S. *et al.* Underestimation of the maximal capacity of the mitochondrial electron transport system in oligomycin-treated cells. *PLoS One* **11**, (2016).
 81. Kim-Han, J. S., Antenor-Dorsey, J. A. & O'Malley, K. L. The parkinsonian mimetic, MPP+, specifically impairs mitochondrial transport in dopamine axons. *J. Neurosci.* **31**, 7212–7221 (2011).
 82. Ali, S. F., David, S. N., Newport, G. D., Cadet, J. L. & Slikker, W. MPTP- induced oxidative stress and neurotoxicity are age- dependent: Evidence from measures of reactive oxygen species and striatal dopamine levels. *Synapse* **18**, 27–34 (1994).
 83. Singer, T. P., Castagnoli, N., Ramsay, R. R. & Trevor, A. J. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* **49**, 1–8 (1987).
 84. Cohen, G. Monoamine oxidase and oxidative stress at dopaminergic synapses. *J. neural Transm.* **32**, 229–238 (1990).
 85. Thoenen, H. & Tranzer, J. P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-Hydroxydopamine. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **261**, 271–88 (1968).
 86. Budzinska, K. & Andrzejewski, K. Respiratory activity in the 6-

- hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. **74**, 67–81 (2014).
87. Storch, A., Kaftan, A., Burkhardt, K. & Schwarz, J. 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *J. Neural Transm.* **107**, 0281–0293 (2000).
 88. Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M. & Villanueva-Olivo, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurol. (English Ed)*. **32**, 533–539 (2017).
 89. Boix, J., Padel, T. & Paul, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice - Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behav. Brain Res.* **284**, 196–206 (2015).
 90. Huang, D., Ou, B. & Prior, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856 (2005).
 91. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
 92. Aguilar, T. A. F., Navarro, B. C. H. & Pérez, J. A. M. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. in *A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf2* 3–20 (2016).
 93. Al-Kayiem, A. H. H. & Ibrahim, M. A. The influence of the equivalent hydraulic diameter on the pressure drop prediction of annular test section. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **100**, 595–603 (2015).
 94. Kabel, A. M. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World J. Nutr. Heal.* **2**, 35–38 (2014).
 95. Dröge, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2002).
 96. Zhang, S., Rocourt, C. & Cheng, W. H. Selenoproteins and the aging brain. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 253–260 (2010).
 97. Cardoso, B. R., Hare, D. J., Bush, A. I. & Roberts, B. R. Glutathione peroxidase 4: A new player in neurodegeneration? *Molecular Psychiatry* **22**, 328–335 (2017).
 98. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
 99. Van Houten, B., Woshner, V. & Santos, J. H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* **5**, 145–152 (2006).
 100. Voets, A. M. *et al.* Transcriptional changes in OXPHOS complex I deficiency are related to anti-oxidant pathways and could explain the

- disturbed calcium homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**, 1161–1168 (2012).
101. Hauser, D. N. & Hastings, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol. Dis.* **51**, 35–42 (2013).
 102. Lewerenz, J. *et al.* Mitochondrial function and energy metabolism in neuronal HT22 cells resistant to oxidative stress. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 2147–2158 (2013).
 103. Lin, M. T. & Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787–795 (2006).
 104. Bratic, A. & Larsson, N.-G. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957 (2013).
 105. Kovacic, P. & Somanathan, R. Redox Processes in Neurodegenerative Disease Involving Reactive Oxygen Species. *Curr. Neuropharmacol.* **10**, 289–302 (2012).
 106. Thanan, R. *et al.* Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 193–217 (2014).
 107. Ayala, A., Muñoz, M. F. & Argüelles, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 360438 (2014).
 108. Forman, H. J., Zhang, H. & Rinna, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine* **30**, 1–12 (2009).
 109. Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Fanti, P. & Rossi, R. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nat. Protoc.* **8**, 1660–1669 (2013).
 110. Dringen, R. & Hirrlinger, J. Glutathione Pathways in the Brain *Biological Chemistry.* **384**, 505–516 (2003).
 111. Gülçin, İ. Measurement of antioxidant ability of melatonin and serotonin by the DMPD and CUPRAC methods as trolox equivalent. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **23**, 871–876 (2008).
 112. Gu, F., Chauhan, V. & Chauhan, A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **18**, 89–95 (2015).
 113. Suzuki, Y. J., Carini, M. & Butterfield, D. A. Protein carbonylation. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 323–5 (2010).
 114. Elbirt, K. K. & Bonkovsky, H. L. Heme Oxygenase: Recent Advances in Understanding Its Regulation and Role. *Proc. Assoc. Am.*

- Physicians* **111**, 438–447 (1999).
115. Jazwa, A. & Cuadrado, A. Targeting Heme Oxygenase-1 for Neuroprotection and Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Curr. Drug Targets* **11**, 1517–1531 (2010).
 116. Poss, K. D. & Tonegawa, S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10919–10924 (1997).
 117. Fainstein, K. & Fainstein, M. K. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Rev. Educ. Bioquímica* **26**, 18–25 (2007).
 118. Paladino, S., Conte, A., Caggiano, R., Pierantoni, G. M. & Faraonio, R. Nrf2 pathway in age-related neurological disorders: Insights into MicroRNAs. *Cellular Physiology and Biochemistry* **47**, 1951–1976 (2018).
 119. Fão, L., Mota, S. I. & Rego, A. C. Shaping the Nrf2-ARE-related pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ageing Res. Rev.* **54**, 100942 (2019).
 120. Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E. & Starkov, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry. (Mosc.)* **70**, 200–14 (2005).
 121. Loschen, G., Flohé, L. & Chance, B. Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. *FEBS Lett.* **18**, 261–264 (1971).
 122. Tretter, L. & Adam-Vizi, V. Generation of Reactive Oxygen Species in the Reaction Catalyzed by α -Ketoglutarate Dehydrogenase. *J. Neurosci.* **24**, 7771–7778 (2004).
 123. Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E. & Gómez-Serranillos, M. P. Mitochondria-Targeted Protective Compounds in Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 1–30 (2015).
 124. Zhu, Z.-G. *et al.* The efficacy and safety of coenzyme Q10 in Parkinson's disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Neurol. Sci.* **38**, 215–224 (2017).
 125. Islam, M. T. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol. Res.* **39**, 73–82 (2017).
 126. Moneim, A. E. A. Oxidant/Antioxidant imbalance and the risk of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **12**, 335–49 (2015).
 127. Polidori, M. C. & Nelles, G. Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease - challenges and perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 3083–92 (2014).

128. Tenorio Jiménez, C. *et al.* Nutr Clin Med. *Clin Med* **XI**, 96–113 (2017).
129. Ding, Y. *et al.* Natural Molecules From Chinese Herbs Protecting Against Parkinson's Disease via Anti-oxidative Stress. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 246 (2018).
130. Ak, T. & Gülçin, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* **174**, 27–37 (2008).
131. Velmurugan, B., Rathinasamy, B., Lohanathan, B., Thiyagarajan, V. & Weng, C.-F. Neuroprotective Role of Phytochemicals. *Molecules* **23**, 2485 (2018).
132. Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J. & Srimal, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci.* **78**, 2081–2087 (2006).
133. Thiyagarajan, M. & Sharma, S. S. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* **74**, 969–85 (2004).
134. Tang, M. & Taghibiglou, C. The Mechanisms of Action of Curcumin in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **58**, 1003–1016 (2017).
135. Bukhari, S. N. A. & Jantan, I. Synthetic Curcumin Analogs as Inhibitors of β -Amyloid Peptide Aggregation: Potential Therapeutic and Diagnostic Agents for Alzheimer's Disease. *Mini Rev. Med. Chem.* **15**, 1110–21 (2015).
136. Singh, P. K. *et al.* Curcumin Modulates α -Synuclein Aggregation and Toxicity. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 393–407 (2013).
137. Liu, W. *et al.* Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J. Drug Target.* **24**, 694–702 (2016).
138. Nieto, C. I. *et al.* The structure of β -diketones related to curcumin determined by X-ray crystallography, NMR (solution and solid state) and theoretical calculations. *Struct. Chem.* **27**, 705–730 (2016).
139. Nieto, C. I. *et al.* Evaluation of the antioxidant and neuroprotectant activities of new asymmetrical 1,3-diketones. *Molecules* **23**, (2018).
140. Priyadarsini, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules* **19**, 20091–20112 (2014).
141. Schneider, C., Gordon, O. N., Edwards, R. L. & Luis, P. B. Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 7606–7614 (2015).
142. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **19**, 669–675 (2006).

143. Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *LWT - Food Sci. Technol.* **30**, 609–615 (1997).
144. Prior, R. L., Wu, X. & Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302 (2005).
145. Tian, X. & Schaich, K. M. Effects of Molecular Structure on Kinetics and Dynamics of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay with ABTS^{•+}. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 5511–5519 (2013).
146. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–7 (1999).
147. Pulido, R., Bravo, L. & Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3396–3402 (2000).
148. Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76 (1996).
149. Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M. & García-Parrilla, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* **71**, 230–235 (2007).
150. Xicoy, H., Wieringa, B. & Martens, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson’s disease research: a systematic review. *Mol. Neurodegener.* **12**, 10 (2017).
151. Kovalevich, J. & Langford, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol. Biol.* **1078**, 9–21 (2013).
152. Morimoto, B. H. & Koshland, D. E. Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. *Neuron* **5**, 875–80 (1990).
153. Davis, J. B. & Maher, P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* **652**, 169–173 (1994).
154. Liu, J., Li, L. & Suo, W. Z. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* **84**, 267–271 (2009).
155. Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I. & Knowles, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line [15]. *Nature* **282**, 615–616 (1979).

156. Donato, M. T., Tolosa, L. & Gómez-Lechón, M. J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1250**, 77–93 (2015).
157. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).
158. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* 1–25 (2004).
159. Mario, Ferrari., Maria Chiara, Fornasiero. & Anna Maria, Isetta. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods* **131**, 165–172 (1990).
160. Lobner, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: Validity for neuronal apoptosis? *J. Neurosci. Methods* **96**, 147–152 (2000).
161. Allen, M., Millett, P., Dawes, E. & Rushton, N. Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers in vitro. *Clin. Mater.* **16**, 189–194 (1994).
162. Dinis, T. C., Maderia, V. M. & Almeida, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **315**, 161–9 (1994).
163. Wang, H. & Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 612–6 (1999).
164. Wang, H. & Joseph, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 612–616 (1999).
165. Johnson, L. V., Walsh, M. L., Bockus, B. J. & Chen, L. B. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **88**, 526–535 (1981).
166. Barbier, M., Gray, B. D., Muirhead, K. a, Ronot, X. & Boutonnat, J. A flow cytometric assay for simultaneous assessment of drug efflux, proliferation, and apoptosis. *Cytometry B. Clin. Cytom.* **59**, 46–53 (2004).
167. Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. & Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: Implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett.* **411**, 77–82 (1997).
168. Perelman, A. *et al.* JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate

- mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* **3**, 1–7 (2012).
169. Janero, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 515–540 (1990).
170. Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R. & Prenzler, P. D. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chem.* **230**, 195–207 (2017).
171. Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1–85 (1990).
172. Grotto, D. *et al.* Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim. Nova* **32**, 169–174 (2009).
173. Olson, B. J. S. C. & Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **48**, 3.4.1-3.4.29 (2007).
174. Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores, L., Rodriguez-Rocha, H. & Franco, R. Thiol-Redox Signaling, Dopaminergic Cell Death, and Parkinson's Disease. *Antioxid. Redox Signal.* **17**, 1764–1784 (2012).
175. Jiang, R., Hodgson, J. M., Mas, E., Croft, K. D. & Ward, N. C. Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *J. Nutr. Biochem.* **27**, 53–60 (2016).
176. Suzuki, T. & Yamamoto, M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. *Free Radical Biology and Medicine* **88**, 93–100 (2015).
177. Dong, W. *et al.* Curcumin plays neuroprotective roles against traumatic brain injury partly via Nrf2 signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **346**, 28–36 (2018).
178. Menon, V. P. & Sudheer, A. R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Mol. Targets Ther. Uses Curcumin Heal. Dis.* **595**, 105–125 (2007).
179. Forrest, V. J., Kang, Y.-H., McClain, D. E., Robinson, D. H. & Ramakrishnan, N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 675–684 (1994).
180. Wager, T. T., Hou, X., Verhoest, P. R. & Villalobos, A. Moving beyond rules: The development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem. Neurosci.* **1**, 435–449 (2010).
181. Meanwell, N. A. Improving Drug Design: An Update on Recent

- Applications of Efficiency Metrics, Strategies for Replacing Problematic Elements, and Compounds in Nontraditional Drug Space. *Chemical Research in Toxicology* **29**, 564–616 (2016).
182. Hoelke, B., Gieringer, S., Arlt, M. & Saal, C. Comparison of Nephelometric, UV-Spectroscopic, and HPLC Methods for High-Throughput Determination of Aqueous Drug Solubility in Microtiter Plates. *Anal. Chem.* **81**, 3165–3172 (2009).
 183. Martin, F. L. *et al.* Fe(II)-induced DNA damage in alpha-synuclein-transfected human dopaminergic BE(2)-M17 neuroblastoma cells: detection by the Comet assay. *J. Neurochem.* **87**, 620–30 (2003).
 184. Telling, N. D. *et al.* Iron Biochemistry is Correlated with Amyloid Plaque Morphology in an Established Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cell Chem. Biol.* **24**, 1205–1215.e3 (2017).
 185. Li, W., Jiang, H., Song, N. & Xie, J. Oxidative stress partially contributes to iron-induced α -synuclein aggregation in SK-N-SH cells. *Neurotox. Res.* **19**, 435–42 (2011).
 186. Barua, S., Kim, J. Y., Yenari, M. A. & Lee, J. E. The role of NOX inhibitors in neurodegenerative diseases. *IBRO Reports* **7**, 59–69 (2019).
 187. Venkatesan, P. & Rao, M. N. Structure-activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* **52**, 1123–8 (2000).
 188. Sreejayan, N. & Rao, M. N. A. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* **46**, 169–171 (1996).
 189. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* **28**, 25–30 (1995).
 190. Ligeret, H. *et al.* Fluoride curcumin derivatives: new mitochondrial uncoupling agents. *FEBS Lett.* **569**, 37–42 (2004).
 191. Teodoro, J. S., Palmeira, C. M. & Rolo, A. P. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) fluctuations associated with the metabolic states of mitochondria. *Methods Mol. Biol.* **1782**, 109–119 (2018).