



Marta Ruiz Oltra, Mariano Ros Martínez y Mª Encarna Martínez Madrid. IES-Alcántara (Alcantarilla, Murcia). Tutor-IES: Luis A. García. Tutores-investigadores: Dr. Juan Carlos Espín y Dr. Antonio González-Sarriás. Ciencia y Tecnología de Alimentos (CEBAS-CSIC); Espinardo (Murcia).

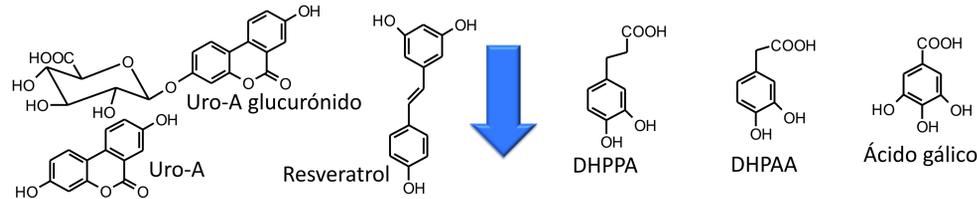
## INTRODUCCIÓN

- Investigaciones demuestran que el estrés oxidativo juega un papel importante en la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y de Alzheimer (1).
- El estrés oxidativo se caracteriza por la acumulación de especies reactivas que desencadenan muerte celular, mayoritariamente por apoptosis. En el cerebro, esto conduce a la pérdida masiva de neuronas que conlleva un deterioro motor, cognitivo y finalmente demencia (1).
- Los polifenoles, abundantes en frutas y hortalizas, son los principales antioxidantes de la dieta. También son conocidas sus propiedades anticancerígenas y anti-inflamatorias.
- Diversos estudios también sugieren protección frente a neurodegeneración (2). Sin embargo, tras su ingesta, los polifenoles no llegan al cerebro pues son metabolizados a moléculas más simples con actividad biológica inferior (3).
- Algunos de estos metabolitos, detectados en cerebro de animales, conservan cierta actividad biológica pero no se han demostrado sus efectos neuroprotectores.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### HIPÓTESIS

Metabolitos de polifenoles de la dieta, que circulan por el organismo y llegan al cerebro, pueden proteger a células nerviosas frente a muerte celular inducida por estrés oxidativo



### OBJETIVO PRINCIPAL

**Evaluar el efecto neuroprotector de metabolitos derivados de polifenoles, en condiciones fisiológicamente relevantes, frente a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células de neuroblastoma SH-SY5Y**

## MÉTODOS Y RESULTADOS

Se ensayaron los metabolitos urolitina-A (Uro-A), glucurónido de Uro-A (Uro-A glur), resveratrol (Resv), Resv-sulfato, dihidroresveratrol (DHR), glucurónido de DHR (DHR-glur), ácido dihidroxifenil acético (DHPAA), ácido dihidroxifenil propiónico (DHPPA) y ácido gálico; todos a concentraciones fisiológicamente relevantes y no citotóxicas (10 µM), en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y. Se evaluaron efectos en: viabilidad celular, estado REDOX intracelular, acumulación de especies reactivas (ROS), apoptosis y activación de caspasas.

Como inductor de estrés oxidativo se utilizó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrógeno, 100 µM). Las células se incubaron con los metabolitos durante 6 h (pre-tratamiento) y después con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h; o bien se trataron directamente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h sin la pre-incubación (co-tratamiento). Los resultados más relevantes se obtuvieron con el pre-tratamiento.

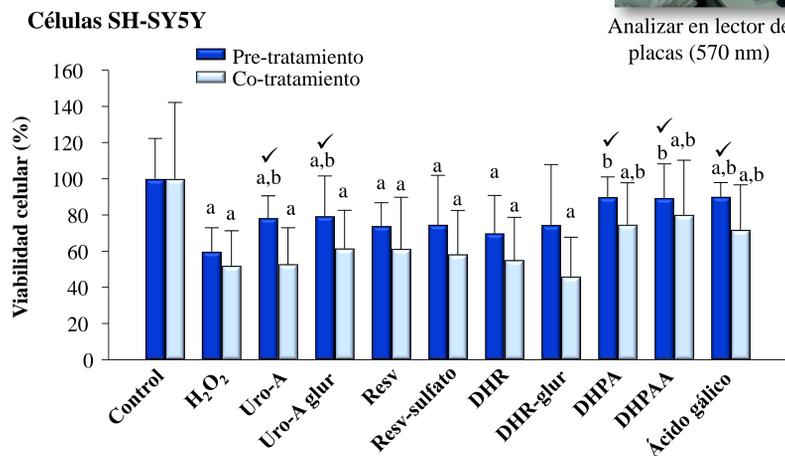
### Viabilidad celular



**Método MTT**  
(Sólo las células vivas pueden reducir metabólicamente este colorante)

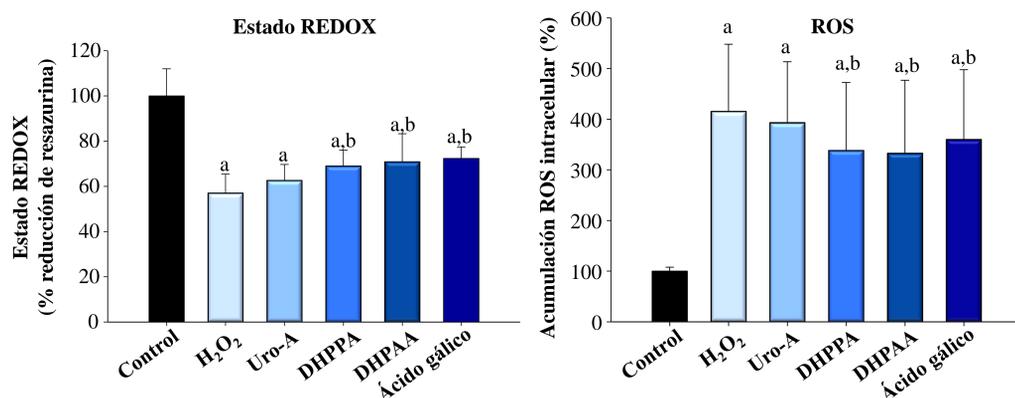


Analizar en lector de placas (570 nm)



### Estado REDOX y acumulación de ROS

Evaluamos la acumulación de ROS con H<sub>2</sub>DCFH-DA y el estado REDOX mediante la reducción de resazurina



❖ DHPAA, DHPAA y ácido gálico amortiguaron la caída del estado REDOX celular respecto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que se tradujo en una menor acumulación de ROS intracelular.  
(a, diferente del control; b, diferente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; a,b, diferente de los dos)

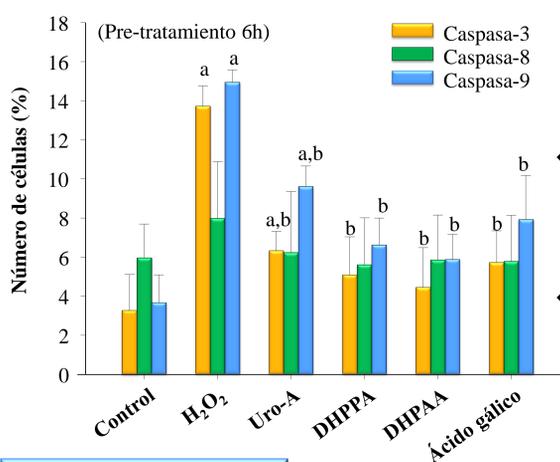
❖ Los resultados muestran que Uro-A glur, Uro-A, DHPAA, DHPAA y ácido gálico (especialmente los tres últimos) son los que mayor protección presentan tanto en pre-tratamiento como en co-tratamiento.

(a, diferente del control; b, diferente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; a,b, diferente de los dos)

### Activación caspasas

Evaluamos si la ruta de inducción de la apoptosis es intrínseca (mitocondrial), extrínseca (mediada por receptores) o ambas, evaluando la activación de la caspasa-8, la caspasa-9 y la caspasa-3 mediante citometría de flujo y tinción FLICA.

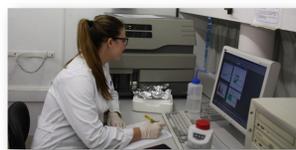
(a, diferente del control; b, diferente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; a,b, diferente de los dos)



❖ El estrés oxidativo activa preferentemente las caspasas 3 (ejecutora final) y la 9 (vía mitocondrial).

❖ Los metabolitos previenen apoptosis al amortiguar dicha activación.

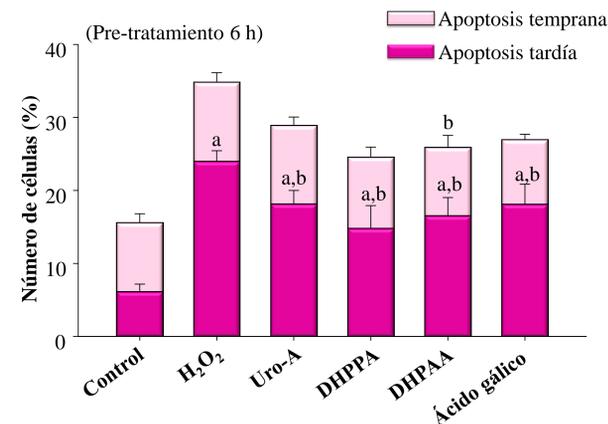
### Apoptosis



La proporción de células apoptóticas se evaluó mediante citometría de flujo y usando el kit de la Anexina-yoduro de propidio.

❖ Los metabolitos ensayados disminuyeron de forma significativa el porcentaje de células especialmente en apoptosis tardía.

(a, diferente del control; b, diferente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; a,b, diferente de los dos)



## CONCLUSIONES

- Por primera vez se ha descrito el potencial neuroprotector de ciertos metabolitos derivados de polifenoles de la dieta al prevenir muerte celular inducida por estrés oxidativo.
- Los metabolitos más activos fueron DHPAA, DHPAA y ácido gálico; previniendo la apoptosis mediada por estrés oxidativo.
- Se establecen las bases para estudios *in vivo* que confirmen el potencial aquí descrito.

**Nuestros resultados sugieren que una dieta rica en alimentos como las fresas, nueces, cacao y té, con polifenoles precursores de DHPAA, DHPAA y ácido gálico, podría contribuir a disminuir el estrés oxidativo en el sistema nervioso, asociado a enfermedades neurodegenerativas**

### BIBLIOGRAFÍA

- Rosini et al. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: are we connecting the dots? *J Med Chem.* 57:2821-31.
- Pandareesh et al. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. *Neurochem Int.* 89:198-208.
- Tomé-Carneiro et al. (2013). Resveratrol and clinical trials: the crossroad from *in vitro* studies to human evidence. *Curr Pharm Des.* 19:6064-93.

**AGRADECIMIENTOS:** Esta investigación ha sido financiada por el Proyecto AGL2011-22447 del grupo del CEBAS-CSIC que ha supervisado esta investigación.