

ESTUDIO DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN LA NEUROPROTECCIÓN FRENTE AL β -AMILOIDE

Study of Antioxidant Compounds in Neuroprotection Against β -Amyloid

Antonio GUTIÉRREZ ALCANTUD 

Rebeca LAPRESA* 

Jesús AGULLA 

Sonia GONZÁLEZ GUERRERO 

Ángeles ALMEIDA* 

Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), CSIC-Universidad de Salamanca, 37007, Salamanca, España

Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL), Hospital Clínico Universitario de Salamanca, 37007, Salamanca, España.

* Correos-e: aaparra@usal.es, rebecalrg@usal.es

RESUMEN: La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo, caracterizado por la disfunción cognitiva, cuya prevalencia aumenta diariamente. Sus mecanismos fisiopatológicos descritos incluyen la acumulación de beta-amiloide y el estrés oxidativo.

En este trabajo estudiamos la relación de dichos elementos con la proteína Bmal1, elemento del reloj circadiano central que puede alterar el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Asimismo, se probaron compuestos alcaloides pirrocicidínicos con actividad antioxidante y posible potencial neuroprotector de la empresa Instituto Biomar S.A.

En cultivos neuronales tratados con beta-amiloide se estudió la variación de Bmal1 en medios con y sin antioxidantes mediante Western-Blot, observándose que en medio con antioxidantes se mantuvieron sus niveles. En estos cultivos, el tratamiento con los compuestos experimentales CL0179 y CL0670 logró mantener los niveles de Bmal1. Además, se cuantificó la

apoptosis mediante caspasa-3, evidenciando su disminución en los cultivos tratados.

Estos resultados esclarecen la relación beta-amiloide, Bmal1 y estrés oxidativo. Como indica bibliografía anterior, el beta-amiloide disminuye los niveles de Bmal1 en cultivos neuronales y el estrés oxidativo puede ser determinante en la muerte neuronal influenciada por acumulación de beta-amiloide. Los compuestos testados muestran actividad neuroprotectora, posiblemente mediada por el mantenimiento de Bmal1, abriendo una vía para el desarrollo de nuevos tratamientos contra patologías neurodegenerativas.

Palabras clave: alcaloides; enfermedad de Alzheimer; beta-amiloide; Bmal; estrés oxidativo.

ABSTRACT: Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder, mainly known for cognitive dysfunction, whose prevalence increases daily. Its described pathophysiological mechanisms include beta-amyloid accumulation and oxidative stress.

In this study, we investigated the relationship between these elements and the Bmal1 protein, a component of the central circadian clock that can alter the development of neurodegenerative diseases. We also tested two pyrroloquinoline alkaloid compounds with antioxidant activity and possible neuroprotective potential from the company Instituto Biomar S.A.

In neuronal cultures treated with beta-amyloid, we studied the variation of Bmal1 in media with and without antioxidants using Western blot, observing that its levels were maintained in media with antioxidants. In these cultures, treatment with the experimental compounds CL0179 and CL0670 managed to maintain Bmal1 levels. Apoptosis was also quantified using caspase-3, showing a decrease in the treated cultures.

These results clarify the relationship between beta-amyloid, Bmal1 and oxidative stress. As indicated in previous literature, beta-amyloid decreases Bmal1 levels in neuronal cultures, and oxidative stress may be a determining factor in neuronal death associated with beta-amyloid accumulation. The tested compounds show neuroprotective activity, possibly mediated by the maintenance of Bmal1, opening a pathway for the development of new therapeutic strategies.

Keywords: alkaloids; Alzheimer's disease; beta-amyloid; Bmal; oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo que actualmente supone la primera causa de demencia (Jack *et al.*, 2018), su prevalencia en 2018 se estimó globalmente en unos 50 millones de personas afectadas y se prevé que se duplicará en Europa para el año 2050 (Scheltens *et al.*, 2021).

Sus principales manifestaciones clínicas incluyen la disfunción cognitiva y pérdida de memoria (Bai *et al.*, 2022). Sin embargo, una de las manifestaciones más tempranas y que puede emplearse como marcador predictivo, son las alteraciones de los ritmos circadianos tales como cambios en la temperatura corporal o en el horario de sueño (Bliwise *et al.*, 1993).

Histológicamente, esta enfermedad se caracteriza por la acumulación de beta-amiloide (β A) en placas seniles extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada (Bai *et al.*, 2022). Un evento temprano en la fisiopatología de la EA es el aumento del estrés oxidativo (Iliyasu *et al.*, 2023), que se ve aumentado con la acumulación progresiva de β A. Este, por interacción con iones metálicos y por la disfunción mitocondrial, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño oxidativo, favoreciendo la progresión del daño en la patología (Cheignon *et al.*, 2018).

En este contexto cobra importancia la proteína Bmal1, elemento indispensable del reloj circadiano en mamíferos (Song *et al.*, 2015), regulador de la homeostasis redox, la respuesta inflamatoria y la función mitocondrial (Welz *et al.*, 2019). La pérdida de Bmal1 presenta efectos adversos en astrocitos, microglía, neuronas y pericitos, aumentando el estrés oxidativo, la inflamación y la señalización por neurotransmisores. Esto justifica el aumento de neurodegeneración asociada al Alzheimer y otros tipos de demencia en caso de pérdida de Bmal1 (Fan *et al.*, 2022). Además, se ha determinado que el β A induce la degradación de la proteína Bmal1. Esto sucede por sumoilación de la misma, que controla la estabilidad y degradación de dicha proteína. Este proceso se ve aumentado en condiciones de estrés oxidativo (Song *et al.*, 2015).

En nuestro grupo, en colaboración con la empresa Instituto Biomar S.A, hemos identificado y patentado (EP19382179.0) una nueva familia de alcaloides pirrocidínicos, incluyendo al compuesto CL0179 y su análogo estructural CL0670, con actividad antioxidante y neuroprotectora en neuronas sometidas a un modelo de excitotoxicidad *in vitro*. Por tanto, decidimos testar el efecto neuroprotector de ambos compuestos frente al β A.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a estos antecedentes, nos planteamos como hipótesis que los alcaloides pirrocidínicos CL0179 y CL0670 pueden tener potencial neuroprotector en la EA. Nuestros objetivos serán:

- Determinar el efecto del β A sobre Bmal1 en función del entorno redox, como posible biomarcador de la EA.
- Evaluar la influencia de CL0179 y CL0670 en los niveles de Bmal1 y la susceptibilidad neuronal al β A.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda bibliográfica empleando Pubmed y Google scholar con las palabras clave “Alzheimer’s Disease”, “oxidative stress” y “Bmal1”.

Cultivos primarios de neuronas

Se realizaron cultivos primarios de neuronas corticales de embriones C5BL/6J de 14,5 días de gestación. Tras disgregación enzimática y mecánica del tejido, los neuroblastos obtenidos fueron sembrados a $1,8 \times 10^5$ células/cm² en medio Neurobasal-A suplementado con B27 (2 %), piruvato, glucosa y otros, favoreciendo su diferenciación a neuronas. El suplemento B27 puede contener antioxidantes o no, para diferenciarlos los identificaremos como medio AO (con antioxidantes) o medio MAO (sin antioxidantes) (Lapresa *et al.*, 2022).

Las neuronas se sembraron en medio AO, se cambió el medio cada 3 días. A los 6 días se cambió el medio a AO o MAO en función del experimento. Los cultivos se sembraron en placa iBIDI, destinados a inmunocitoquímica y en placas multipocillo, destinados a la técnica Western-Blot y determinación de la actividad de la caspasa-3.

Modelo de toxicidad por BA

Se empleó el péptido β A truncado β A₂₅₋₃₅, que fue disuelto en agua destilada 1mg/mL e incubado a 37 °C durante 3 días para su oligomerización. Las neuronas se trataron con el β A₂₅₋₃₅ oligomerizado (10 μ M), durante 0, 8 y 24 horas en medio AO o MAO (Lapresa *et al.*, 2022).

Tratamientos

Las neuronas se incubaron con 1 μ M de los compuestos CL0179 o CL0670 junto con el β A₂₅₋₃₅ oligomerizado (10 μ M) durante 24 horas en medio MAO.

Inmunocitoquímica

Las neuronas cultivadas en placas iBIDI se fijaron con PFA al 4 %, se lavaron y se incubaron con glicina. Se permeabilizaron con metanol y se bloquearon con Tween-Fosfato salino y suero bovino durante 1 hora. Se añadieron los anticuerpos primarios (Bmal1; Map2) overnight, se lavó y se incubó el anticuerpo secundario durante 1 hora. Se lavó con PBS y se añadió DAPI. Finalmente se tomaron las imágenes en microscopio confocal spinning-disk ("Spinning Disk" Roper Scientific Olympus IX81) (Lapresa *et al.*, 2019). Se analizó la intensidad media de fluorescencia usando el programa FIJI.

Western-Blot

Se lisaron los cultivos celulares en buffer RIPA (2% dodecilsulfato de sodio, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA y 50 mM Tris) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, se hirvieron durante 5 minutos y se almacenaron a -80 °C. Se realizó la cuantificación proteica de cada una por triplicado mediante el ensayo BCA (ácido bicinconínico), empleando una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina. Se añadió la mezcla de reacción y se incubó 20 minutos a 37°C. Terminada la incubación se midió la absorbancia en lector de placas a 562 nm. Añadimos las muestras junto con tampón de carga en los geles previamente sumergidos en tampón dentro de la cubeta de electroforesis. Para la electroforesis aplicamos un voltaje constante de 80 V hasta separación del marcador y de 190 V hasta la resolución del gel.

Realizamos la transferencia del gel a la membrana empleando un soporte en sándwich junto con esponjas y papel Whatman, en una cubeta llena de tampón de transferencia a amperaje constante 390 mA durante 2,5 horas en frío. Terminada la transferencia, teñimos la membrana con rojo Ponceau para confirmar que esta se llevó a cabo correctamente, y bloqueamos las uniones inespecíficas con leche durante 45 minutos. Tras lavar las membranas, añadimos el anticuerpo primario (Bmal1; GAPDH) e incubamos durante la noche a 4 °C. Finalmente, lavamos e incubamos con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Por último, revelamos en cámara oscura empleando películas fotográficas y reveladores ECL y FEMTO aplicándolos sobre las membranas. Finalmente, se analizó la señal quimioluminiscente autoradiografiada mediante software FIJI (González-Guerrero, 2024).

Actividad de caspasa-3

Se determinó mediante un kit de ensayo fluorométrico siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma). Se lisaron las células con buffer de lisis (50 mM HEPES, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) en hielo 20 minutos. Se añadió el tampón y el sustrato

Ac-DEVD-AMC, se extrajeron alícuotas de 200 μ L y se transfirieron a una placa de 96 pocillos. Se midió la fluorescencia durante 30 minutos, realizando mediciones cada 5 minutos, a 37° en fluorímetro Fluoroskan ascent FL (Lapresa *et al.*, 2022). A partir de las pendientes obtenidas y una recta patrón de concentraciones conocidas de AMC se calculó la tasa de liberación de AMC.

Tratamiento Estadístico

Los resultados se analizaron mediante una prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey para la comparación de valores entre grupos. Además, se realizó prueba t de Student bilateral para comparaciones entre dos grupos. En todos los casos se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 10.

4. RESULTADOS

En primer lugar, analizamos la influencia del β A sobre los niveles de la proteína Bmal1, tanto en presencia (medio con antioxidantes, AO) como en ausencia de antioxidantes (medio MAO). Para ello realizamos un estudio a distintos tiempos de tratamiento con β A por Western-blot. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles de Bmal1 disminuyeron progresivamente en respuesta al β A en condiciones sin antioxidantes Figura 1b. En contraste, en neuronas cultivadas en presencia de antioxidantes, el tratamiento con β A no afectó los niveles de Bmal1 Figura 1a. Para corroborar el efecto del β A sobre Bmal1 en un medio sin antioxidantes realizamos inmunocitoquímicas empleando los marcadores Map2, para marcar los microtúbulos neuronales, DAPI, para marcar el núcleo celular, y Bmal1. Como se muestra en la Figura 1c, las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas muestran que la señal de Bmal1 disminuyó notablemente en respuesta al β A. La cuantificación de la intensidad media de fluorescencia de Bmal1 confirmó la disminución de la misma inducida por el β A en un medio carente de antioxidantes.

Esto demuestra la importancia del estrés oxidativo asociado al β A en la regulación de los niveles neuronales de Bmal1.

A continuación, estudiamos la influencia de los compuestos experimentales CL0179 y CL0670 en los niveles de Bmal1 en cultivos tratados con β A. Para ello, mediante inmunocitoquímica analizamos los niveles neuronales de Bmal1. Como se observa en la Figura 2, los compuestos CL0179 y CL0670 fueron capaces de rescatar la caída en los niveles de fluorescencia de Bmal1 asociada al β A.

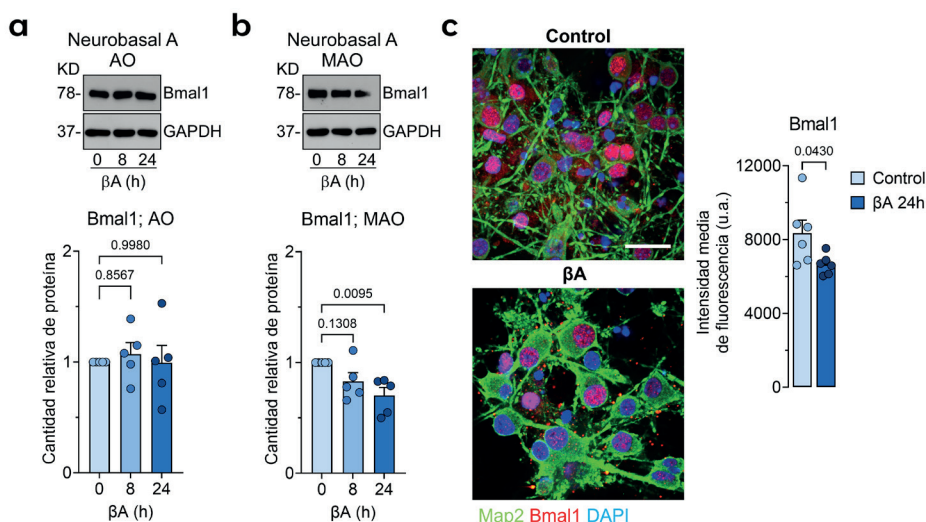


Figura 1. Bmal1 disminuye en ausencia de antioxidantes en cultivos neuronales tratados con β A. Se cuantificó la proteína Bmal1 mediante Western-Blot en cultivos neuronales tratados con β A utilizando GAPDH como control de carga. (a) Cuantificación de Bmal1 en medio con antioxidantes. (b) Cuantificación de Bmal1 en medio sin antioxidantes. (c) Imágenes y cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Bmal1 de cultivos celulares tratados con β A. Se emplearon los marcadores Map2 (verde), Bmal1 (rojo), DAPI (azul).

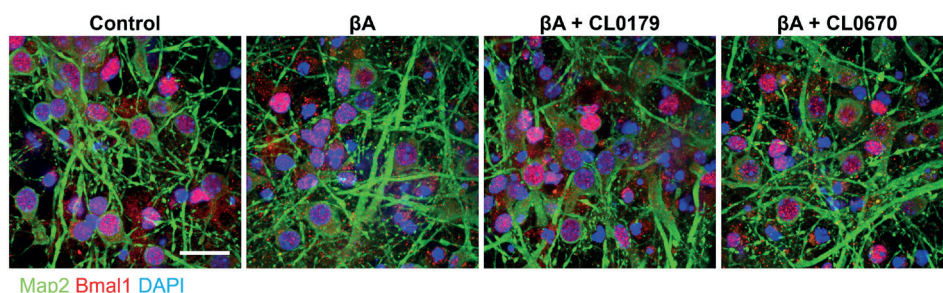


Figura 2. Los compuestos CL0179 y CL0670 mantienen los niveles de Bmal1 en cultivos neuronales tratados con β A. Imágenes de inmunocitoquímica de cultivos celulares control, tratados con β A y tratados con β A y los compuestos experimentales CL0179 o CL0670. Se emplearon los marcadores Map2 (verde), Bmal1 (rojo), DAPI (azul).

Por último, evaluamos el efecto neuroprotector de los compuestos CL0179 y CL0670 frente a la apoptosis inducida por el β A. Para ello, analizamos la actividad de la caspasa 3, enzima efectora de la apoptosis. Así, podemos observar que la actividad apoptótica aumentó en presencia de β A. Sin embargo, la apoptosis neuronal en respuesta al β A fue menor en presencia de los compuestos antioxidantes CL0179 y CL0670 Figura 3.

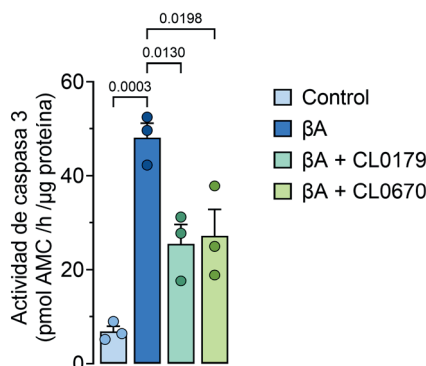


Figura 3. La actividad apoptótica inducida por el β A disminuye en cultivos neuronales tratados con los compuestos experimentales. Medida de la actividad de la caspasa 3 en cultivos neuronales tratados con β A y los compuestos experimentales CL0179 o CL0670.

Por tanto, nuestros resultados demuestran la capacidad de los compuestos CL0179 y CL0670 para preservar los niveles de Bmal1, acompañado de una disminución de la neurotoxicidad frente al β A.

5. DISCUSIÓN

Los avances actuales vislumbran una compleja y no totalmente conocida relación entre β A, estrés oxidativo y Bmal1. Los efectos del β A se han estudiado en profundidad, habiéndose descrito que genera estrés oxidativo, y que favorece la degradación de Bmal1 por sumoilación, una modificación postraduccional importante en condiciones de estrés oxidativo (Song *et al.*, 2015). Nuestros resultados confirman la influencia del β A y del entorno oxidativo sobre los niveles de Bmal1, ya que, en respuesta al β A, Bmal1 se mantiene estable en un medio con antioxidantes (AO), mientras que se degrada en un medio sin ellos. Esto apoya que el β A juega un papel determinante en la degradación de Bmal1 mediada por el estrés oxidativo (Fan *et al.*, 2022).

Sin embargo, la relación entre estos elementos es bidireccional, ya que se ha descrito que una expresión reducida de Bmal1 promueve la acumulación de β A y la hiperfosforilación de Tau, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Fan *et al.*, 2022). Además, dado que Bmal1 favorece la expresión de enzimas antioxidantes, una disminución de la misma favorece el daño oxidativo (Fan *et al.*, 2022).

Los compuestos experimentales demostraron potencial antioxidante y neuroprotector en experimentos previos del grupo frente a daño isquémico y excitotóxico. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, en neuronas tratadas con dichos compuestos, se previene la pérdida de Bmal1 que produce el β A. Este efecto sería análogo al observado en el medio AO, por lo que podría estar mediado por el efecto antioxidante de estos alcaloides.

Además del mantenimiento de Bmal1, los compuestos han demostrado neuroprotección frente a la toxicidad del β A, disminuyendo la apoptosis neuronal. Este resultado es compatible con la mayor progresión de la enfermedad observada en condiciones de reducción de Bmal1 (Fan *et al.*, 2022). Sin embargo, con nuestros resultados no podemos concluir que los efectos observados se deban a la capacidad antioxidante de los compuestos, lo que exhibe la posibilidad de que tengan efectos pleiotrópicos que promuevan a distintos niveles su potencial neuroprotector, frenando distintos mecanismos patológicos de la EA. Actualmente hay ensayos clínicos de compuestos enfocados en mejorar el estrés oxidativo o los ritmos circadianos en esta patología (Cummings *et al.*, 2025).

6. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado, podemos concluir:

- La disminución de los niveles neuronales de la proteína Bmal1 inducida por el β A está condicionada por la ausencia de antioxidantes en el medio, lo que indica que el ambiente redox celular desempeña un papel clave en la regulación de esta proteína ante el estrés inducido por β A.
- Los alcaloides pirrocídnicos CL0179 y CL0670 son capaces de mantener la abundancia de Bmal1, así como de reducir la apoptosis neuronal en respuesta al β A.

Conclusión final

Los resultados obtenidos en este estudio resaltan la importancia del estrés oxidativo y de la regulación de Bmal1 en los mecanismos patogénicos mediados por el β A, de especial relevancia en enfermedades neurodegenerativas como la EA. Esto aporta una nueva perspectiva, abriendo una posible vía de investigación para la búsqueda de agentes terapéuticos neuroprotectores.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bai R, Guo J, Ye X-Y, Xie Y, Xie T. Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev.* 2022; 7(101619):101619. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>
- Bliwise DL. Sleep in normal aging and dementia. *Sleep.* 1993;16(1):40-81. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/sleep/16.1.40>
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.* 2018;14:450-64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>
- Cummings JL, Zhou Y, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Leisgang-Osse AM, *et al.* Alzheimer's disease drug development pipeline: 2025. *Alzheimers Dement (N Y).* 2025;11(2):e70098. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/trc2.70098>
- Fan R, Peng X, Xie L, Dong K, Ma D, Xu W, *et al.* Importance of Bmal1 in Alzheimer's disease and associated aging-related diseases: Mechanisms and interventions. *Aging Cell.* 2022;21(10): e13704. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/accel.13704>
- González-Guerrero S. La proteína p53 modula la neuroinflamación y la susceptibilidad neuronal al β -Amiloide [Tesis Doctoral]: Universidad de Salamanca; 2024. 256 p.
- Iliyasu MO, Musa SA, Oladele SB, Iliya AI. Amyloid-beta aggregation implicates multiple pathways in Alzheimer's disease: Understanding the mechanisms. *Front Neurosci.* 2023;17:1081938. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2023.1081938>
- Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeblerlein SB, *et al.* NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2018;14(4):535-62. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
- Lapresa R, Agulla J, Gonzalez-Guerrero S, Bolaños JP, Almeida A. Amyloid- β induces Cdh1-mediated Rock2 stabilization causing neurodegeneration. *Front Pharmacol.* 2022;13:884470. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2022.884470>
- Lapresa R, Agulla J, Sánchez-Morán I, Zamarreño R, Prieto E, Bolaños JP, *et al.* Amyloid- β promotes neurotoxicity by Cdk5-induced p53 stabilization. *Neuropharmacology.* 2019;146:19-27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.019>
- Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, Holstege H, Chételat G, Teunissen CE, *et al.* Alzheimer's disease. *Lancet.* 2021;397(10284):1577-90. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Song H, Moon M, Choe HK, Han D-H, Jang C, Kim A, *et al.* A β -induced degradation of BMAL1 and CBP leads to circadian rhythm disruption in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2015;10(1):13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-015-0007-x>
- Welz P-S, Zinna VM, Symeonidi A, Koronowski KB, Kinouchi K, Smith JG, *et al.* BMAL1-driven tissue clocks respond independently to light to maintain homeostasis. *Cell.* 2019;177(6):1436-1447.e12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.009>