

UNIVERSIDAD DE SALAMACA – FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



**Evaluación de la capacidad de compuestos fenólicos para
atenuar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en el
organismo modelo *Caenorhabditis elegans***

Evaluation of the capacity of phenolic compounds to attenuate the progression
of Alzheimer's disease in the model organism *Caenorhabditis elegans*

Lidia Garzón García

Directores:

Dra. Ana María González Paramás

Dr. Celestino Santos Buelga

Salamanca, 2026

Ana María González Paramás, Profesora Titular del área de Nutrición y Bromatología, y Celestino Santos Buelga, Catedrático del área de Nutrición y Bromatología, directores del trabajo titulado: "Evaluación de la capacidad de compuestos fenólicos para atenuar la progresión de la enfermedad de Alzheimer en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans*", realizado por Lidia Garzón García para optar al Grado de Doctor con Mención Doctorado Internacional, AUTORIZAN la presentación del mismo, al considerar que se han cumplido los objetivos inicialmente previstos.

En Salamanca, a 06 de marzo de 2026



Ana María González Paramás



Celestino Santos Buelga

Para la realización del presente trabajo se ha contado con un contrato predoctoral para la formación de doctores (Referencia: PRE2020-095876) de la Agencia Estatal de Investigación, concedido por Orden CNU/692/2019, de 20 de junio, asociado al proyecto financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033: “Evaluación del potencial neuroprotector de los flavonoides de la uva en la prevención de la enfermedad de Alzheimer (NeuroFlav)” (Referencia: PID2019-106167RB-I00); con un contrato con cargo a proyecto financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033 y FEDER (UE): “Papel de los antocianos y sus metabolitos en la prevención del deterioro cognitivo (DA4NeuroPrev)” (Referencia: PID2023-151638OB-I00), y con las subvenciones recibidas de la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León a través de los proyectos SA093P20 y SA106P24.



Cofinanciado por
la Unión Europea



Europa impulsa
nuestro crecimiento



Junta de
Castilla y León



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



Agradecimientos

- A mis directores: Ana M. y Celestino. Gracias por darme la oportunidad que llevaba tanto tiempo buscando, por confiar en mí desde el momento en el que nos conocimos por videollamada, por supervisarme, por orientarme y por valorar mi trabajo.

- A mis compis “gusaneras”: Bego y Susana. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, por el equipazo que hemos formado, por vuestro apoyo y por cuidarme dentro y fuera del laboratorio.

- A mis compis de batalla: Andrea, Bárbara, Diana y María. Gracias por incluirme desde que llegué al departamento, fuisteis muy importantes en los inicios de mi nueva vida en Salamanca y ha sido un placer crecer juntas en nuestra etapa como doctorandas. Además, a las nuevas incorporaciones: Iván, Laura, Pedro y Rebeca. Gracias a todos por vuestra energía, por las risas, por los momentos divertidos y por todas las “5 12” y paseos sin rumbo que están por venir.

- Gracias al resto de profesores y compañeros de Nutrición y Bromatología: Cris, Elvira, José Joaquín, José Luis, Mabel, Maite, María José, Montse, Nacho, Rebe y Sayantani. El buen ambiente que se respira en este departamento hace que te guste venir a trabajar cada día. Mención especial a José Joaquín, gracias por tu profesionalidad, pero, sobre todo, gracias por ser un gran compañero de aventuras, por llevarnos de excursión sin perdernos y por ofrecer tu ayuda siempre que se necesita. Gracias también a los profesores jubilados, Alfonso, Concha, Julián, Mariaje, Milagros y Pilar, por vuestras visitas cargadas de cariño y cosas ricas para el café.

- Gracias a los departamentos de Fisiología Vegetal y Química Farmacéutica por dejarme “robar” hielo, a Parasitología por el uso del NanoDrop, y a Bioquímica y Microbiología por ayudarnos con la puesta a punto de nuevos experimentos, en especial a Pepe, gracias por tu implicación.

- Às Professoras Ana Faria, da Universidade Nova de Lisboa, e Manuela Pintado, da Universidade Católica Portuguesa. Obrigada por me receberem nos vossos grupos de investigação e supervisionarem as minhas estadias de investigação. Estas experiências foram verdadeiramente enriquecedoras para mim.

- À Catarina Rodrigues, da Universidade Nova de Lisboa. Obrigada por me ensinares a trabalhar com culturas celulares com tanto cuidado e paciência.

- A mi grupo de “PhD around Lisboa”: Ágata, Alazne, Alba, Begoña, Elena, Merche, Nerea y Vicente, gracias por todas las aventuras por Portugal, coincidir fue una suerte y la estancia no habría sido lo mismo sin vosotros.

- Aos investigadores do grupo de Bioativos da U. Católica Portuguesa: Daniela(s), Emi, Ezequiel, Helena, Isa, Isra, Joana, Marta(s), Sofia(s) e Teresa. Muito obrigada por me fazerem sentir como uma de vocês e por todos os momentos maravilhosos dentro e fora da Escola de Biotecnologia. Lembrar-me-ei sempre de vocês e guardarei sempre o *Ponchito* para os dias mais frios.

- Gracias a mis amigos de ciencia: Helena de la U. Católica Portuguesa y Néstor de la U. Rovira i Virgili, trabajar juntos ha sido maravilloso, pero aún más maravillosos ha sido conocerlos. Seguiremos colaborando y haciendo ciencia juntos.

- Gracias a las personitas especiales que Salamanca me ha regalado: Lalo, el mejor compi de piso, pasaste de ser un desconocido a ser mi pequeña familia en cuestión de horas. Irene, llegaste de repente para alegrar la casa de San Gerardo con tu buena vibra. Fran, te conocí donde menos lo esperaba y te convertiste en mi gran apoyo. Gracias por todo lo que haces por mí, por ser mi soporte, mi consejero, por cuidarme y por nuestros planes “healthy”.

- Gracias a la Dra. Raquel del Pino, del Centro de I+D del Alimento Funcional, por introducirme en el mundo de los compuestos bioactivos; al profesor Manuel Muñoz, de la U. Pablo de Olavide, y al Lab 221 por presentarme a *Caenorhabditis elegans* y hacer de mí una “*C. elegans* lover”; y a la profesora Elosia Ramos, de la U. de Granada (supervisora del TFG), por su frase: *tienes madera de investigadora*, esas palabras me impulsaron a iniciarme en la investigación.

- Gracias a mis compis del máster en Biotecnología: Ale, Ana, BigManu, Cristina, Edu, Irene, Laura, Javi, Juanca, Juanlo y Manu, fuisteis las primeras personas a las que conocí cuando decidí dar un giro a mi vida y empezar de cero en Sevilla, ¡qué fortuna la mía! Mención especial a Laura, gracias por ser la mejor compi de piso, de aventuras, de momentos divertidos y no tan divertidos, por todas tus visitas y por nuestras largas conversaciones de actualización mensuales. Y mención especial a Manu, uno de mis pilares fundamentales, gracias por demostrarme cada día que es la amistad y estar para todo, ya sea hacer una clase de abdominales, reír, llorar, bailar, aconsejar o escribir el *abstract* del TFM en momentos de colapso.

- A mis *Biólogos cerevisiae*: Albebe, Dilam, FranDeLamo, Jaime, JaviOsuna, Jesús, Miguel, Nico, Pablo, Ricardo, Tato y Biolokas. Gracias por toda vuestra ayuda y apoyo durante la carrera cuando compaginaba estudios y trabajo, gracias por ser un espacio seguro, por todos los momentazos que hemos vivido y por los que seguimos viviendo 15 años después.

- A mis imprescindibles Biolokas: Ana, Cris, Laury, Noe y Sele. Para vosotras no tengo suficientes palabras para agradecer todo lo que hacéis por mí, sois lo mejor que me ha regalado la Biología y no puedo vivir sin vosotras. Gracias por estar, por ser mis psicólogas y por hacerme crecer.

- A mi familia, gracias por educarme desde la humildad y el respeto. A mis padres, gracias por el gran esfuerzo y sacrificio para poder mantener mi etapa como gimnasta de rítmica, el deporte que me hizo ser quien soy. A mi hermano Diego, gracias por preocuparte de que todos tengamos la mejor tecnología en relación calidad-precio. A mi padre, gracias por salir corriendo a cualquier hora cada vez que lo necesito, ya sea para recogerme de una fiesta o llevarme a trabajar. A mi madre, gracias por ser la persona que más confía en mí y por dejarme tomar mis propias decisiones desde que era una niña. Y a mi hermana Maribel, gracias por tener siempre palabras bonitas para mí, por estar cerca, aunque nos separen miles de kilómetros, y por regalarme el título de “Tita Lidi”, tener a mis sobrinos Ella, Shawn, Elsa y Kade es lo mejor que me ha pasado.

A todos, gracias por formar parte de mi camino.

A mis sobrinos

El trabajo realizado en esta tesis doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos y comunicaciones a congresos:

Artículos:

Garzón-García, L., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2025). Neuroprotective potential of the flavonoids Quercetin and Epicatechin in a *C. elegans* tauopathy model. *Molecular Nutrition and Food Research*, 69, e70108. <https://doi.org/10.1002/mnfr.70108>

Ayuda-Durán, B., **Garzón-García, L.,** González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2024). Insights into the neuroprotective potential of Epicatechin: Effects against A β -induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, 13, 79. <https://doi.org/10.3390/antiox13010079>

Otros artículos relacionados:

González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., Martín-Sanz, R., **Garzón-García, L.,** Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2024). Exploring the neuroprotective effects of Grape Seed Procyanidins on Amyloid- β -induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Foods*, 13, 3865. <https://doi.org/10.3390/foods13233865>

Comunicaciones a congresos:

Garzón-García, L., González-Manzano, S., Rodrigues, C., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., Faria, A., González-Paramás, A.M. Metabolitos microbianos de flavonoides: Permeabilidad a través de barrera hematoencefálica y actividad neuroprotectora en *Caenorhabditis elegans*. IV *Jornadas de Compuestos Bioactivos y Nutraceuticos*. Marzo 2025, Tarragona (España). Comunicación en formato póster.

Garzón-García, L., González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Flavonoids protect against p-Tau toxicity and stimulate autophagy in the strain BR5270 of *C. elegans*. IX *Spanish Worm Meeting*. Octubre 2024. Sevilla (España). Comunicación en formato póster.

Garzón-García, L., González-Manzano, S., Rodrigues, C., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., Faria, A., González-Paramás, A.M. Flavonoides y prevención de tautopatías: mecanismos moleculares y permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica. III *Jornadas sobre Nutraceutica: "Compuestos Bioactivos y Nutraceuticos"*. Marzo 2024. Tarragona (España). Comunicación en formato póster.

Garzón-García, L., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Flavonoids as neuroprotector molecules: Evaluation in a transgenic strain of the model organism *Caenorhabditis elegans*. 1st *International Agrienviroment Symposium*. Julio 2023. Salamanca (España). Comunicación oral.

Garzón-García, L., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Epicatequina y Quercetina protegen frente a neurodegeneración en cepas mutantes de *Caenorhabditis elegans* que expresan la proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau). *II Jornadas sobre Nutraceutica: "Compuestos Bioactivos y Nutraceuticos"*. Abril 2023, Tarragona (España). Comunicación en formato póster.

Garzón-García, L., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C. Evaluación del potencial de flavonoides para inhibir la progresión de la enfermedad de Alzheimer empleando *Caenorhabditis elegans* como modelo *in vivo*. *II Jornadas sobre Nutraceutica: "Compuestos Bioactivos y Nutraceuticos"*. Abril 2023, Tarragona (España). Comunicación oral, ponencia invitada.

Garzón-García, L., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Evaluación en el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* del potencial de flavonoides para atenuar la progresión del Alzheimer. *III Congreso Nacional de Jóvenes Investigadores en Ciencia, Ingeniería y tecnología de los alimentos*. Noviembre 2022, Salamanca (España). Comunicación oral.

Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., **Garzón-García, L.**, Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Papel neuroprotector de epicatequina en la enfermedad de Alzheimer. Estudio en *C. elegans*. *III Congreso Nacional De Jóvenes Investigadores En Ciencia, Ingeniería y Tecnología de los Alimentos*. Noviembre 2022, Salamanca (España). Comunicación oral.

Garzón-García, L., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., González-Manzano, S. Potential of epicatechin to reduce Alzheimer's disease progression based on its capacity to ameliorate amyloid β peptide (A β) and neurofibrillary tangles production. *VIII Spanish Worm Meeting*. Octubre 2022, Logroño (España). Comunicación oral.

Ayuda-Durán, B., **Garzón-García, L.**, Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., González-Manzano, S. Flavonoids present anti-Alzheimer effect reducing A β aggregates in *Caenorhabditis elegans*. *VIII Spanish Worm Meeting*. Octubre 2022, Logroño (España). Comunicación en formato póster.

Ávila-Navarrete, A.C., González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., **Garzón-García, L.**, Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Pontential of epicatechin to diminish Alzheimer's disease progression based on their capacity to ameliorate amyloid β peptide (A β) production. *3rd International Conference on Food Bioactives & Health*. Junio 2022, Parma (Italia). Comunicación oral formato "flash".

Ávila-Navarrete, A.C., González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., **Garzón-García, L.**, Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. Ability of quercetin to diminish paralysis induced by amyloid β -peptide in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *3rd International Conference on Food Bioactives & Health*. Junio 2022, Parma (Italia). Comunicación en formato póster.

Producción científica en colaboración con otras universidades:

- Universidade Católica Portuguesa:

Araújo-Rodrigues, H., **Garzón-García, L.**, Salsinha, A.S., Relvas, J.B., Tavaría, F.K., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Pintado, M. (2025). Neuroprotective effects of mushroom biomass digestive fractions and gut microbiota metabolites in microglia and *Caenorhabditis elegans* models of neurodegeneration. *Nutrients*, 17(24), 3867. <https://doi.org/10.3390/nu17243867>

Araújo-Rodrigues, H., Garzón-García, L., Salsinha, A.S., Relvas, J.B., Tavaría, F.K., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Pintado, M. Antioxidant and neuroprotective potential of mushroom biomass: Effects on ROS production in human microglial cell line (HMC3) and Alzheimer's disease *Caenorhabditis elegans* models. *MicroBioTec 2025: Congress of Microbiology and Biotechnology*. Diciembre 2025, Ponta Delgada (Portugal). Comunicación oral.

Araújo-Rodrigues, H., Garzón-García, L., Salsinha, A.S., Relvas, J.B., Tavaría, F.K., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Pintado, M. Neuroprotective effects of mushroom biomass: Impact of serum-available and gut microbiota metabolites in *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer's disease. *XXIII European Conference on Food Chemistry*. Junio 2025, Bratislava (Eslovaquia). Comunicación oral.

Araújo-Rodrigues, H., Garzón-García, L., Salsinha, A.S., Relvas, J.B., Tavaría, F.K., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Pintado, M. Neuroprotective effects of mushroom biomass in *Caenorhabditis elegans* models of Alzheimer's disease. *3rd Symposium on Alzheimer's Disease: An Update on Pathology and Therapeutics*. Febrero 2025, Porto (Portugal). Comunicación oral, ponencia invitada.

- Universitat Rovira i Virgili:

Como resultado de la colaboración entre el Grupo de Investigación en Polifenoles de la Universidad de Salamanca y el grupo de Nutrigenómica y Nutrición Personalizada de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, se participó en los estudios que dieron lugar al depósito de la siguiente patente:

Ibarz-Blanch, N.; **Garzón-García, L.**; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Muguerza-Marquínez, B.; Bravo-Vázquez, F.I. (2025). "Hidrolizados, péptidos, composiciones que los comprenden, y sus usos", depositada en la O.E.P.M. el 19/03/2025.

Ibarz-Blanch, N., **Garzón-García, L.**, Cortés-Espinar, A.J., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Bravo-Vázquez, F.I. Food-industry by-product hydrolysates as a potential functional ingredient for managing Alzheimer's Disease. *4th International Conference on Food Bioactives & Health*. Septiembre 2023, Praga (República Checa). Comunicación en formato póster.

Estancias de investigación:

Faculdade de Ciências Médicas-NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa (Lisboa, Portugal)

- Supervisión: Dra. Ana Faria
- Duración: 15/09/2023 al 18/12/2023
- Actividades desarrolladas:
 - Ensayos de transporte de diferentes compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos y metabolitos fenólicos) a través de la barrera hematoencefálica utilizando la línea celular hCMEC/D3.
 - Ensayos preliminares con células de microglía (línea celular N9) para evaluar la capacidad antiinflamatoria de los flavonoides epicatequina y quercetina.
- Adecuación y beneficios para el trabajo desarrollado:
 - Avance en uno de los objetivos de la Tesis Doctoral: Estudio de la capacidad de epicatequina, quercetina y los metabolitos más comunes resultantes de la degradación por la flora colónica para atravesar la barrera hematoencefálica.
 - Formación en el manejo y utilización de líneas celulares.
 - Creación de vínculos entre los diferentes grupos de investigación.

School of Biotechnology, Universidade Católica Portuguesa (Porto, Portugal)

- Supervisión: Dra. Manuela Pintado
- Duración: 25/08/2025 al 31/10/2025
- Actividades desarrolladas: participación en actividades relacionadas con el proyecto ProxIMed, que se centra en la integración de proteínas alternativas en alimentación humana y animal a través de tecnologías de procesamiento innovadoras y respetuosas con el medio ambiente.
 - Hidrólisis de muestras de hongos para la extracción de péptidos bioactivos.
 - Caracterización de hidrolizados (contenido proteico total, perfil proteico, peptídico y de aminoácidos, capacidad antioxidante total).
 - Digestión gastrointestinal *in vitro* de hidrolizados y caracterización de las propiedades bioactivas de la fracción digestiva, así como su impacto en el microbioma mediante ensayos de actividad prebiótica.
- Adecuación y beneficios para el trabajo desarrollado: experiencia práctica con técnicas novedosas en el área de la Ciencia de los Alimentos. Mejora de las capacidades de investigación. Creación de vínculos entre los diferentes grupos de investigación.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most prevalent form of dementia worldwide, with its incidence increasing alongside an aging population. Its multifactorial pathogenesis involves extracellular amyloid-beta ($A\beta$) peptide and intracellular hyperphosphorylated Tau (p-Tau) protein accumulation in neurons, accompanied by oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and neuroinflammation. Dietary phenolic compounds, particularly flavonoids, have gained attention in the prevention of AD due to their antioxidant, anti-inflammatory, and signalling-modulatory properties. This thesis evaluated the neuroprotective potential of the flavonoids epicatechin (EC) and quercetin (Q), as well as several phenolic acids resulting from their degradation by the intestinal microbiota, using experimental models of AD. Specifically, transgenic *Caenorhabditis elegans* strains expressing human $A\beta$ or p-Tau were employed to assess *in vivo* effects. Additionally, a human endothelial cell line (hCMEC/D3) was used as a blood-brain barrier (BBB) model to evaluate the ability of the compounds to cross the BBB and reach the central nervous system (CNS). Results showed that EC and Q significantly delayed $A\beta$ -induced paralysis, extended lifespan and preserved neuronal function in both *C. elegans* models, and mitigated motor deficits in p-Tau model. At molecular level, both flavonoids upregulated the expression of autophagy and mitophagy related genes, downregulated pro-apoptotic and neuroinflammatory genes, and maintained protein homeostasis. BBB transport assays indicated that EC, Q and microbiota-derived metabolites, including protocatechuic, vanillic and 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acids, can efficiently cross the BBB. These metabolites also exerted neuroprotective effects in the *C. elegans* tauopathy model. In conclusion, these findings suggest that phenolic compounds and their metabolites possess the capacity to mitigate AD progression, identifying autophagy, mitophagy, and proteostasis as key neuroprotective mechanisms.

Keywords: Alzheimer's disease, Autophagy, Blood-brain barrier, *C. elegans*, Flavonoids, Neuroprotection, Phenolic acids

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más prevalente de demencia en todo el mundo, y su incidencia aumenta con el envejecimiento de la población. Su patogénesis es multifactorial y se caracteriza por la acumulación extracelular del péptido beta-amiloide (A β) e intracelular de la proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) en las neuronas, además de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y neuroinflamación. Los compuestos fenólicos de la dieta, particularmente los flavonoides, son objeto de atención en la prevención de la EA debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y moduladoras de la señalización celular. En esta tesis se evaluó el potencial neuroprotector de los flavonoides epicatequina (EC) y quercetina (Q), así como de diversos ácidos fenólicos producidos en la metabolización/degradación de flavonoides por la microbiota intestinal, utilizando modelos experimentales de la EA. En particular, se emplearon cepas transgénicas de *Caenorhabditis elegans* que expresan A β o p-Tau humana para evaluar efectos *in vivo*. Adicionalmente, se utilizó una línea celular endotelial humana (hCMEC/D3) como modelo de la barrera hematoencefálica (BHE) para valorar la capacidad de los compuestos para atravesar la BHE y alcanzar el sistema nervioso central (SNC). Los resultados mostraron que EC y Q retrasaron significativamente la parálisis inducida por A β , aumentaron la longevidad y preservaron la función neuronal en los dos modelos de *C. elegans*, y redujeron los déficits motores en el modelo p-Tau. A nivel molecular, ambos flavonoides incrementaron la expresión de genes relacionados con la autofagia y la mitofagia, redujeron genes apoptóticos y neuroinflamatorios, y mantuvieron la homeostasis proteica. Los ensayos de transporte a través de la BHE indicaron que EC, Q y metabolitos derivados de la microbiota, incluidos los ácidos protocatéquico, vanílico y 3-(4-hidroxifenil)propiónico, pueden atravesar eficientemente la BHE. Estos metabolitos también ejercieron efectos neuroprotectores en el modelo de tauopatía de *C. elegans*. En conclusión, los resultados sugieren que los compuestos fenólicos y sus metabolitos presentan capacidad para reducir el riesgo de desarrollar la EA, siendo la autofagia, la mitofagia y la proteostasis mecanismos neuroprotectores clave.

Palabras clave: Ácidos fenólicos, Autofagia, Barrera hematoencefálica, *C. elegans*, Enfermedad de Alzheimer, Flavonoides, Neuroprotección

Summary

Background: Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia worldwide, and its prevalence increases as the global population aging accelerates. Its pathogenesis is complex and multifactorial, involving a combination of genetic and environmental factors. It is characterized by the extracellular aggregation of amyloid-beta peptide (A β) and the intracellular accumulation of hyperphosphorylated Tau protein (p-Tau). Evidence suggests a bidirectional interaction between A β and p-Tau aggregation in AD, alongside chronic oxidative stress driven by reactive oxygen species (ROS) imbalance, altered mitophagy, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation, and impaired proteostasis, as possible mechanisms that could be involved in the development of neurodegenerative processes. The interplay of these processes generates a dynamic feedback loop that promotes the pathogenesis of Alzheimer's disease. Furthermore, the decline in autophagy, a conserved mechanism essential for degrading defective organelles and unfolded proteins; the aberrant neuronal death; stress of the endoplasmic reticulum, a key organelle in maintaining homeostasis; and altered brain energy metabolism further drive the inflammatory response, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction, thereby exacerbating the cognitive impairment and the development of AD.

Despite several decades of research, effective therapies to combat AD remain elusive, emphasising the need for preventive strategies. In this context, an increasing body of evidence suggests that lifestyle may represent a significant modifiable risk factor. Notably, diet modification is considered one of the habits that might reduce the risk of developing AD. Among dietary components, flavonoids, one of the most abundant classes of phenolic compounds or polyphenols (secondary metabolites present in plants), are of particular interest due to their antioxidant, anti-inflammatory, and cell-signalling modulatory potential, which may exert neuroprotective effects. While the consumption of flavonoid-rich foods, such as fruits and vegetables, has been reported to improve human health, this improvement depends on factors including the type and amount of polyphenols, the food matrix composition, bioavailability, and the interaction with the gut microbiota. Flavonoids generally exhibit low bioavailability, which is attributed to their absorption limitations in the upper gut and their extensive biotransformation by intestinal and hepatic enzymes. It has been estimated that approximately 90% of ingested flavonoids are not absorbed in the small intestine and reach the colon, where they interact with the resident microbiota and are degraded to lower molecular weight metabolites, such as phenolic acids, which can be bioactive and contribute to the effects of the flavonoids in the organism.

A large number of epidemiological, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the efficacy and benefits of polyphenols in the prevention of neurological disorders. However, the compounds ultimately responsible and the biological mechanisms underlying their action, including the role of microbial metabolites, remain insufficiently understood. To this end, a comprehensive study of specific compounds is essential to gain a more profound understanding of their neuroprotective signalling pathways. In this particular context, the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* offers a series of advantages as a model organism in functional biology, such as its small size, short life cycle, reproduction by self-fertilisation, a completely sequenced genome, and the ease of genetic manipulation to simulate human diseases. These

characteristics, together with its simple neurological system, make it highly valuable in the study of neuroprotective agents, since its simplicity allows for specific and direct exploration of signalling pathways that drive neurodegeneration. In addition, its homology with mammalian genes and evolutionarily conserved molecular mechanisms, as well as the availability of generated AD strains that express A β or p-Tau, reinforce the utility of this organism in screening bioactive compounds.

Objectives: The present doctoral thesis aims to contribute to the understanding of the influence that specific dietary components, particularly phenolic compounds, have on preventing or delaying the progression of Alzheimer's disease. To this end, the use of the model organism *Caenorhabditis elegans* and blood-brain barrier cell lines is proposed to evaluate the bioactivity, bioavailability, and the molecular mechanisms involved in the action of selected flavonoids and their microbial metabolites. The specific objectives are: assessing the capacity of epicatechin (EC) and quercetin (Q) to mitigate Alzheimer's related pathology in *C. elegans* strains expressing amyloid beta peptide (A β) or hyperphosphorylated Tau protein (p-Tau); exploring molecular pathways associated with their neuroprotective effects; investigating the transport of flavonoids and some of their microbial metabolites across the blood-brain barrier using the hCMEC/D3 cell line; and integrating findings from *in vivo* and *in vitro* models to establish the neuroprotective potential of these compounds.

Methods: Transgenic strains of *C. elegans* expressing A β (CL4176, CL2355, and CL2006) or p-Tau (BR5270) were utilised to study the bioactivity of EC, Q, and their microbial metabolites. These compounds were homogeneously incorporated into NGM plates, with *Escherichia coli* as a food source, to evaluate their effects through paralysis, longevity, chemotaxis, and locomotion assays. Subsequently, the expression of genes related to various cell signalling pathways associated with the pathological processes of AD was analysed by RT-qPCR. The hCMEC/D3 cell line was cultured in Transwell plates to study the transport efficiency of the explored phenolic compounds. This was determined through their analysis and quantification by HPLC-DAD in the media from the apical and basolateral compartments of the cell-culture system. All experiments were performed in triplicate, and the resulting data were analysed using GraphPad Prism software.

Result and discussion: Firstly, the CL4176 strain, which expresses the A β peptide in muscle cells by thermal induction, was used to establish the optimal dose of the assayed flavonoids for subsequent experiments. For this purpose, nematodes were cultivated in the presence or absence (control) of EC or Q at concentrations of 50, 100, 150, and 200 μ M supplemented in the NGM. Increasing the temperature from 16 to 25 $^{\circ}$ C resulted in observable progressive paralysis in the animals. The number of non-paralysed nematodes was then scored at 2-hour intervals from 24 to 32 hours post-induction. The results obtained suggested a hormetic response to the tested flavonoids. At the lowest concentrations (50 and 100 μ M), no significant differences were observed between treated and control groups, while at the highest concentrations (200 μ M), a greater degree of paralysis was observed in treated nematodes compared to controls, suggesting a toxic effect. However, at the concentration of 150 μ M, both flavonoids, EC or Q, induced beneficial effects producing a significant delay in the paralysis of A β -induced nematodes. Consequently, this concentration was selected for all subsequent *C. elegans* experiments.

The effect of 150 μ M EC or Q on the lifespan of the *C. elegans* strains CL2006 and BR5270, which express the A β peptide and the p-Tau protein in muscle cells and neurons, respectively, was subsequently investigated. The mean lifespan of both strains was found to be increased following treatment with flavonoids compared to the untreated groups. Furthermore, the neuronal function of the nematodes was evaluated through their chemotactic response to volatile compounds (odorants). Treatment with 150 μ M EC or Q led to an enhanced chemotaxis index in CL2355 (expressing A β in neurons) and BR5270 strains, indicating their potential to alleviate neural damage induced by A β and p-Tau, and partially restoring the animals' ability to process olfactory signals. Finally, locomotion was analysed in the BR5270 strain (tauopathy model) by recording the number of body bends completed within 30 seconds during different life stages of the nematodes (young, middle-aged, and old). The results revealed a delay in the age-related decline in mobility in the treated nematode groups. Overall, the findings suggest that EC and Q could mitigate the damage induced by the accumulation of A β and p-Tau aggregates, thereby improving the healthspan in *C. elegans* neurodegeneration models. However, the molecular mechanisms underlying these benefits remain to be elucidated.

To further investigate the pathways involved in these neuroprotective effects, CL4176 (A β thermal-induction model) and BR5270 (p-Tau model) strains were cultivated with or without EC or Q (150 μ M), following which RNA was extracted to be analysed by RT-qPCR. This technique was employed to quantify the relative mRNA expression of several genes associated with the pathological mechanisms of AD, including autophagy (*vha-5*, *epg-8*, *Imp-2*, *pdr-1*, *pink-1*), apoptosis (*ced-7*, *ced-13*), unfolded protein response (*hsp-70*, *xbp-1*, *rpn-6.1*, *ZC239.12*), oxidative stress and inflammatory response (*gst-7*, *daf-16*, *skn-1*, *hsf-1*), tubulin synthesis (*tbce-1*), and Tau suppression (*sut-1*, *sut-2*). In both *C. elegans* AD models, an upregulation of genes associated with the clearance of residual cellular components or damaged organelles (autophagy) was observed in treated animals. In the CL4176 strain, the treatment with the flavonoids resulted in increased expression of *Imp-2*, a key gene involved in the chaperone-mediated autophagy (CMA). In the BR5270 strain, *pdr-1* was upregulated in the EC-treated group, while *pink-1* increased in the Q-treated group, two genes implicated in the degradation of dysfunctional mitochondria (mitophagy). Although the specific type of autophagy differed between the models (CMA in the A β model and mitophagy in the p-Tau model), these results suggest that the stimulation of degradative pathways may contribute to neuroprotection by clearing unfolded proteins or impaired organelles. On the other hand, the mRNA expression level of apoptosis-related genes, including *ced-7* (a transporter that facilitates the recognition of apoptotic cells), was downregulated in CL4176 nematodes treated with EC or Q. Conversely, no significant changes were observed in the expression of apoptosis-related genes in the BR5270 strain. Given that apoptosis is a programmed cell death process that becomes dysregulated in AD and causes excessive neuronal death, the significant reduction in *ced-7* observed in the A β model (CL4176) could indicate an anti-apoptotic effect of flavonoids. However, the transcriptional response to cell death pathways can differ in A β and Tau pathology models, which may explain these differing observations.

The expression of genes related to the unfolded protein response (UPR) was also investigated. The UPR is an adaptive response triggered by endoplasmic reticulum stress, typically caused by disrupted protein homeostasis. In the present study, a downregulation of UPR-related genes was observed in both *C. elegans* models treated with the tested flavonoids. Specifically, *ZC239.12* and *hsp-70* in the A β model (CL4176 strain) and *hsp-70*, *xbp-1* and *rpn-6.1* in the p-Tau model (BR5270 strain). These findings could be interpreted as an indirect reflection of reduced proteotoxic pressure, possibly associated with the activation of the autophagy pathways observed in this study. The attenuated expression of UPR genes might indicate a reduced need for activation due to lower levels of damaged or misfolded proteins. Moreover, the expression of genes involved in the antioxidant response was examined in transgenic nematodes following treatment with EC or Q, as oxidative stress is a key factor in the progression of AD. The relative mRNA expression level of *skn-1*, a transcription factor regulated by insulin/IGF-1 signalling (IIS), was found to be downregulated in both A β and p-Tau expressing models. The decrease in *skn-1* expression in response to flavonoids could be interpreted as a reduction in cellular stress, consistent with attenuated A β and p-Tau induced toxicity. This hypothesis aligns with the activation of autophagy processes described above, given that efficient autophagy could contribute to the reduction of oxidative stress by limiting the accumulation of misfolded proteins and clearing dysfunctional mitochondria and, thereby minimising the excessive production of ROS. Similarly, the expression of *gst-7*, a gene encoding an antioxidant enzyme, was significantly reduced in the CL4176 strain (A β model).

Taken together, the results obtained suggest that the flavonoids EC and Q could exert a neuroprotective effect by modulating the expression of genes related to oxidative stress defence pathways in an integrated manner. This modulation contributes to attenuating the neuronal damage associated with the accumulation of misfolded proteins, oxidative damage, and inflammatory processes.

Finally, it was observed that the nematode group treated with EC in the p-Tau model (strain BR5270) exhibited significantly increased mRNA expression levels of *tbce-1*. This gene is essential for *de novo* α -tubulin synthesis, a process required for the proper assembly of microtubules. In AD, the accumulation of p-Tau destabilises the neuronal cytoskeleton by interfering with the polymerisation of tubulin and compromising microtubule stability. From this perspective, stimulating *tbce-1* expression could mitigate the pathological phenotype of the tauopathy model by promoting neuronal structural integrity.

Although *C. elegans* is a widely used model for studying neurodegeneration, it is characterised by the absence of a blood-brain barrier (BBB). Therefore, an analysis of the permeability across the blood-brain barrier (BBB) of the tested flavonoids (EC and Q) was conducted using the hCMEC/D3 cell line cultured in Transwell plates. Despite evidence suggesting that flavonoids can act as neuroprotective molecules, their bioavailability remains unclear. It is hypothesised that most flavonoids reach the colon, where they are degraded by the gut microbiota into low-molecular-weight phenolics that could enter the bloodstream and be distributed to different tissues, including the brain. For this reason, various phenolic acids that could result from the microbial degradation of flavonoids were also examined for their ability to cross the BBB, specifically protocatechuic acid (PCA), vanillic acid (VA), dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), 3-

(4-hydroxyphenyl)propionic acid (3-4HPA), caffeic acid (CA) and dihydrocaffeic acid (DHCA). All these compounds demonstrated a transport efficiency (TE) ranging from 48% to 63% following three hours of incubation with the cell monolayers. Among them, PCA, VA and 3-4HPA acids were the most permeable, showing a TE greater than 60%. Based on these results, the effect of these three metabolites was investigated in the BR5270 strain of *C. elegans* (p-Tau model) at various concentrations. Treatment with 300 μ M PCA or VA, or 200 μ M 3-4HPA, resulted in enhanced olfactory capacity, as evidenced by an elevated chemotaxis index towards volatile compounds compared to the untreated group. Furthermore, an increase in the longevity of nematodes treated with 300 μ M PCA was also observed. While these results are preliminary, they are promising and lay the groundwork for future research into the neuroprotective effects of dietary phenolic compounds and their metabolites, where the gut microbiota may act as a key mediator.

Conclusion: The flavonoids epicatechin and quercetin were found to exert neuroprotective effects in *in vivo* models of Alzheimer's disease using *Caenorhabditis elegans*. The observed effects include a delay in A β -induced paralysis and enhanced survival, as well as improved chemotactic response to volatile compounds and motor performance, suggesting an attenuation of both A β - and p-Tau-induced toxicity. The results obtained also provided a mechanistic insight into how phenolic compounds may modulate key biological processes relevant to neurodegeneration. Specifically, the stimulation of autophagy and mitophagy, together with the preservation of proteostasis and the reduction of oxidative, inflammatory and apoptotic stress, highlight the potential of polyphenols as dietary agents against AD progression. However, the observed differences between models and pathways suggest that each flavonoid may possess specific mechanisms of action. Additionally, it was demonstrated that flavonoids and phenolic acids derived from their microbial biotransformation can efficiently cross the hCMEC/D3 cell monolayers used as a BBB model, suggesting their ability to reach the central nervous system *in vivo*. These microbiota-derived metabolites were also shown to improve nematodes viability and olfactory response, supporting their role in the neuroprotective effects of flavonoids within the organism. Overall, the findings of this thesis reinforce the potential of dietary phenolic compounds and their metabolites as preventative modulators of AD-related pathologies.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDO

Abstract.....	I
Summary.....	V
Abreviaturas	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad de Alzheimer	1
1.1.1 Características patológicas.....	1
1.1.2 Mecanismos implicados en la EA	4
a) Estrés oxidativo.....	4
b) Disfunción mitocondrial	6
c) Respuesta inflamatoria	7
d) Autofagia	10
e) Apoptosis.....	12
f) Estrés del retículo endoplasmático y respuesta a proteínas mal plegadas	13
g) Ruta de señalización de la insulina	16
h) Síntesis de tubulina y supresión de tau	18
1.1.3 Factores de riesgo y prevención de la Enfermedad de Alzheimer	18
1.2 Compuestos fenólicos	21
1.2.1 Características, clasificación y propiedades bioactivas.....	21
1.2.2 Biodisponibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos	25
1.2.3 Compuestos fenólicos y neuroprotección	29
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio	38
1.3.1 Características generales	38
a) Ciclo de vida	38
b) Anatomía y organización tisular	40
1.3.2 Contribuciones científicas relevantes	43
1.3.3 Ventajas y limitaciones.....	44
1.3.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de neurodegeneración	46
1.3.5 Estudios de compuestos fenólicos en <i>Caenorhabditis elegans</i>	48
II. OBJETIVOS	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS	55
3.1 Materiales y equipos	55
3.2 Reactivos, disolventes y componentes de los medios de cultivo	56
3.2 Material biológico	57
3.3 Procedimientos experimentales y estudios con <i>Caenorhabditis elegans</i>	57
3.3.1 Preparación de placas Petri NGM	57
3.3.2 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> OP50 como fuente de alimento de nematodos	58
3.3.3 Cultivo y mantenimiento de cepas de <i>C. elegans</i>	58
3.3.4 Congelación y descongelación de cepas	58
3.3.5 Sincronización de nematodos	59
3.3.6 Ensayo de parálisis	59
3.3.7 Ensayo de longevidad.....	60

3.3.8 Ensayo de quimiotaxis.....	60
3.3.9 Ensayo de locomoción.....	61
3.3.10 Ensayo de expresión génica en <i>C. elegans</i>	61
3.4 Procedimientos experimentales y estudios con líneas celulares	63
3.4.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular endotelial hCMEC/D3.....	63
3.4.2 Ensayo de viabilidad celular en la línea hCMEC/D3	64
3.4.3 Ensayo de transporte de flavonoides y sus metabolitos a través de hCMEC/D3 .	64
3.4.4 Análisis y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos mediante HPLC.....	65
3.5 Análisis estadísticos	65
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1 Efectos y mecanismos de neuroprotección de compuestos fenólicos frente a la toxicidad del péptido beta amiloide en <i>C. elegans</i>	67
4.1.1 Determinación de la dosis efectiva de EC y Q.....	67
4.1.2 Efectos de EC y Q sobre la esperanza y calidad de vida en el modelo A β	69
4.1.3 Análisis de la expresión de genes asociados a la patología A β	71
a) Autofagia	71
b) Apoptosis y respuesta inflamatoria	74
c) Estrés oxidativo	77
4.2 Efectos y mecanismos de neuroprotección de compuestos fenólicos frente a la toxicidad de la proteína Tau hiperfosforilada en <i>C. elegans</i>	80
4.2.1 Efectos de EC y Q sobre la esperanza y calidad de vida en el modelo p-Tau.....	80
4.2.2 Análisis de la expresión de genes asociados a la patología p-Tau	83
a) Mitofagia, autofagia y apoptosis	83
b) Respuesta a proteínas mal plegadas y estrés oxidativo	87
c) Síntesis de tubulina y supresión de Tau	90
4.3 Transporte de flavonoides y sus metabolitos a través de la barrera hematoencefálica	93
4.4 Efectos neuroprotectores de metabolitos de flavonoides <i>in vivo</i>	100
4.5 Discusión general	102
V. CONCLUSIONES	107
V. CONCLUSIONS	109
VI. REFERENCIAS	111

Abreviaturas

GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*, Glucógeno Sintasa Quinasa
3-4HPA: Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico
ACH: *Amyloid Cascade Hypothesis*, hipótesis de la cascada amiloide
ACN: Acetonitrilo
ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario
AI: alcohol isoamílico
AKT-1/AKT-2: *Protein kinase B*, proteína quinasa B
AP: Apical
APP: *Amyloid Precursor Protein*, Proteína Precursora de Amiloide
ARE: *Antioxidant Response Elements*, elementos de respuesta antioxidante
ARN: Ácido ribonucleico
ARNi: ARN de interferencia
ARNm: ARN mensajero
A β : β -amiloide
bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos-básico humano
BHE: Barrera hematoencefálica
BS: Basolateral
BSC: Cabina de Bioseguridad
BZ: Benzaldehído
CH₃COONH₄: Acetato de amonio
CA: Ácido cafeico
Ca²⁺: Calcio
CaCl₂ · 2 H₂O: Cloruro de calcio dihidratado
CaCl₂: Cloruro de calcio
CBG: Enzima β -glucosidasa citosólica
CGC: *Caenorhabditis* Genetics Center
CMA: Autofagia mediada por chaperonas
C_{máx}: Concentración máxima
COMT: Catecol-*O*-metiltransferasa
DAD: Detector de diodos
DHCA: Ácido dihidrocafeico
DHPAA: Ácido 3-4-dihidroxifenil-acético
DMSO: Dimetil sulfóxido
EA: Enfermedad de Alzheimer
EBM-2: Medio Basal Endotelial-2
EC: (-)-Epicatequina
EGC: Epigallocatequina
EGCG: Epigallocatequina galato
EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico
ERAD: *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*, degradación de proteínas asociada al RE
EtOH: Etanol
EVOM: Voltímetro epitelial con electrodos planos
FBS: Suero Bovino Fetal
FoxO: Factor de transcripción *Forkhead box O*
FUdR: 5-Fluoro-2'-deoxiuridina
GFP: *Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente
GPE: *Grape Pomace Extract*, extracto de orujo de uva
GSPE: *Grape Seed Proanthocyanidin Extract*, extracto de proantocianidinas de semilla de uva
GSTs: Enzimas Glutación S-transferasas

HBSS: Solución Salina Equilibrada de Hanks
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico
H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
HPGDS: Prostaglandina D sintasa hematopoyética
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
HSF1: *Heat Shock Factor 1*, factor de choque térmico 1
HSP: *Heat Shock Proteins*, proteínas de choque térmico
IFC: Circuito fluídico integrado
IGF-1: *Insuline Growth Factor*, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
IGF-1R: *IGF-1 Receptor*, receptor del IGF-1
IIS: *Insulin/IGF-1 Signaling*, vía de señalización de la insulina/IGF-I
IL-6: Interleucina-6
ILPs: *Insulin-like peptides*, péptidos similares a la insulina
IR: *Insulin Receptor*, receptor de la insulina
ISO: Isorhamnetina
K₂HPO₄: Hidrogenofosfato de dipotasio
KCl: Cloruro de potasio
KH₂PO₄: Dihidrogenofosfato de potasio
LAMPs: Proteínas de membrana asociadas al lisosoma
LC3: *Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3*, proteína asociada a microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LPH: lactasa floridzina hidrolasa
MAPs: *Microtubule-associated Proteins*, proteínas asociadas a microtúbulos
MERCS: *Mitochondria Endoplasmic Reticulum Contact Sites*, sitios de contacto mitocondria-RE
MgCl₂ · 6 H₂O: Cloruro de magnesio hexahidratado
MgSO₄: Sulfato de magnesio
MSUT2: *Mammalian Suppressor of Tauopathy 2*, proteína supresora de tauopatía
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Na₂HPO₄ · 7 H₂O: Hidrogenofosfato de disodio heptahidratado
Na₂HPO₄: Hidrogenofosfato de disodio
NaCl: Cloruro de sodio
NaClO: Hipoclorito de sodio (lejía comercial)
NaOH: Hidróxido sódico
NF-κB: factor nuclear kappa B
NGM: Medio de cultivo de nematodos
Nrf2: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
O₂[•]: Radical superóxido
OH[•]: Radical hidroxilo
ONF: Ovillos neurofibrilares
PBS: Disolución salina tamponada con fosfato
PCA: Ácido protocatéquico
PDK-1: *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*
PI(3)P: *Phosphatidylinositol 3-phosphate*, fosfatidilinositol 3-fosfato
PI3K: *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase*, fosfatidilinositol-3-OH quinasa
PIP2: *Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*, fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato
PIP3: *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
p-Tau: Proteína Tau Hiperfosforilada
PTEN: *Phosphatase and tensin homolog*, homólogo de fosfatasa y tensina
Q: Quercetina

RE: Retículo endoplasmático
ROS: Especies Reactivas del Oxígeno
RT-qPCR: PCR cuantitativa con transcriptasa inversa
SEM: Error Estándar de la media
SGLT-1: Transportador de glucosa dependiente de sodio
SGK-1: *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1*
SNC: Sistema nervioso central
SULTs: Sulfotransferasas
TAM: Tamarixetina
TEER: Resistencia eléctrica transepitelial
TNF α : Factor de necrosis tumoral α
TNFAIP1: Proteína 1 inducida por el factor de necrosis tumoral α
TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
UGTs: UDP-glucuronosiltransferasas
UPR: *Unfolded Protein Response*, respuesta a proteínas mal plegadas
VA: Ácido vanílico
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Alzheimer

1.1.1 Características patológicas

El aumento de la esperanza de vida a nivel mundial ha generado un incremento en el número de personas afectadas por enfermedades asociadas al envejecimiento. Entre ellas, la Enfermedad de Alzheimer (EA) destaca por ser la forma más común de demencia en la población mayor de 60 años, siendo la edad el principal factor de riesgo que influye en su desarrollo y progresión. La Organización Mundial de la Salud estimó, en 2019, que más de 55 millones de personas en todo el mundo presentaba algún tipo de demencia y esta cifra podría triplicarse para 2050 impulsada por el aumento en el número de personas mayores (Aguzzoli et al., 2024; Nichols et al., 2022).

El término demencia engloba un grupo de síntomas generales que se manifiestan en diversas enfermedades que provocan un deterioro cognitivo progresivo. Los síntomas más característicos son los problemas de memoria (olvidos frecuentes), dificultades cognitivas (falta de concentración y razonamiento, desorientación, ...), dificultades en la comunicación, alteraciones del comportamiento y pérdida de habilidades para realizar tareas cotidianas. Se estima que la EA representa aproximadamente el 70 % de todos los casos de demencia (Alzheimer's association report, 2024).

En la EA se producen cambios cerebrales que interfieren en las conexiones entre neuronas. Estas alteraciones en las sinapsis neuronales impiden que la señalización química se transmita de manera eficiente por el cerebro y se provocan los problemas cognitivos que surgen como consecuencia de la enfermedad. Los cambios característicos principales son la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$) fuera de las neuronas (placas amiloides o seniles) y la formación, dentro de las neuronas, de ovillos neurofibrilares (ONF) originados por la agregación anormal de la proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau). Todo ello provoca inflamación, atrofia del tejido cerebral (disminución de su volumen) y muerte de neuronas (Zhang, 2023). Aunque las placas seniles y los ONF son características patológicas bien establecidas de la EA, la presencia de una o ambas también se ha descrito en otras enfermedades como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Huntington (Abyadeh et al., 2024).

El péptido $A\beta$ se genera por la escisión de la proteína precursora de amiloide (APP), una glicoproteína transmembrana de paso único que se expresa mayoritariamente en el cerebro y participa en el desarrollo neuronal, la señalización o el transporte intracelular. El procesamiento de esta proteína por la vía no amiloidogénica, mediante la acción de la α -secretasa, escinde la APP dentro de la secuencia $A\beta$, impidiendo la formación del péptido β -amiloide y generando fragmentos no amiloidogénicos, mientras que la vía amiloidogénica conduce a la proteólisis de la APP por la acción secuencial de las enzimas β -secretasa y γ -secretasa, produciendo péptidos $A\beta$ de 37-42 aminoácidos que son propensos a agregarse (Hampel et al., 2021). En particular, los fragmentos $A\beta_{1-40}$ y $A\beta_{1-42}$, presentan alta capacidad para crecer en fibrillas y formar agregados. Son las estructuras patológicas principales del péptido $A\beta$ que se encuentran mayoritariamente en la EA (Funamoto et al., 2020; Korecka & Shaw, 2021). Cuando se produce un desequilibrio entre la producción y la eliminación de los productos de la escisión de la APP, se favorece la

I. INTRODUCCIÓN

acumulación del péptido A β y la formación de placas amiloides (Figura 1), lo que contribuye al desarrollo de la EA (Chen et al., 2017). Por otra parte, las formas solubles de A β pueden activar vías de generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) e inducir la modificación del metabolismo de la proteína Tau, lo que lleva a la formación de ONF y la muerte neuronal. Tanto las formas oligoméricas de A β como de p-Tau actúan de forma sinérgica provocando la disfunción sináptica, no obstante, los mecanismos implicados en la neurotoxicidad de Tau inducida por A β , están aún por identificar (Dourlen et al., 2019; Guerrero-Muñoz et al., 2015).

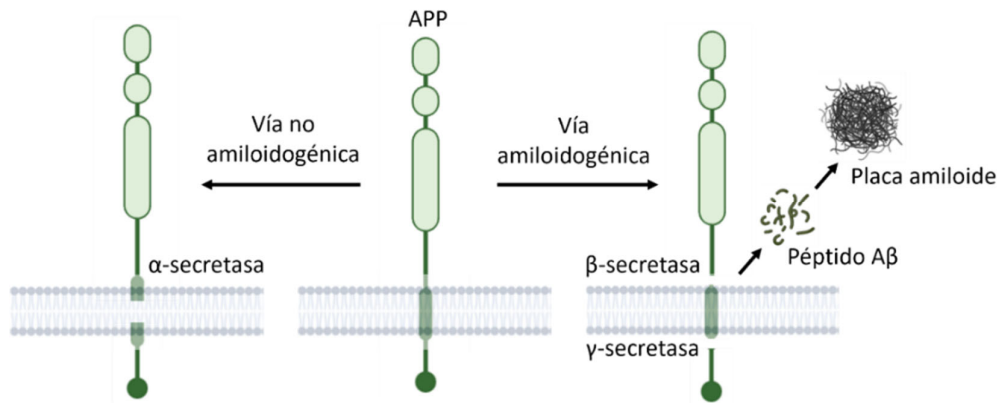


Figura 1: Formación de placas amiloides. En el procesamiento de la APP mediante la vía no amiloidogénica (izquierda), la α-secretasa escinde la APP dentro de la secuencia A β , impidiendo la formación del péptido A β . En la vía amiloidogénica (derecha), la escisión secuencial por la β- y γ-secretasa, produce fragmentos de A β con capacidad de agregarse y formar las placas amiloides. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Tau forma parte de las proteínas asociada a microtúbulos (MAPs, *Microtubule-associated Proteins*). Su función principal es regular el ensamblaje de la tubulina y estabilizar los microtúbulos dentro de la neurona, garantizando el correcto funcionamiento neuronal y el transporte axonal. La unión de Tau a los microtúbulos está regulada por modificaciones postraduccionales entre las que destaca la fosforilación en sitios específicos por la enzima glucógeno sintasa quinasa (GSK-3 β , *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*). Fisiológicamente, Tau es una proteína soluble y desplegada, en cambio, bajo condiciones patológicas como en la EA, la proteína sufre una hiperfosforilación irregular que reduce su afinidad por los microtúbulos y favorece su agregación. Este proceso conduce a la generación de oligómeros de Tau citoplasmáticos insolubles que evolucionan hacia filamentos helicoidales pareados que se agregan formando los ONF, provocando, así, la despolimerización de los microtúbulos (Figura 2) (Mamun et al., 2020; Moore et al., 2023; Wegmann et al., 2021).

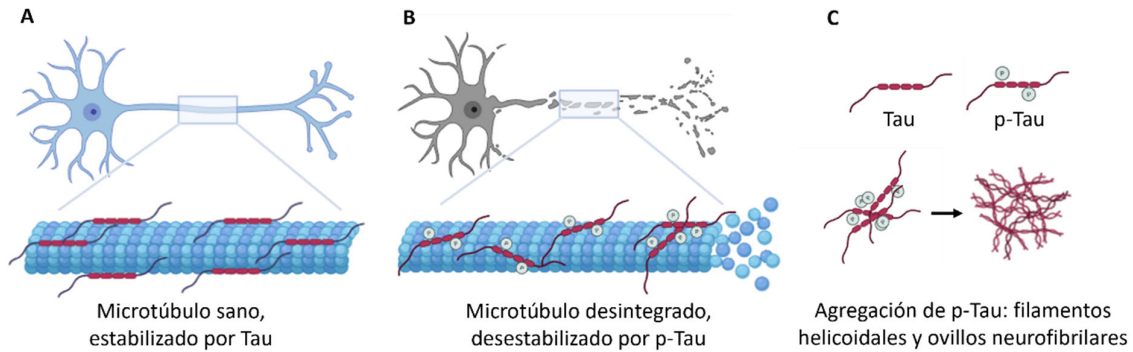


Figura 2: Formación de ovillos neurofibrilares. (A) En condiciones fisiológicas, la proteína Tau estabiliza y promueve el ensamblaje de los dímeros de tubulina que forman los microtúbulos en las neuronas. (B) La hiperfosforilación de Tau (p-Tau) reduce su afinidad por los microtúbulos, favoreciendo su desestabilización y despolimerización. (C) p-Tau se acumula formando oligómeros que evolucionan hacia filamentos helicoidales y, posteriormente, ovillos neurofibrilares. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

En pacientes con EA la proteína Tau presenta un estado de hiperfosforilación, pudiendo contener entre 5 y 9 grupos fosfato, mientras que en condiciones fisiológicas suele presentar únicamente 2-3 grupos fosfato (Ksiezak-Reding et al., 1992). Esta hiperfosforilación anormal conduce a la falta de ensamblaje y a la inestabilidad de los microtúbulos (Chong et al., 2018). Análisis de tejidos humanos *post mortem* han correlacionado los sitios de fosforilación de Tau Ser202/Thr205 y Ser396/Ser404 con la confirmación del diagnóstico de la EA. Además, la fosforilación en Ser396/Ser404 se identificó como uno de los primeros eventos que precede a la aparición de los agregados p-Tau en forma de ONF (Koss et al., 2016; Mondragón-Rodríguez et al., 2014). La fosforilación en Thr231/Ser235 y Ser262 también se correlaciona con la acumulación de p-Tau. Varias quinasas y fosfatasa regulan la fosforilación de Tau y parece que es un desequilibrio en la actividad quinasas/fosfatasa el que contribuiría a la acumulación de p-Tau en la EA (Neddens et al., 2018; Silva & Haggarty, 2020).

La hipótesis de la cascada amiloide (*Amyloid Cascade Hypothesis*, ACH) plantea que los depósitos extracelulares de A β constituyen el primer paso que conduce a la neurodegeneración en la EA. A β actuaría como el desencadenante patológico de la formación de ONF por la acumulación de proteínas Tau, disfunción neuronal y, finalmente, la muerte celular (Hardy & Higgins, 1992). Desde que se planteó esta hipótesis, las investigaciones se centraron casi exclusivamente en las propiedades tóxicas de este péptido, las cuales impulsaron la búsqueda de terapias farmacológicas y no farmacológicas para la EA en las últimas tres décadas.

Verificar o refutar la ACH es crucial para establecer una terapia contra la EA, que se ha enfocado en los últimos años en la toxicidad del A β (Barage & Sonawane, 2015). Sin embargo, la patogénesis de la EA es un proceso complejo que involucra factores genéticos y ambientales. Se han formulado hipótesis alternativas complementarias que apuntan a que la agregación de A β podría ser, en realidad, un evento secundario (consecuencia) de la enfermedad, en lugar de ser el factor desencadenante (Drachman, 2014; Herrup, 2015). Lo que parece estar claro es que, aunque el péptido A β es un factor clave en la patogénesis de la EA, no es suficiente para impulsar la neurodegeneración (Spires-Jones et al., 2017). Una evidencia de ello es el estudio realizado por He et al. (2017), en el que fue necesaria la inyección de la proteína Tau patológica derivada del cerebro humano con EA, para desarrollar una patología significativa de la enfermedad en modelos murinos portadores de placas A β , pero sin sobreexpresión de Tau.

I. INTRODUCCIÓN

Diferentes investigaciones apuntan a que la oligomerización anormal de A β precede a la acumulación de p-Tau. A β podría aumentar la producción de Tau hiperfosforilada al activar varias quinasas (Rajmohan & Reddy, 2017). Por otro lado, se ha descrito que el diseño de inhibidores basados en la estructura del núcleo de A β puede reducir la agregación de p-Tau, lo que sugiere que existe un epítipo común que promueve la agregación tanto de A β como de p-Tau y que la presencia de ambos es necesaria para el deterioro cognitivo (Griner et al., 2019; Sperling et al., 2019). Datos recientes de estudios realizados tanto en modelos celulares como animales, respaldan la hipótesis de que existe una interacción bidireccional entre A β y p-Tau en la EA. Peters et al. (2019) observaron que la delección de Tau en ratones transgénicos APP/PS1 reducía tanto la formación de placas amiloides como su patología asociada. Por el contrario, la sobreexpresión de Tau humana en ratones APP/PS1 incrementó el tamaño de las placas y el daño neurítico (Jackson et al., 2016). Estas evidencias apoyan la idea de que Tau podría ser una molécula clave en el desarrollo de la EA. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a la cooperación entre el péptido A β y las formas patológicas de la proteína Tau para causar la enfermedad siguen siendo difíciles de descifrar (Roda et al., 2022).

1.1.2 Mecanismos implicados en la EA

La EA es una enfermedad multifactorial y heterogénea en términos de composición amiloide, distribución de p-Tau, relación Tau-amiloide y causas genéticas (Madhu & Mukhopadhyay, 2021). No están claros los procesos que llevan a la neurodegeneración y, además, los modelos disponibles para estudiar la EA no reproducen las características neuropatológicas completas (Ferrari & Sorbi, 2021). Parece ser que la deposición de A β en humanos es lenta y prolongada, y es probable que se extienda por más de dos décadas (Villemagne et al., 2011, 2013). Todo ello complica tanto el diagnóstico temprano como el desarrollo de tratamientos efectivos. La existencia de individuos sanos positivos para A β que no presentan síntomas de demencia apunta a que el péptido por sí solo no es suficiente para causar la enfermedad, lo que parece inconsistente con la estructura lineal de la ACH (Herrup, 2015).

Varios autores han revisado y explorado la evolución de la ACH planteando hipótesis alternativas que expliquen el inicio y la progresión de la EA (Karran & De Strooper, 2016; Selkoe & Hardy, 2016; Weaver, 2023). Entre las diferentes hipótesis destacan el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial o la respuesta inflamatoria como posibles mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo de los procesos neurodegenerativos (Dash et al., 2024; Ganguly et al., 2021).

a) Estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), que incluyen moléculas como radicales superóxido (O $_2^{\bullet}$), radicales hidroxilo (OH $^{\bullet}$) y peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$), se originan principalmente durante el proceso de respiración celular y también durante procesos catabólicos en los peroxisomas. Las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa o la catalasa, y los neutralizadores de radicales libres que provienen principalmente de la dieta, como los (poli)fenoles o las vitaminas E y C, participan en la detoxificación de ROS (Brieger et al., 2012). En un organismo sano, existe un equilibrio entre la generación de ROS y la actividad del sistema antioxidante, con un balance ligeramente inclinado a favor de las ROS, ya que los sistemas vivos están adaptados a la coexistencia con niveles bajos de radicales libres, que son utilizados en procesos fisiológicos como la regulación del crecimiento celular, la apoptosis, la

presión arterial o la función cognitiva (Di Meo et al., 2016). Cuando se produce un desequilibrio entre la capacidad de los mecanismos de defensa antioxidante y la generación de ROS se origina el estrés oxidativo (Sies & Jones, 2020). Sin embargo, aún no se conoce cuáles son las concentraciones de ROS que determinan el cambio de los efectos ventajosos a los perjudiciales que desencadena el estrés oxidativo. Además, la amplia gama de posibles dianas, los diferentes tipos celulares, la producción y reactividad de los oxidantes o su localización hacen que la información en este ámbito sea escasa y discordante, lo que dificulta establecer qué fuente de especies reactivas desempeña un papel principal bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Di Meo et al., 2016).

El estrés oxidativo es un proceso crucial en el desarrollo de trastornos neurológicos que afectan al cerebro y al sistema nervioso, siendo el cerebro particularmente vulnerable a este tipo de estrés debido a su alta tasa metabólica y al alto consumo de oxígeno (Cobley et al., 2018). El exceso de ROS afecta directamente a funciones críticas, como la regulación del ciclo celular, la reparación de proteínas, la estabilidad de la cromatina, la eliminación de proteínas dañadas o el metabolismo. Además, el estrés excesivo puede convertir esta respuesta en una señal de muerte, conduciendo a apoptosis y necrosis. Comprender el impacto del estrés oxidativo en trastornos como la EA es fundamental para desarrollar nuevos métodos de tratamiento (Dash et al., 2024).

En los trastornos neurodegenerativos, en los que se incluye a la EA, el estrés oxidativo está estrechamente vinculado con el daño del ADN, el plegamiento aberrante de proteínas y la agregación de estas, lo que contribuye al daño tisular y a la progresión de la enfermedad. Por otro lado, la vulnerabilidad del cerebro al daño oxidativo se acentúa por su alta actividad metabólica y su susceptibilidad a las respuestas neuroinflamatorias mediada por las citoquinas IL-1 α , IL-6 e IL-8, que se originan por la activación de la microglía en respuesta al daño oxidativo (Simpson & Oliver, 2020). El estrés oxidativo también conlleva un aumento en la amiloidogénesis a través de la regulación positiva de la expresión de γ - y β -secretasa y la activación de la GSK-3 β (una de las quinasas involucradas en la fosforilación de Tau) (Tamagno et al., 2021; Toral-Rios et al., 2020). A su vez, afecta a la función mitocondrial debido al papel esencial de las mitocondrias en el metabolismo energético celular y la producción de ROS que, en exceso, pueden causar el deterioro de la función mitocondrial. Todo ello se traduce en una mayor agregación del péptido A β y en el avance de la patogénesis general de la enfermedad (Figura 3) (Nabi et al., 2022; Tamagno et al., 2021). Reducir los niveles de ROS podría disminuir el riesgo de desarrollar la EA protegiendo a las mitocondrias neuronales del daño oxidativo y frenando el aumento de la respuesta inflamatoria.

I. INTRODUCCIÓN

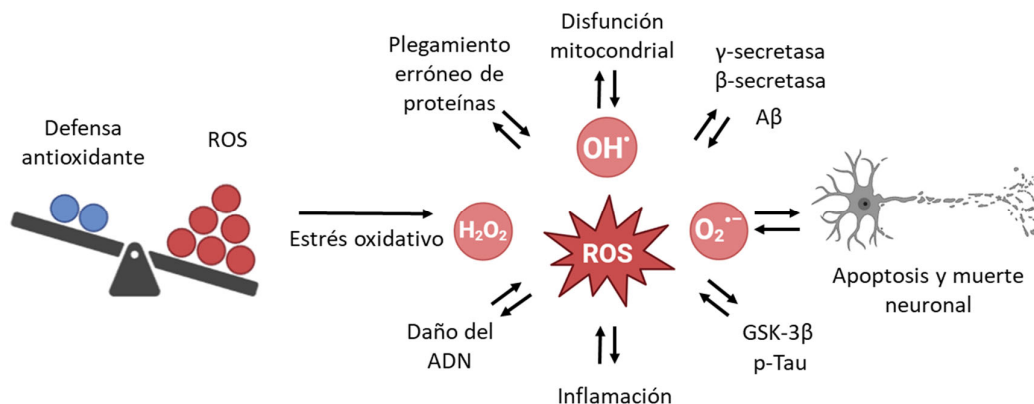


Figura 3: Influencia del estrés oxidativo en la neurodegeneración. El estrés oxidativo causado por el desequilibrio entre las ROS y el sistema de defensa antioxidante contribuye a múltiples procesos patológicos de la EA. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Un mecanismo importante en la defensa celular contra el estrés oxidativo es la activación del factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), que controla la expresión de genes cuyos productos proteicos aumentan la capacidad antioxidante celular. En condiciones homeostáticas, Nrf2 se encuentra en el citoplasma asociado a la subunidad Keap1. Bajo estrés oxidativo leve, se produce un cambio conformacional que permite la disociación de Nrf2 de Keap1 y su traslocación al núcleo. Una vez dentro del núcleo, forma complejos con otras proteínas que reconocen elementos de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Response Elements*), desencadenándose la activación transcripcional de enzimas antioxidantes de fase II y la neutralización de las ROS para prevenir su acumulación de manera descontrolada (Nguyen et al., 2009). La alteración de la homeostasis puede afectar negativamente el equilibrio redox celular, lo que en última instancia provoca el desarrollo de diversas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. En cerebros con EA, se ha observado una disminución en la expresión de Nrf2, así como una alteración de las vías relacionadas con Nrf2. Esto es debido a que las neuronas son altamente vulnerables al estrés oxidativo y requieren una activación rápida y pronunciada de Nrf2. Por tanto, elevar los niveles de Nrf2 podría contribuir a disminuir los daños causados por ROS en la EA (Li et al., 2025; Osama et al., 2020).

b) Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias actúan como centros energéticos de las células, produciendo el ATP necesario para la supervivencia y el funcionamiento óptimo de las neuronas. La actividad oxidativa está estrechamente regulada por los niveles constantes de calcio (Ca^{2+}) en la matriz mitocondrial. Se ha observado que las neuronas de pacientes con EA experimentan disfunción mitocondrial y un déficit bioenergético que contribuyen a la patología de la enfermedad.

En la EA, $\text{A}\beta$ interfiere con la regulación del ion Ca^{2+} , provocando un aumento del Ca^{2+} citosólico en la mitocondria. Esto da lugar a un incremento en la producción de radicales libres y a una reducción en la de ATP (Figura 4), lo que resulta en un estrés oxidativo que induce una elevación en la actividad de γ - y β -secretasa, favoreciendo la acumulación de péptido $\text{A}\beta$. Es decir, los niveles elevados de ROS causan daño oxidativo a los péptidos $\text{A}\beta$ y, al mismo tiempo, los agregados $\text{A}\beta$ pueden provocar una mayor acumulación de ROS y dañar las biomoléculas,

creando un círculo vicioso (Swerdlow, 2018). Por otro lado, la disfunción mitocondrial puede conducir a la acumulación de p-Tau y la despolimerización de microtúbulos en las neuronas cuando los niveles de Ca^{2+} son crónicamente elevados. Modelos de ratón con expresión de formas patógenas de Tau mostraron una disminución de la respiración mitocondrial y un aumento de los niveles de ROS en el tejido cerebral, mientras que la supresión de Tau daba lugar a una disminución de ROS y una mejora en la producción de ATP (Misrani et al., 2021). Son varios los estudios que han sugerido que existe un vínculo intrínseco entre Tau hiperfosforilada y las alteraciones mitocondriales (Kondadi et al., 2014; Melov et al., 2007), sin embargo, el mecanismo subyacente aún no se ha establecido. En definitiva, la disfunción mitocondrial puede ser un inductor previo de la agregación de A β y p-Tau, mientras que la agregación de A β y p-Tau pueden exacerbar aún más la disfunción mitocondrial, creando así una retroalimentación nociva que intensifica el daño neuronal en la EA (Kerr et al., 2017).

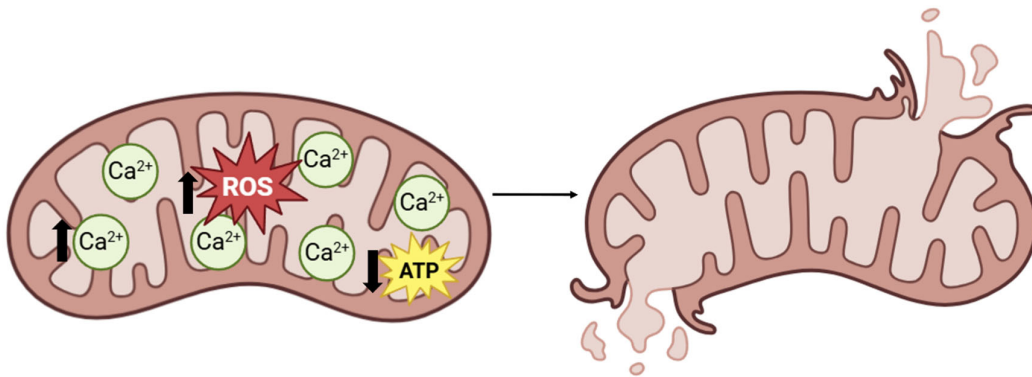


Figura 4: La disregulación de la homeostasis del Ca^{2+} mitocondrial da como resultado un aumento en la producción de ROS y una inhibición de la síntesis de ATP que conduce a la disfunción mitocondrial, contribuyendo así a la acumulación de A β y p-Tau. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Otro efecto asociado al desequilibrio homeostático del Ca^{2+} es la alteración de la mitofagia, proceso celular mediante el cual las mitocondrias dañadas se eliminan selectivamente de la célula. Una mitofagia alterada y defectuosa provoca la acumulación progresiva de mitocondrias disfuncionales en las células, lo que favorece la disrupción sináptica y los déficits cognitivos al desencadenar la acumulación de A β y p-Tau (Pradeepkiran & Reddy, 2020). Además, la acumulación de ROS conduce a la oxidación de proteínas relacionadas con la mitofagia, como Pink1, Parkin y la proteína asociada a microtúbulos 1A/1B-cadena ligera 3 (LC3). Esto causa un declive en sus funciones y, por tanto, fallos en el proceso de mitofagia (Gao et al., 2020). Se ha resaltado la mitofagia como una función crucial en el cerebro, de manera que investigar en terapias relacionadas con la inducción de la misma y, en consecuencia, el mantenimiento de la salud mitocondrial, podría ser una aproximación prometedora para reducir la progresión de la EA (Mishra & Thakur, 2023).

c) Respuesta inflamatoria

La neuroinflamación es un proceso de activación de la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) ante diversas patologías como infecciones, traumatismos, acumulación de toxinas y residuos celulares o acumulación de proteínas anormales. La neuroinflamación puede ser un mecanismo de protección del sistema inmunitario para restaurar el tejido cerebral dañado y mantener la homeostasis. Sin embargo, una respuesta

I. INTRODUCCIÓN

inflamatoria persistente en el tiempo y descontrolada puede dañar a las neuronas y contribuir a la progresión de la neurodegeneración (Leng & Edison, 2021). La respuesta inflamatoria se caracteriza por la producción de citoquinas proinflamatorias, proteínas señalizadoras que inician la inflamación, y producción de ROS que, en exceso, pueden provocar la disrupción sináptica y la muerte neuronal (Calsolaro & Edison, 2016).

Las células inmunitarias implicadas en este proceso son principalmente la microglía y los astrocitos. En condiciones fisiológicas normales, la microglía se encuentra con una disposición celular ramificada, desempeñando un papel de control de la proliferación y regeneración neuronal (Figura 5). Tras una infección o lesión, la microglía se activa liberando diversas sustancias citotóxicas para atacar a los agentes infecciosos y eliminar las células dañadas. Cuando la microglía se activa de forma crónica, las sustancias citotóxicas liberadas pueden dañar el tejido cerebral produciendo trastornos en el SNC (Qin et al., 2023). Los astrocitos son células gliales especializadas cuyas prolongaciones forman la capa externa de la barrera hematoencefálica (BHE) y envuelven estrechamente las sinapsis, actuando como reguladores del flujo sanguíneo cerebral, la homeostasis de fluidos y neurotransmisores, la inducción de la formación de sinapsis y el soporte neurotrófico (nutrición neuronal) (Liddelow & Barres, 2017).

En un entorno patológico, la microglía activada y los astrocitos reactivos que responden ante lesiones y agregados anormales de proteínas, interactúan conjuntamente en la producción de citoquinas proinflamatorias. La comunicación celular cruzada entre la microglía y los astrocitos podría formar un ciclo de retroalimentación en el entorno inflamatorio de la EA, lo que resulta en una respuesta inflamatoria desregulada y autoamplificada. En consecuencia, estas células activadas pierden sus funciones homeostáticas contribuyendo a la eliminación de las estructuras sinápticas, a la inducción de la apoptosis de neuronas y, por tanto, a la disfunción y el daño neuronal (Liddelow et al., 2017). Además, la activación también contribuye a la alteración de la BHE, lo que facilita la acumulación de A β y la progresión de la enfermedad (Kisler et al., 2017). Diferentes estudios han sugerido que la neuroinflamación es un evento que precede a la patogénesis de la EA. Estudios en modelos animales mostraron una activación microglial antes de la formación de placas amiloide, y datos de neuroimagen en humanos con deterioro cognitivo leve confirmaron inflamación sin acumulación detectable de placas (Femminella et al., 2019; Okello et al., 2009; Philippens et al., 2016).

Se ha observado que la microglía de cerebros envejecidos presenta una ramificación reducida, lo cual resulta en una disminución de la superficie de vigilancia neuronal. Esta circunstancia podría contribuir al deterioro de las funciones homeostáticas en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento (Davies et al., 2017). Además, la morfología de la microglía puede atribuirse a la intensidad y duración del agente patológico en respuesta a diferentes estímulos, entre los que se incluyen A β o la agregación de p-Tau (Navarro et al., 2018).

La activación de la microglía generalmente se divide en dos grupos: activación clásica (M1) y la activación alternativa (M2). La activación tipo M1 lleva a un estado inflamatorio y neurotóxico en el que se producen citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), las interleucinas IL-6, IL-1 o IL-1 β o la NADPH oxidasa, enzima clave en la producción de ROS. El tipo M2 desempeña un papel neuroprotector, regulando positivamente la expresión de arginasa 1 y promoviendo la liberación de citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Figura 5) (Colonna & Butovsky, 2017). Sin embargo, esta clasificación ha sido cuestionada debido a la complejidad de las respuestas frente

al envejecimiento, las lesiones y las enfermedades, ya que un mismo estímulo puede inducir tanto la activación M1 como la M2, y pueden coexistir fenotipos intermedios. A pesar de los esfuerzos en generar datos sobre la expresión génica en la microglía a partir de cerebros de ratones y humanos, aún no se ha llegado a un consenso sobre si un conjunto específico de genes puede identificar la microglía asociada a la EA (Boche & Gordon, 2022). Los cambios en la expresión génica responsables de los fenotipos morfológicos siguen siendo difíciles de determinar, pero lo que parece estar bien establecido es que la activación de la microglía desempeña un papel en la propagación de la patología en la EA y hay una correlación entre los niveles de activación microglial y la agregación aberrante de proteínas (Dani et al., 2018; McFarland & Chakrabarty, 2022).

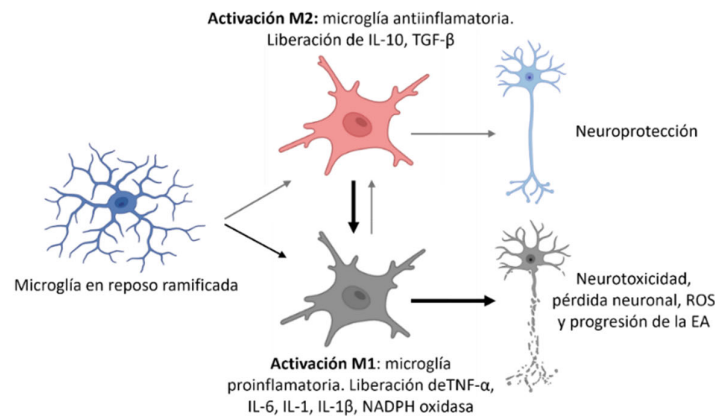


Figura 5: Activación de la microglía. La respuesta inflamatoria desregulada induce la apoptosis neuronal y el progreso de la EA. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Asimismo, la microglía activada también libera ROS, lo que promueve un aumento del daño oxidativo sobre las células neuronales y gliales (Simpson & Oliver, 2020). Si bien se ha observado que, en el caso del estrés oxidativo, la cadena de transporte de electrones mitocondrial es la raíz primordial de las ROS intracelulares, en el caso de la neuroinflamación, la principal enzima oxidativa inflamatoria es la NADPH. Las ROS pueden promover las cascadas de señalización que conducen a una mayor expresión de genes proinflamatorios. Por lo tanto, la neuroinflamación y el estrés oxidativo pueden estimularse mutuamente, especialmente en el estado patológico. Es decir, aunque el estrés oxidativo y la neuroinflamación son dos eventos patológicos distintos, ambos se retroalimentan y son característicos de la EA (D.M. Teleanu et al., 2022).

Como se mencionó anteriormente, la microglía es la primera línea de defensa inmunitaria del SNC. La microglía en estado homeostático también desempeña un papel fundamental en la poda sináptica. Este proceso implica la eliminación de conexiones sinápticas excitatorias e inhibitorias innecesarias y es vital para la formación de circuitos neuronales maduros y eficientes durante el desarrollo cerebral normal (Paolicelli et al., 2011). La desregulación de la poda sináptica es otro indicador del deterioro cognitivo en la EA, ya que sin un funcionamiento adecuado de este proceso el número, la morfología y la función de las conexiones sinápticas se alteran profundamente, lo que resulta en una conectividad anormal (Wilton et al., 2019).

I. INTRODUCCIÓN

Además, la microglía ejerce una función protectora mediante la fagocitación y la eliminación de agregados proteicos patológicos; sin embargo, la captación excesiva de estos agregados podría también conducir a un deterioro de la capacidad fagocítica de la microglía (Gao et al., 2023). Es posible que en una etapa temprana de la enfermedad la respuesta de la microglía sea protectora, ya que la microglía reactiva migra hacia los depósitos patológicos A β o p-Tau para luego engullirlos y eliminarlos. Sin embargo, cuando estos depósitos patológicos en crecimiento estimulan crónicamente la microglía, la microglía protectora puede convertirse en disfuncional, agravando la progresión de la EA. Es decir, el agotamiento sostenido de la microglía afecta a su capacidad para continuar fagocitando y degradando eficientemente los agregados, lo que facilita la propagación de A β y la toxicidad de p-Tau al promover la neuroinflamación (D'Errico et al., 2022; Huang et al., 2021; C. Wang et al., 2022). De este modo, la microglía es un arma de doble filo en la EA. Por un lado, la fagocitosis de A β y p-Tau por parte de la microglía limita su propagación, pero, por otro, también puede acelerarla y conducir a la neurodegeneración. Por lo tanto, mejorar la fagocitosis microglial, reducir la neuroinflamación mediada por la microglía, inhibir la síntesis y secreción de exosomas microgliales y promover la conversión microglial en un fenotipo protector, se consideran estrategias prometedoras para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Dias & Socodato, 2025).

d) *Autofagia*

La autofagia es una vía altamente conservada que degrada componentes celulares, como orgánulos defectuosos o agregados de proteínas mal plegadas, a través de los lisosomas, orgánulos celulares delimitados por una membrana que contiene enzimas hidrolíticas capaces de degradar dichos componentes (Dikic & Elazar, 2018). Existen tres tipos principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA, *Chaperone-mediated autophagy*), que implican todas ellas la entrega de sustratos a los lisosomas para su degradación (Fleming et al., 2022).

La macroautofagia, regulada por los genes ATG, degrada proteínas de larga duración con tendencia a la agregación, complejos proteicos y orgánulos disfuncionales o dañados. La primera estructura morfológicamente distintiva en la macroautofagia es la formación del fagóforo de doble membrana y forma de copa, cuyos bordes se extienden y fusionan para formar un autofagosoma donde quedan envueltos los componentes celulares u orgánulos a degradar. Finalmente, el autofagosoma se fusiona con la membrana lisosomal y la carga se libera para su degradación completa en el lumen del lisosoma (Figura 6A) (Fleming et al., 2022). Un ejemplo de ello es la mitofagia, un tipo de macroautofagia especializada en eliminar las mitocondrias dañadas. La microautofagia implica la degradación de componentes celulares del citosol que pueden integrarse directamente en los lisosomas mediante invaginaciones en la membrana lisosomal (Figura 6B) (Schuck, 2020). Por último, la autofagia mediada por chaperonas es un proceso altamente selectivo en el que se degradan proteínas mal plegadas que atraviesan la membrana lisosomal una a una. Solo las proteínas que contienen una secuencia específica de aminoácidos (*KFERQ-like motif*) pueden ser sustrato de CMA. Esta secuencia se une a la chaperona citosólica HSC70 que transporta la proteína sustrato a la membrana del lisosoma, donde la proteína de membrana asociada a lisosomas tipo 2A (LAMP-2A) facilita su translocación al interior para ser degradadas (Figura 6C) (Kaushik & Cuervo, 2018).

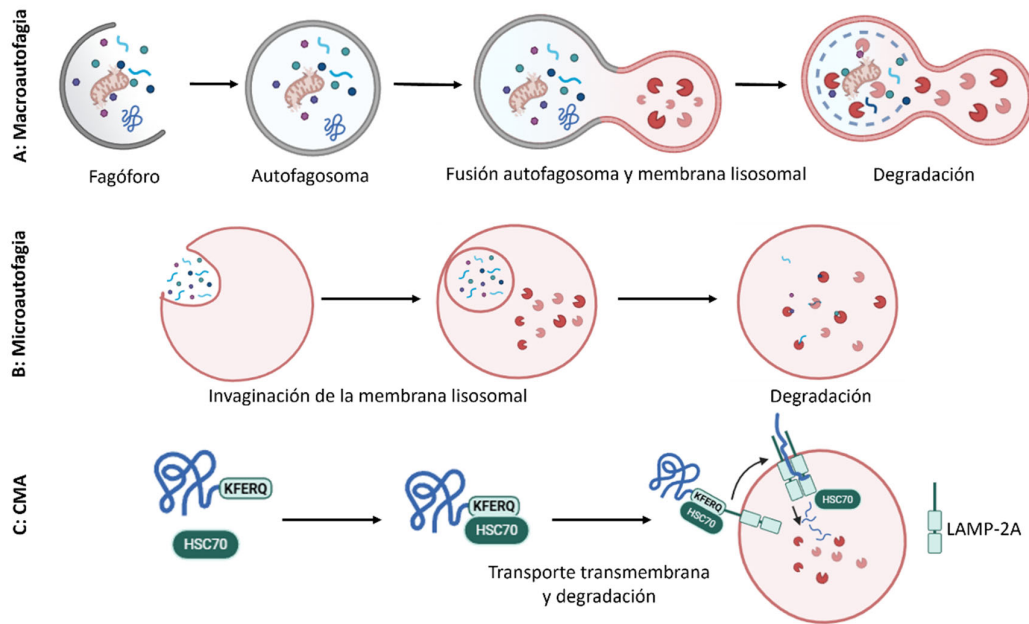


Figura 6: Tipos principales de autofagia. (A) Macroautofagia: formación de autofagosomas, fusión de un autofagosoma con un lisosoma y degradación de la carga. (B) Microautofagia: secuestro directo de componentes celulares por el lisosoma. (C) CMA: reconocimiento del motivo KFERQ por la HSC70 y translocación de proteínas dañadas al lisosoma a través de LAMP-2A. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Diferentes estudios realizados en modelos animales han mostrado signos de declive en los procesos de autofagia durante el envejecimiento debido a una reducción de la función proteolítica lisosomal, lo que altera el flujo autofágico, agravando el deterioro celular y contribuyendo al desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad como la EA. Esto provoca una acumulación de sustratos autofágicos no degradados que comprometen la homeostasis celular (Hansen et al., 2018). También se ha descrito que el deterioro de la autofagia produce inflamación y contribuye a la neurodegeneración (Riffelmacher et al., 2018).

Las neuronas que presentan una acumulación anormal de autofagosomas son características de la EA. Esta acumulación puede ser resultado del deterioro de la función lisosómica por alcalinización (aumento del pH), posiblemente debida a la desregulación de la homeostasis neuronal del Ca^{2+} , descrita anteriormente (Nixon & Rubinsztein, 2024). Se ha encontrado que exosomas derivados de pacientes con EA presentaban niveles elevados de catepsina D, la proteasa principal de los lisosomas. Esto sugiere que la función lisosomal es defectuosa en la EA y que los lisosomas que contienen carga no degradada se acumulan en las neuronas (Goetzl et al., 2015). La actividad irregular de los lisosomas también podría contribuir en los defectos de la mitofagia, a causa de una fusión anómala entre autofagosomas y lisosomas provocando así la acumulación de mitocondrias disfuncionales en las neuronas (Cai & Tammineni, 2016).

Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que un declive de la autofagia dependiente de la edad contribuye al deterioro cognitivo, por lo que estrategias basadas en la modulación de la autofagia podrían tener un impacto en la longevidad y en la reducción del progreso de las enfermedades neurodegenerativas asociadas. Una evidencia de ello fue el estudio realizado en el modelo murino APP/PS1 de EA, en el que se demostró actividad antiinflamatoria al inducir la

I. INTRODUCCIÓN

mitofagia, resultando en una reducción de la neuroinflamación (Fang et al., 2019). Todo ello, sugiere que la autofagia ejerce un papel importante en la regulación de la inflamación y, a su vez, en la mitigación de las enfermedades neurodegenerativas.

La estimulación de la autofagia se ha asociado a la expresión del factor de choque térmico 1 (HSF1, *Heat Shock Factor 1*) y la regulación de las proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*), como la HSP70, que facilitan el correcto plegamiento de las proteínas. HSF1 regula la proteostasis y su activación puede ayudar a restaurar la conformación de proteínas con plegamiento incorrecto y eliminar los agregados proteicos aberrantes al activar los mecanismos de la autofagia y de respuesta a proteínas mal plegadas (Pincus, 2020; Watanabe et al., 2017). Sin embargo, en enfermedades neurodegenerativas como la EA, la respuesta al estrés proteotóxico es defectuosa y los agregados dañinos no se pueden eliminar eficazmente, lo que favorece la acumulación de A β y p-Tau, agravando el daño neuronal (Gómez-Pastor et al., 2018). Estudios en cultivos celulares y modelos animales han demostrado que la activación de HSF1 conduce a una mejora de las capacidades cognitivas y que la pérdida de actividad de HSF1 se asocia con la neurodegeneración. La regulación de HSF1 y la activación de la autofagia son procesos clave para la defensa neuronal frente a estrés proteotóxico y oxidativo, por lo tanto, la modulación de las rutas que promueven la eliminación de agregados proteicos y su correspondiente toxicidad, podría ser una posible estrategia para mitigar la progresión de la EA (Nelson et al., 2025; Zatsepina et al., 2021).

e) Apoptosis

La muerte celular es fundamental para la preservación de la homeostasis tisular que facilita la eliminación de las células dañadas o con potencial destructivo. La apoptosis es el sistema de muerte celular programada más estudiado. Este proceso, dependiente de un alto consumo de energía, está genéticamente programado y regulado mediante vías de señalización que activan proteasas y otras enzimas hidrolíticas, lo que conduce a una secuencia de eventos característicos: encogimiento celular, empaquetamiento de orgánulos, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos que finalmente serán reconocidos por las células fagocíticas (Cavalcante et al., 2019).

Las caspasas son las enzimas responsables del proceso de apoptosis y se activan por vía extrínseca o intrínseca. La señalización apoptótica por vía extrínseca se activa cuando ligandos extracelulares como TNF, citoquinas o TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*; ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) se unen a receptores de muerte transmembrana. La asociación entre los ligandos y sus correspondientes receptores conduce a la estimulación de la caspasa-8 que converge en la vía de ejecución. La vía intrínseca utiliza señales no mediadas por receptores que dependen de las mitocondrias. Es decir, la célula detecta señales intracelulares, como radicales libres, toxinas o citoquinas que provocan la liberación de proteínas proapoptóticas como resultado de los cambios producidos en la membrana mitocondrial por dichos estímulos. Entre estas proteínas proapoptóticas destaca el citocromo C, liberado desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol, el cual desencadena la vía de activación de la caspasa-9, que culmina con las fases posteriores de la apoptosis y demolición de las células. Ambas vías están conectadas a través de la vía de ejecución en la que se activan las caspasas ejecutoras, como la caspasa-3, que facilita la fragmentación del ADN y la finalización del proceso de apoptosis (Figura 7) (Jan & Chaudhry, 2019).

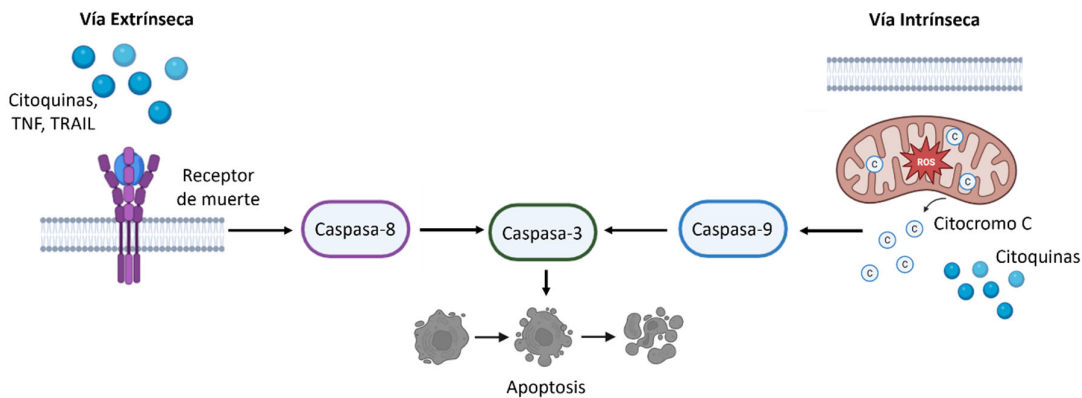


Figura 7: Apoptosis. La vía extrínseca requiere la señalización de receptores de muerte, mientras que la vía intrínseca depende de señales mitocondriales. Ambas vías activan caspasas iniciadoras que, a su vez, activan la caspasa-3, ejecutora de la apoptosis. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Aunque la eliminación del exceso de neuronas es importante para el desarrollo del sistema nervioso, la muerte neuronal aberrante es una de las principales causas de trastornos neurológicos (Fleming et al., 2022). La apoptosis es un proceso regulado, en el que las células experimentan una serie sistemática de eventos que culminan en su erradicación sin perjudicar a los tejidos adyacentes (D'Arcy, 2019). Sin embargo, se ha demostrado que un mal funcionamiento de la vía apoptótica es un factor importante en el desarrollo de enfermedades neurológicas (Chi et al., 2018). Diferentes estudios han observado que las neuronas de pacientes con EA presentaban una sobreexpresión de proteínas apoptóticas, como la caspasa-3, y que esta activación estaba relacionada con la pérdida de sinapsis (Moujalled et al., 2021; Obulesu & Lakshmi, 2014). Tanto la activación microglial como el estrés oxidativo, que conducen a una liberación de citoquinas proinflamatorias y una producción de ROS, conllevan un aumento en la actividad de las caspasas que desencadena la cascada apoptótica de forma anómala (Firdous et al., 2024; Solleiro-Villavicencio & Rivas-Arancibia, 2018). Esto es debido a que las ROS pueden producir una mayor permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que promueve la liberación del citocromo C al citosol con la consiguiente activación de las caspasas (Figura 7). Por lo tanto, la disfunción mitocondrial está también involucrada en la sobreestimulación de moléculas proapoptóticas que aumenta la pérdida de neuronas cerebrales en pacientes con EA (Dash et al., 2024). La supresión de la apoptosis puede mejorar la supervivencia celular en la EA; de esta manera, su inhibición y la consiguiente reducción de la pérdida neuronal podría tener efectos neuroprotectores y mitigar la progresión de la EA (Maiese, 2021; S. Wang et al., 2025).

f) Estrés del retículo endoplasmático y respuesta a proteínas mal plegadas

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo multifuncional que mantiene la homeostasis neuronal mediante la regulación del equilibrio del calcio, la biogénesis lipídica y el procesamiento de las proteínas. En las células eucariotas, el RE es responsable de aproximadamente un tercio de la síntesis proteica total y está altamente especializado en el plegamiento preciso de las proteínas recién sintetizadas (Schwarz & Blower, 2016). El RE también participa en el control de calidad proteico, un mecanismo de defensa que impide la agregación anómala e incorrecta de las proteínas. Los mecanismos de control de calidad proteico reconocen las proteínas mal plegadas, median su retención y las degradan mediante la vía de degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, *Endoplasmic Reticulum-Associated*

I. INTRODUCCIÓN

Degradation) si no alcanzan sus estructuras nativas. La vía ERAD promueve la eliminación de proteínas mal plegadas al exportarlas al citosol, donde se degradan mediante el sistema ubiquitina-proteasoma encargado de eliminar proteínas individuales dañadas (Wang & Le, 2019). Esta actividad minimiza la cantidad de proteínas mal plegadas, lo que previene la agregación proteica aberrante y restaura la proteostasis, ya que un plegamiento proteico correcto es esencial para la función y la supervivencia celular (Berner et al., 2018).

La eficiencia del plegamiento proteico en el RE está muy influenciada por las alteraciones de los estímulos intracelulares y extracelulares. Numerosos factores de estrés celular, como el desequilibrio de la homeostasis del calcio, las alteraciones en el contenido y la composición lipídica, el exceso o la insuficiencia de nutrientes, el desequilibrio redox o los estímulos inflamatorios conducen hacia un plegamiento proteico defectuoso, lo que desencadena una respuesta de estrés del RE (Lemmer et al., 2021). Para restablecer la homeostasis del RE, se activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*), una vía integrada de transducción de señales. Tras la activación de la UPR, se refuerza el control de calidad de las proteínas, aumentando la expresión de genes involucrados en mejorar la capacidad de plegamiento proteico correcto y activar la vía ERAD (Figura 8) (Qi et al., 2017). Sin embargo, bajo estrés crónico o excesivo del RE, la UPR no logra mantener la homeostasis del RE ni resolver los defectos en el plegamiento, lo que activa las vías de señalización de apoptosis que resultan en muerte celular (Han et al., 2013).

En las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, el estrés en el RE y la presencia de agregados de proteínas mal plegadas se observan en las primeras etapas de la fase sintomática, lo que implica que la falta de control de calidad proteico en el RE y la alteración homeostática contribuyen a la neurodegeneración (Kim et al., 2022). Las células neuronales son especialmente sensibles al plegamiento incorrecto de proteínas, por lo que la acumulación excesiva de A β o p-Tau resultará en una sobrecarga para el RE, superando su capacidad para mantener la proteostasis, induciendo un estrés irreversible y, por tanto, causando la disfunción sináptica y muerte neuronal (Waigi et al., 2023). Además, el estrés del RE está estrechamente relacionado con otros procesos patológicos en la EA, como la desregulación del calcio, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y la inflamación (Figura 8) (Nagar et al., 2023).

Entre las múltiples funciones del RE destaca la regulación de los iones Ca²⁺. En las neuronas, el RE libera Ca²⁺ de forma estrictamente controlada para mantener los procesos celulares como la sinapsis o el metabolismo energético. Sin embargo, los agregados A β y p-Tau alteran los canales de calcio del RE, lo que provoca una liberación anormal de calcio al citosol y a las mitocondrias. La alteración de la homeostasis celular del Ca²⁺ se podría considerar como uno de los signos más comunes de disfunción celular en las etapas tempranas de las enfermedades cerebrales, incluida la EA (Callens et al., 2022).

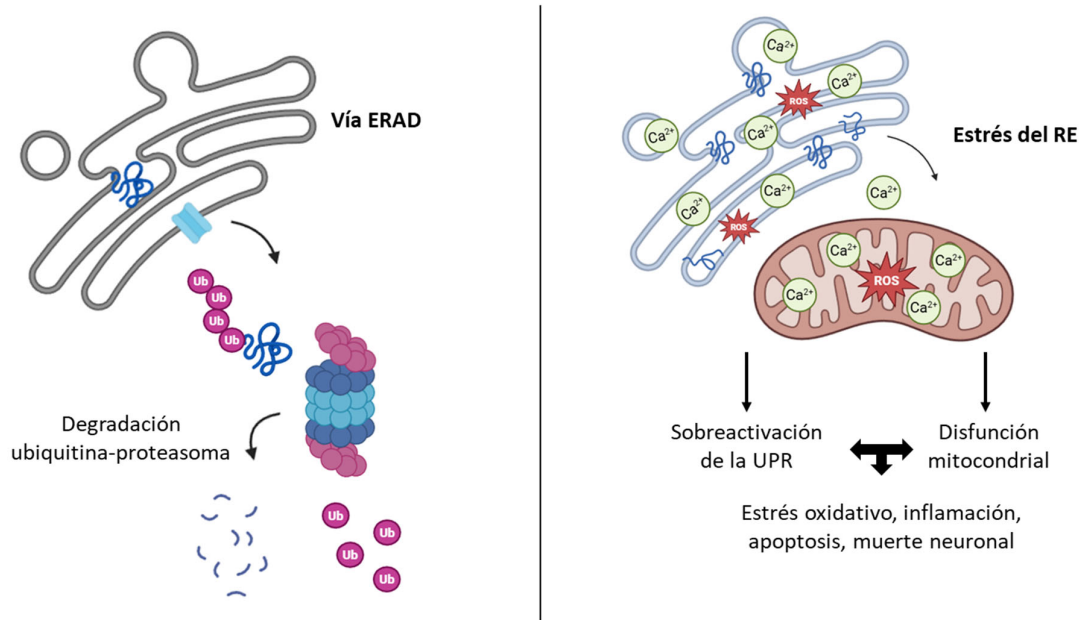


Figura 8: Retículo Endoplasmático. El plegamiento incorrecto de las proteínas activa la UPR para reforzar el mantenimiento de la proteostasis a través de la vía ERAD (izquierda). La acumulación de proteínas defectuosas causa estrés del RE, activación prolongada de la UPR, inducción del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, lo que favorece el daño neuronal (derecha). Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

La captación excesiva de calcio mitocondrial satura la cadena de transporte de electrones; esto provoca una sobreproducción de ROS que conduce al estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Baev et al., 2022). La señalización alterada de calcio y el aumento de ROS también interfieren con la actividad de las chaperonas moleculares del RE, proteínas especializadas en alcanzar y mantener el plegamiento correcto de las proteínas, lo que aumenta aún más el estrés del RE y el acúmulo de proteínas dañadas (Guan et al., 2021). Además, se ha demostrado que existen puntos de contacto entre orgánulos donde dos membranas adyacentes están muy próximas, pero no se fusionan. Estos contactos son fundamentales para la transferencia de lípidos, iones y la señalización entre orgánulos. Los sitios de contacto mitocondria-RE (MERCs, *Mitochondria Endoplasmic Reticulum Contact Sites*) presentan anclajes específicos que actúan sobre funciones cruciales para la supervivencia y la proliferación celular, como el metabolismo lipídico y la homeostasis del Ca^{2+} . El estrés del RE y la UPR afectan al transporte de Ca^{2+} a través de MERCs por un aumento de su permeabilidad, lo que puede disminuir la producción de ATP y la tasa de consumo de oxígeno, conduciendo a la disfunción mitocondrial y al aumento de ROS, con el consiguiente estrés oxidativo y progresión de la EA (Wilson & Metzakopian, 2021).

El estrés crónico del RE y la producción de ROS inducida por la desregulación del calcio inducen la respuesta inflamatoria y la liberación de citoquinas como TNF- α e IL-6. Este entorno neuroinflamatorio crea un ciclo de retroalimentación, intensificando el estrés del RE y acelerando aún más la neurodegeneración. Este círculo vicioso contribuye significativamente a la pérdida neuronal progresiva y al deterioro cognitivo que se observan en la EA (Bellezza et al., 2014; Karvandi et al., 2023).

I. INTRODUCCIÓN

Como se ha señalado, la disfunción del RE y la UPR prolongada en el tiempo pueden conducir al proceso de apoptosis, lo que se conoce como apoptosis inducida por estrés del RE (Cheng et al., 2025). Las enfermedades neurológicas, como la EA, se han relacionado con la muerte celular apoptótica asociada al estrés del RE. Los efectos proapoptóticos inducidos por el estrés del RE se deben a la activación de la caspasa-12 que se almacena en el RE (Obulesu & Lakshmi, 2014). La caspasa-12 activada se mueve del RE al citosol, donde escinde la procaspasa-9 para formar la caspasa-9, que finalmente activa la caspasa-3, la principal ejecutora de la apoptosis (Walia et al., 2021).

El RE, como orgánulo multifuncional, también está implicado en la regulación de la biosíntesis de diferentes clases de lípidos y la distribución de estos en las membranas de los compartimentos celulares. La activación de las vías de estrés del RE puede resultar en la desregulación de la UPR, perturbar el metabolismo lipídico y, en consecuencia, inducir lipotoxicidad en los tejidos periféricos al alterar la composición de los fosfolípidos de membrana, que llevaría a un aumento de la apoptosis inducida por el RE. Por tanto, la homeostasis lipídica anormal puede facilitar la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Jacquemyn et al., 2017; Torkzaban et al., 2020).

Parece evidente que el estrés del RE no actúa de forma aislada, sino que existe un nexo de múltiples mecanismos patológicos asociados a la EA entre los que se incluyen la agregación aberrante de proteínas, la desregulación del calcio, el estrés oxidativo y la neuroinflamación. La EA se reconoce cada vez más como un trastorno multifactorial en el que se superponen las alteraciones de diferentes vías, entre las que resaltan las funciones del RE. Por lo tanto, prevenir y aliviar el estrés del RE podría ser una estrategia terapéutica para mejorar la supervivencia neuronal y para retardar la progresión de la EA (Saleh et al., 2025).

g) Ruta de señalización de la insulina

El factor de crecimiento similar a la insulina, IGF-1 (*Insuline Growth Factor*), es un neuropéptido involucrado en múltiples acciones del sistema nervioso central. Entre ellas destacan la neurogénesis, la homeostasis cerebral, la diferenciación y proliferación celular o la sinaptogénesis. Además, desempeña un papel crucial en la función cognitiva y el envejecimiento (Lewitt & Boyd, 2019). Diferentes estudios en modelos animales han demostrado que la deficiencia de la vía de señalización del IGF-1 provoca un aumento del estrés oxidativo, lo que se asocia al deterioro cognitivo (Herrera et al., 2024; Zegarra-Valdivia et al., 2019). Con el tiempo, las alteraciones del IGF-1 podrían contribuir a los mecanismos fisiopatológicos de la EA, entre los que se incluyen, además del estrés oxidativo, la inflamación, la disfunción mitocondrial y la alteración del metabolismo de la glucosa (Zegarra-Valdivia et al., 2025).

El metabolismo de la glucosa, sustrato esencial del cerebro, se regula por la unión de la insulina a sus receptores. Tanto la insulina como el IGF-1 se unen a receptores tirosina quinasa, IR (*Insulin Receptor*) e IGF-1R respectivamente, que comparten un alto grado de identidad en su estructura y función. Estos receptores median la translocación de insulina e IGF-1 al cerebro a través de la BHE y ambos interactúan en la regulación de la glucosa y en el mantenimiento de la integridad del SNC (Fernández & Torres-Alemán, 2012). Se ha observado que durante las primeras etapas de la EA el flujo sanguíneo cerebral disminuye y, con ello, la captación de glucosa a través de la BHE. Una disminución en la utilización de la glucosa y las alteraciones en el metabolismo energético provocan disfunción mitocondrial, generación de estrés oxidativo y un aumento en la acumulación de ROS (Dewanjee et al., 2022). La disfunción mitocondrial es la principal causa del mal funcionamiento de las vías de señalización de la insulina, lo que afecta a

los receptores tirosina quinasa, IR e IGF-1R, alterando las actividades relacionadas con la cadena de fosforilación. La insulina y el IGF-1 regulan la fosforilación de Tau mediante la inhibición de GSK-3 β (Glucógeno Sintasa Quinasa 3 beta) en las células cerebrales. Las alteraciones en la señalización de la insulina provocan un aumento de la actividad de la GSK-3 β que conduce a la hiperfosforilación de Tau y producción de ovillos neurofibrilares, lo que a su vez promueve el desarrollo y la deposición de A β (Figura 9). De manera bidireccional, la acumulación de A β antagoniza la unión de la insulina y el IGF-1 a sus receptores correspondientes, lo que empeora la resistencia a la insulina/IGF-1 en las neuronas (Bedse et al., 2015; Nguyen et al., 2020).

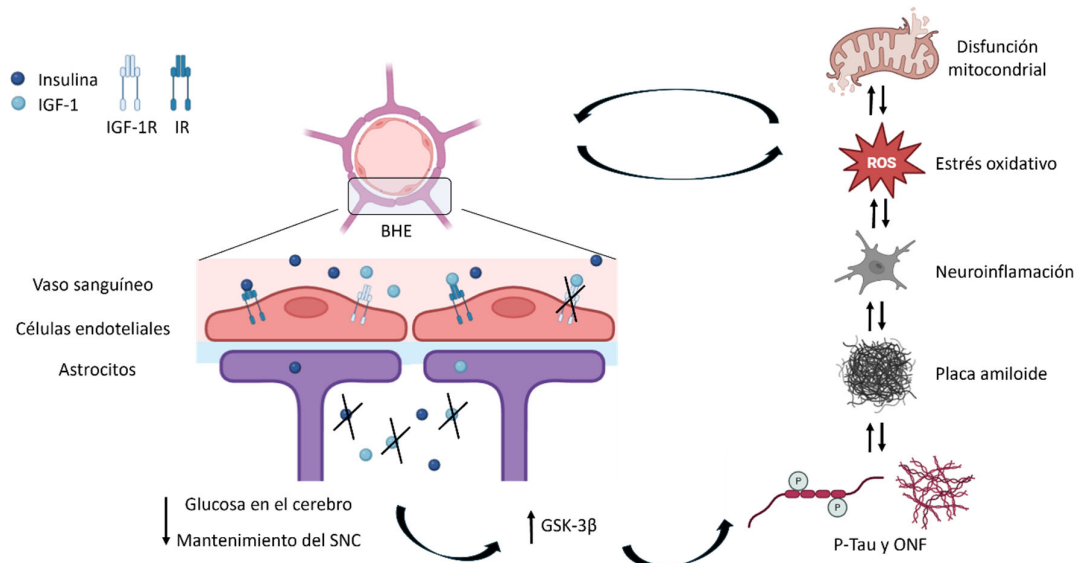


Figura 9: Ruta de señalización de la insulina en la EA. Las alteraciones en el transporte de la insulina y el IGF-1 desde el torrente sanguíneo hasta el cerebro, impulsan la desregulación de la función neuronal y los diferentes mecanismos celulares y moleculares asociados a la neurodegeneración. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

Por otro lado, bajo condiciones de resistencia a la insulina y GSK-3 β sobreactivada, los receptores IR e IGF-1R producen la estimulación de los factores de transcripción *Forkhead box O* (FoxO), reguladores cruciales de la respuesta celular al estrés oxidativo. A corto plazo, la activación de FoxO ejerce efectos antioxidantes mediante la regulación de enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa. Sin embargo, la activación prolongada en el tiempo de FoxO, debido a la incapacidad para lidiar con el estrés oxidativo en exceso, contribuye a la sobreexpresión de la proteína precursora de amiloide y la γ -secretasa, lo que finalmente conduce a la formación de placas de A β , ovillos neurofibrilares, aumento de la apoptosis neuronal y deterioro cognitivo (Figura 9) (Kang et al., 2022; Miao et al., 2025). Dentro de la familia de proteínas FoxO, la sobreexpresión de FoxO3 se ha vinculado a la neurodegeneración en la EA, al provocar la activación de citocinas proinflamatorias y la muerte neuronal. Por el contrario, el aumento de la expresión de FoxO1 ha demostrado ser capaz de reducir la producción de A β y la fosforilación de p-Tau en estudios en células y modelos animales; es decir, dependiendo de las condiciones específicas, diferentes FoxO pueden desempeñar funciones distintas. También se ha observado que el daño oxidativo y el aumento de la muerte neuronal pueden prevenirse mediante la inhibición de FoxO3. Estas evidencias sugieren que la regulación de las proteínas FoxO por la vía de señalización de la insulina/IGF-1, podría ser una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de la EA (Asadi et al., 2025; Maiese, 2021).

I. INTRODUCCIÓN

h) Síntesis de tubulina y supresión de tau

Los microtúbulos son los componentes principales que forman el esqueleto celular. Están compuestos por dímeros de α -tubulina y β -tubulina que interactúan formando estructuras cilíndricas huecas. Las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAPs) contribuyen a su estabilización protegiéndolos de la desagregación de las subunidades de tubulina y promoviendo la adición de nuevas unidades. Entre las MAPs mejor estudiadas se encuentra la proteína Tau, predominante en los axones de las células neuronales (Baas et al., 2016; Kadavath et al., 2015).

Las alteraciones en la estructura y organización de los microtúbulos contribuyen a la patogénesis de la EA y, de hecho, las disfunciones del citoesqueleto se han descrito como un rasgo característico de esta enfermedad. En este caso, la proteína Tau desempeña un papel crucial y los cambios patológicos se relacionan principalmente con su hiperfosforilación, ya que esta provoca su desprendimiento de los microtúbulos y, a medida que avanza la enfermedad, la acumulación de ovillos neurofibrilares (ONF) compuestos por p-Tau conduce a la desestabilización de los microtúbulos y a la pérdida de actividad sináptica (Figura 2) (Cyske et al., 2023). Sin embargo, diferentes estudios han evidenciado que la destrucción o la atenuación de la síntesis de tubulina *de novo* puede inducir a las anomalías de Tau, respaldando la idea de que la alteración en la homeostasis de la tubulina causada por modificaciones postraduccionales inadecuadas, como la reducción de la acetilación de la α -tubulina, promueve la fosforilación anormal de Tau, lo que conduce a una espiral de patogenicidad (Fujiwara et al., 2020). Por ello, el estudio del comportamiento de los microtúbulos y de compuestos que favorezcan la síntesis y ensamblaje de la tubulina podría ofrecer una estrategia terapéutica para mejorar la neurodegeneración (Ballatore et al., 2012; Ezzo & Etienne-Manneville, 2025).

No obstante, a pesar de que se conoce que el ensamblaje anormal de Tau altera la proteostasis neuronal en enfermedades neurodegenerativas, actualmente no existen terapias dirigidas a controlar el depósito de p-Tau. En diversos estudios se ha observado que la inactivación de la proteína supresora de tauopatía MSUT2 (*Mammalian Suppressor of Tauopathy 2*) en ratones que expresaban Tau humana mutada reducía la deposición de Tau insoluble y de ONF, a la vez que se conseguía mitigar el deterioro cognitivo y preservar la salud neuronal en el hipocampo y la memoria. Por el contrario, la sobreexpresión de MSUT2 exacerbaba el fenotipo de tauopatía provocado por un aumento en la acumulación de p-Tau, neuroinflamación y pérdidas de neuronas (Baker et al., 2021; Wheeler et al., 2019). La identificación de compuestos que modulen o inhiban MSUT2 podría suponer un efecto neuroprotector para las enfermedades relacionadas con los agregados p-Tau.

1.1.3 Factores de riesgo y prevención de la Enfermedad de Alzheimer

La patogénesis de la EA es un proceso complejo y multifactorial que involucra factores genéticos, biológicos y ambientales, cuyas causas exactas aún no se han establecido con claridad y para la cual aún no se ha desarrollado ningún tratamiento curativo a pesar del gran esfuerzo realizado en investigación. En la actualidad, los enfoques farmacológicos disponibles se centran en el manejo del deterioro cognitivo, de manera que las estrategias terapéuticas para tratar los trastornos neurodegenerativos proporcionan un alivio temporal de los síntomas, pero no abordan los mecanismos subyacentes de estos trastornos (Yashaeva et al., 2025). Se han propuesto diversas explicaciones para los fracasos de los ensayos clínicos, como la administración tardía durante la progresión de la enfermedad, dosis inadecuadas de fármacos o

dianas terapéuticas erróneas. Además, la barrera hematoencefálica debe superarse para llegar al cerebro, lo que supone otro desafío en la administración de los tratamientos (Du et al., 2021; R.I. Teleanu et al., 2022). El desarrollo de terapias y biomarcadores para la detección temprana de la EA está avanzando, pero aún no es suficiente, por lo que la prevención es clave. Cambios en el estilo de vida, como adoptar una dieta mediterránea, hacer ejercicio y leer para promover la estimulación cognitiva, podrían ayudar a prevenir el deterioro (González et al., 2025). La disminución del rendimiento cognitivo comienza a partir de los 45 años y aumenta con la edad debido a cambios estructurales y funcionales en el cerebro (Bishop et al., 2010; Singh-Manoux et al., 2012).

Los factores de riesgo en la EA pueden clasificarse como no modificables y modificables. Entre los no modificables se incluyen principalmente los factores genéticos, la edad y el sexo (Sala Frigerio et al., 2019). La edad es el mayor de estos tres factores de riesgo. De este modo, el envejecimiento de la población, con un mayor porcentaje de adultos mayores, aumentará significativamente el número de personas con EA, pero la edad avanzada por sí sola no es suficiente para causarla (Nelson et al., 2011). También se ha observado que la prevalencia de la EA es superior en mujeres (Alzheimer's association report, 2025). Esta diferencia podría explicarse, en parte, por la mayor esperanza de vida de las mujeres en comparación con los hombres. No obstante, la prevalencia y la incidencia de la enfermedad pueden variar según la región geográfica y el contexto socioeconómico y cultural. Se ha descrito una mayor incidencia en mujeres de países de ingresos bajos, lo que podría estar relacionado con desigualdades estructurales, entre ellas el menor acceso histórico a la educación, factor estrechamente vinculado con la capacidad de compensación cognitiva frente al daño neuropatológico (Gong et al., 2023).

Respecto a los factores genéticos, se han descubierto variantes de genes que aumentan o disminuyen el riesgo de padecer Alzheimer. Entre ellos, el gen *APOE*, que proporciona la estructura de una proteína que transporta el colesterol en el torrente sanguíneo y garantiza el aporte de lípidos a las neuronas, un proceso crucial para la homeostasis de la membrana neuronal. El gen *APOE* tiene tres alelos: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$. El alelo $\epsilon 4$ se ha vinculado al aumento de los depósitos del péptido $A\beta$, de la proteína p-Tau y de la neuroinflamación. El riesgo de desarrollar EA aumenta al heredar una copia del alelo $\epsilon 4$ y aún más al heredar dos copias. Se cree que la forma $\epsilon 3$ tiene un efecto neutro, mientras que las personas que poseen $\epsilon 2$ presentan un riesgo menor en comparación con tener la forma $\epsilon 3$ o $\epsilon 4$. Los diagnósticos clínicos han indicado que más del 65 % de los pacientes con EA poseen al menos un alelo $\epsilon 4$ (Liu et al., 2014; Serrano-Pozo et al., 2021). Por otro lado, mutaciones autosómicas dominantes en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2* favorecen una mayor generación de la forma $A\beta_{42}$, la más propensa a agregarse. Además, fallos en los mecanismos de degradación, junto con factores como el estrés oxidativo e inflamación crónica, dificultan la eliminación de $A\beta_{42}$, lo que lleva a la acumulación en el cerebro de oligómeros de alto peso molecular que dan lugar a las placas seniles (Dourlen et al., 2019). Otro gen que se ha identificado como contribuyente a la aparición y progresión de la EA es *TREM2*, que codifica una proteína receptora transmembrana expresada principalmente en la microglía cerebral que controla la supervivencia, proliferación, estado de activación y la fagocitosis de neuronas apoptóticas y placas $A\beta$, mitigando así potencialmente los aspectos neuroinflamatorios de la EA. Sin embargo, la mutación R47H compromete la función normal de la proteína *TREM2*, lo que provoca una disminución de la capacidad fagocítica y una alteración de las respuestas microgliales, que confirman el papel de la microglía en la patogénesis de la EA

I. INTRODUCCIÓN

(Gratuze et al., 2018; Jay et al., 2017). Nuevas evidencias han demostrado que la activación de *TREM2* es capaz de aliviar la neuroinflamación, aumentar la eliminación de A β y mejorar el rendimiento cognitivo en ratones APP/PS1 (Ruganzu et al., 2021; P. Wang et al., 2022). En conjunto, la evidencia sugiere que la activación de *TREM2* en la microglía podría ser beneficiosa para la mitigación de la EA.

No obstante, existe una interacción entre los factores de riesgo genéticos y los relacionados con el estilo de vida que podría alterar la expresión génica o la función de las proteínas codificadas por los genes de susceptibilidad a la EA y, por tanto, modular sus efectos sobre el riesgo de enfermedad. Entre estos factores se encuentran el tabaquismo, el consumo de alimentos ultraprocesados y de alcohol o el sedentarismo (Edwards et al., 2019). El estilo de vida se incluye entre los factores de riesgo potencialmente modificables, donde la actividad física, el descanso y la dieta, así como las actividades intelectuales y sociales, pueden reducir el riesgo de desarrollar la EA (Guo et al., 2025). En particular, se considera que las modificaciones de los hábitos alimentarios son una estrategia clave para prevenir la EA, ya que los nutrientes ingeridos pueden modular el sistema inmunológico e influir en las vías neuroinflamatorias (McGrattan et al., 2019).

Las recomendaciones dietéticas eficaces tienen implicaciones de gran alcance para la salud pública y el creciente número de personas con demencia en la población. Diferentes investigaciones han reportado que los patrones dietéticos, como los asociados a la dieta mediterránea, puede reducir significativamente el riesgo de sufrir deterioro cognitivo (Ellouze et al., 2023). Este tipo de dieta se caracteriza por una ingesta baja de ácidos grasos saturados, un consumo moderado de productos lácteos, como queso y yogur; y una ingesta alta de verduras, legumbres, frutas, cereales, pescado y ácidos grasos insaturados. Se ha demostrado que este patrón dietético reduce el estrés oxidativo, la apoptosis y las células que contienen acortamiento de telómeros; de hecho, el consumo de vegetales se ha relacionado con una mayor longitud de telómeros (Gu et al., 2015; Román et al., 2019). Por el contrario, una dieta alta en grasas saturadas y con un alto índice glucémico, basada en alimentos y bebidas procesados ricos en azúcares, acelera el deterioro cognitivo al inducir estrés oxidativo, neuroinflamación y la consiguiente acumulación de A β y p-Tau, que impulsan el círculo vicioso de la neurodegeneración en la EA. Además, este tipo de alimentación también deteriora la microbiota intestinal involucrada en el eje intestino-cerebro (Fung et al., 2017; Więckowska-Gacek et al., 2021). Una dieta equilibrada y rica en frutas y verduras puede ser beneficiosa para prevenir el deterioro cognitivo y, por lo tanto, reducir la probabilidad de desarrollar EA. Sin embargo, seguir patrones dietéticos saludables puede no ser suficiente para reducir el riesgo de deterioro cognitivo, por lo que deberían complementarse con otros hábitos, como la práctica de ejercicio físico (De la Rosa et al., 2020). Es también importante considerar los compuestos de la dieta de forma individual para determinar qué grupos de alimentos están relacionados con la neuroprotección y tienen mayor probabilidad de proteger contra las enfermedades cerebrales. Entre estos componentes, por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, destacan los compuestos fenólicos, comúnmente designados como polifenoles, que se encuentran presentes en vegetales. Numerosos estudios en modelos celulares y animales, así como estudios observacionales y de intervención, han sugerido los beneficios de una dieta rica en polifenoles y su capacidad para aliviar los síntomas asociados a la EA y otros trastornos neurodegenerativos (Liu et al., 2019; Román et al., 2019; Yan et al., 2022). Sin embargo, los mecanismos exactos de estos potenciales beneficios no están bien establecidos y se requieren más investigaciones para su elucidación y establecer las rutas moleculares involucradas (Liu et al., 2019).

1.2 Compuestos fenólicos

1.2.1 Características, clasificación y propiedades bioactivas

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen el grupo más abundante de metabolitos secundarios de las plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, con más de 8000 moléculas descritas en la naturaleza (González-Sarrías et al., 2020). Aunque existe gran variabilidad en su estructura, su característica común es la presencia de uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos directamente a, al menos, un anillo aromático. Los compuestos fenólicos se clasifican en diferentes grupos según el patrón de su estructura básica, el número de anillos fenólicos y la naturaleza y posición de los grupos funcionales sobre el esqueleto carbonado. Esta clasificación abarca desde moléculas relativamente simples, como los ácidos fenólicos, hasta moléculas polimerizadas de peso molecular alto, como los taninos.

Los (poli)fenoles pueden subdividirse en dos clases: no flavonoides y flavonoides. Dentro de los no flavonoides se incluyen ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), estilbenos, cumarinas y lignanos (Tabla 1). En este texto, se utilizarán indistintamente las denominaciones «compuestos fenólicos» o «(poli)fenoles» para referirse a estos compuestos de manera general, y «polifenoles» exclusivamente cuando se haga referencia a moléculas más complejas con varios anillos aromáticos y varios grupos hidroxilo.

Tabla 1: Clasificación y estructura básica de los principales grupos de compuestos fenólicos.

No Flavonoides	Derivados del ácido benzoico	Derivados del ácido cinámico
	Ácidos fenólicos	
Lignanos		Estilbenos
Flavonoides		

Los compuestos fenólicos desempeñan funciones indispensables durante todo el ciclo de vida de la planta, como el crecimiento, la floración, la maduración del fruto y la pigmentación, así como en la protección frente a diversos factores bióticos (patógenos) y abióticos (temperatura, sequía, salinidad, alcalinidad o radiación UV) (Šamec et al., 2021; Xu & Wang, 2025). Estos tipos de estrés aumentan los niveles de ROS, lo que provoca daño oxidativo. En este sentido, la biosíntesis de estos metabolitos secundarios es esencial para mantener los niveles

I. INTRODUCCIÓN

adecuados de ROS, ya que a los (poli)fenoles se les atribuye comúnmente una alta capacidad antioxidante, determinada por su estructura química (Olszowy, 2019). Al mismo tiempo, los compuestos fenólicos son una fuente importante de antioxidantes en la dieta humana y por ello han generado gran interés como moléculas bioactivas que podrían tener efectos beneficiosos en la salud humana (Zhang et al., 2021).

Entre las distintas clases fenólicas, los flavonoides sobresalen por su abundancia en frutas y verduras (Shen et al., 2022). La estructura química general de estos compuestos consiste en un esqueleto común C6–C3–C6, en el que dos anillos aromáticos (A y B) se unen mediante una cadena de tres carbonos que generalmente forma un anillo de pirano heterocíclico (C) que contiene un átomo de oxígeno (Figura 10) (Santos-Buelga & González-Paramás, 2016). Según el grado de oxidación, saturación e hidroxilación del anillo central, los flavonoides se pueden clasificar en diferentes subgrupos, siendo los más abundantes los flavan-3-oles, las flavanonas, las flavonas, las isoflavonas, los flavonoles y los antocianos (Tabla 2).

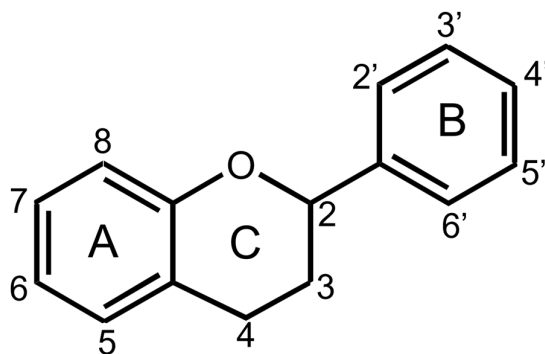


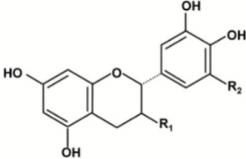
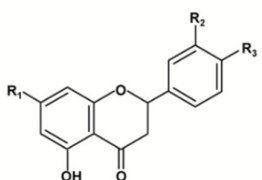
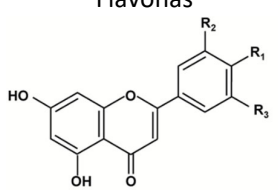
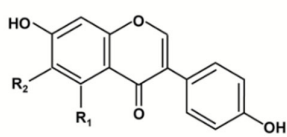
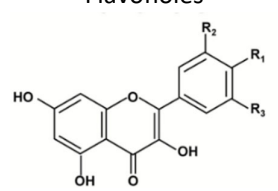
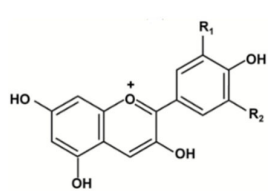
Figura 10: Estructura general de los flavonoides.

Las moléculas de flavonoides suelen estar hidroxiladas en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4' y/o 5', y pueden sufrir además metilación, acetilación, prenilación o sulfatación. En su estado natural, pueden presentarse en forma libre (agliconas), como derivados glicosilados o acilados, y como estructuras oligoméricas y polimerizadas, como los taninos condensados (también llamados proantocianidinas) derivados de la condensación de unidades flavan-3-ol (Santos-Buelga & González-Paramás, 2016). La Tabla 2 muestra la estructura de cada clase, ejemplos representativos y algunos de los alimentos de la dieta donde se pueden encontrar estos compuestos (Shen et al., 2022; Tohge et al., 2017).

Los flavonoides son sintetizados a través de la ruta shikimato/fenilpropanoide. Resumidamente, el ácido shikímico, tras varias reacciones enzimáticas, da lugar a los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina, que actúan como precursores de los siguientes pasos metabólicos. En la biosíntesis de los flavonoides, la fenilalanina se transforma en *p*-cumaroil-CoA mediante la acción de la fenilalanina amonio liasa, la 4-hidroxilasa del ácido cinámico y la 4-cumarato-CoA ligasa. El *p*-cumaroil-CoA reacciona con el malonil-CoA (derivado del acetil-CoA) bajo la acción de la chalcona sintasa para generar una calcona que, mediante reacciones de ciclización e hidroxilación, da lugar gradualmente a las diferentes clases de flavonoides (W. Liu et al., 2021; Santos-Buelga & González-Paramás, 2016).

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 2: Principales clases de flavonoides. Adaptado de Santos-Buelga & González-Paramás (2016).

Clase y estructura	Ejemplos	Fuente alimenticia																					
Flavan-3-oles 	<table><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th></tr><tr><td>Catequina</td><td>−OH</td><td>H</td></tr><tr><td>Epicatequina</td><td>···OH</td><td>H</td></tr><tr><td>Galocatequina</td><td>−OH</td><td>OH</td></tr><tr><td>Epigallocatequina</td><td>···OH</td><td>OH</td></tr></table>		R1	R2	Catequina	−OH	H	Epicatequina	···OH	H	Galocatequina	−OH	OH	Epigallocatequina	···OH	OH	Cacao Té verde Uva Manzana Vino tinto						
	R1	R2																					
Catequina	−OH	H																					
Epicatequina	···OH	H																					
Galocatequina	−OH	OH																					
Epigallocatequina	···OH	OH																					
Flavanonas 	<table><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th><th>R3</th></tr><tr><td>Naringenina</td><td>OH</td><td>H</td><td>OH</td></tr><tr><td>Hesperetina</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>Isosakuranetina</td><td>OH</td><td>H</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>Eriodictiol</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td></tr></table>		R1	R2	R3	Naringenina	OH	H	OH	Hesperetina	OH	OH	OCH ₃	Isosakuranetina	OH	H	OCH ₃	Eriodictiol	OH	OH	OH	Naranja Limón Pomelo Lima Mandarina	
	R1	R2	R3																				
Naringenina	OH	H	OH																				
Hesperetina	OH	OH	OCH ₃																				
Isosakuranetina	OH	H	OCH ₃																				
Eriodictiol	OH	OH	OH																				
Flavonas 	<table><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th><th>R3</th></tr><tr><td>Crisina</td><td>H</td><td>H</td><td>H</td></tr><tr><td>Apigenina</td><td>OH</td><td>H</td><td>H</td></tr><tr><td>Luteolina</td><td>OH</td><td>OH</td><td>H</td></tr><tr><td>Diosmetina</td><td>OH</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td></tr></table>		R1	R2	R3	Crisina	H	H	H	Apigenina	OH	H	H	Luteolina	OH	OH	H	Diosmetina	OH	OCH ₃	OCH ₃	Apio Perejil Zanahoria Manzanilla Orégano	
	R1	R2	R3																				
Crisina	H	H	H																				
Apigenina	OH	H	H																				
Luteolina	OH	OH	H																				
Diosmetina	OH	OCH ₃	OCH ₃																				
Isoflavonas 	<table><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th></tr><tr><td>Genisteína</td><td>OH</td><td>H</td></tr><tr><td>Daidzeína</td><td>H</td><td>H</td></tr><tr><td>Gliciteína</td><td>H</td><td>OCH₃</td></tr></table>		R1	R2	Genisteína	OH	H	Daidzeína	H	H	Gliciteína	H	OCH ₃	Soja Habas Tofu Garbanzos Cacahuets									
	R1	R2																					
Genisteína	OH	H																					
Daidzeína	H	H																					
Gliciteína	H	OCH ₃																					
Flavonoles 	<table><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th><th>R3</th></tr><tr><td>Quercetina</td><td>OH</td><td>OH</td><td>H</td></tr><tr><td>Kaempferol</td><td>OH</td><td>H</td><td>H</td></tr><tr><td>Miricetina</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td></tr><tr><td>Isorhamnetina</td><td>OH</td><td>OCH₃</td><td>H</td></tr></table>		R1	R2	R3	Quercetina	OH	OH	H	Kaempferol	OH	H	H	Miricetina	OH	OH	OH	Isorhamnetina	OH	OCH ₃	H	Cebolla Brócoli Uva Kale Puerro	
	R1	R2	R3																				
Quercetina	OH	OH	H																				
Kaempferol	OH	H	H																				
Miricetina	OH	OH	OH																				
Isorhamnetina	OH	OCH ₃	H																				
Antocianos 	<table><tr><th></th><th>R1</th><th>R2</th></tr><tr><td>Cianidina</td><td>OH</td><td>H</td></tr><tr><td>Delfinidina</td><td>OH</td><td>OH</td></tr><tr><td>Malvidina</td><td>OCH₃</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>Pelargonidina</td><td>H</td><td>H</td></tr><tr><td>Petunidina</td><td>OH</td><td>OCH₃</td></tr><tr><td>Peonidina</td><td>OCH₃</td><td>H</td></tr></table>		R1	R2	Cianidina	OH	H	Delfinidina	OH	OH	Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	Pelargonidina	H	H	Petunidina	OH	OCH ₃	Peonidina	OCH ₃	H	Arándano Frambuesa Berenjena Col lombarda Uva tinta
	R1	R2																					
Cianidina	OH	H																					
Delfinidina	OH	OH																					
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃																					
Pelargonidina	H	H																					
Petunidina	OH	OCH ₃																					
Peonidina	OCH ₃	H																					

I. INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos ricos en flavonoides se ha asociado a beneficios para la salud, que clásicamente se han relacionado con su actividad antioxidante. Estos compuestos muestran capacidad para transferir átomos de hidrógeno y electrones a especies oxidantes, como los aniones superóxido o los radicales hidroxilo, lo que estabiliza los radicales libres y protege frente a la oxidación. El potencial para neutralizar radicales libres varía según el número y la posición de los grupos hidroxilo existentes en el anillo B, así como con la presencia de un doble enlace conjugado ($C2=C3$) y un grupo carbonilo ($C=O$) en el anillo C. Estas características estructurales facilitan la deslocalización electrónica a lo largo del sistema de tres anillos flavonoide, confiriendo estabilidad al radical aroxilo derivado (Bors et al., 1990). Otro mecanismo que contribuye a la actividad antioxidante de los flavonoides es su capacidad para actuar como quelantes de iones metálicos, como Fe^{2+} y Cu^{2+} , implicados en la generación de radicales libres (Figura 11).

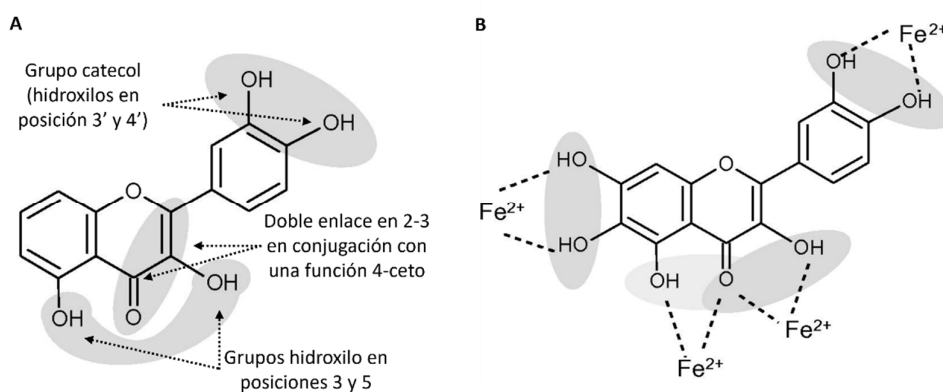


Figura 11: Requerimientos estructurales asociados a la capacidad antioxidante de los flavonoides como captadores de radicales libres (A) y quelantes de metales (B). Las áreas resaltadas indican las posiciones de máxima actividad. Adaptado de Fraga et al. (2010).

Por otro lado, también se ha señalado que tienen capacidad para activar enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa o catalasa, e inhibir aquellas prooxidantes que estimulan la formación de ROS como xantina oxidasa o el complejo NADPH oxidasa (D'Amelia et al., 2018; Dias et al., 2021). Asimismo, se ha descrito que podrían actuar como moduladores de cascadas de señalización intracelular vitales para la función celular. Así, por ejemplo, se ha observado que son potentes inhibidores de la señalización de proteínas quinasa implicadas en la transducción de señales durante la activación celular en la inflamación, participando en la reducción de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Baier & Szyszka, 2020; Ysrafil et al., 2023), mientras que inducen la activación de factores de transcripción, como el Nrf2, que controla la expresión de genes que aumentan la capacidad antioxidante y antiinflamatoria celular (Saha et al., 2020). De este modo, a través de diversos mecanismos, los flavonoides podrían ayudar a contrarrestar el estrés oxidativo provocado por un incremento de ROS, un proceso crucial en el origen de las enfermedades neurodegenerativas, lo que contribuiría a la prevención de trastornos neurológicos como la EA (Jomova et al., 2025).

Existen diversos factores que afectan a las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los flavonoides. Cuando estos compuestos se encuentran glicosilados o metilados, el número y la posición de estos sustituyentes suelen reducir su capacidad antioxidante, ya que los grupos $-OH$ quedan bloqueados y menos disponibles para donar

electrones (Shen et al., 2022). No obstante, los glicósidos de flavonoides también pueden mostrar cierta actividad, en algunos casos comparable a la de sus agliconas (Xiao, 2017). Aunque tengan mayor capacidad antioxidante que las formas glicosiladas, las agliconas muestran menor biodisponibilidad debido a su rápida metabolización, la cual constituye otro de los factores determinantes en las propiedades bioactivas de los polifenoles (Santos-Buelga & González-Paramás, 2016).

En su conjunto, los compuestos fenólicos, y particularmente los flavonoides, representan un grupo de metabolitos vegetales con implicaciones para la salud humana, cuyos beneficios están determinados por la matriz alimentaria y la cantidad consumida, así como por su biodisponibilidad, metabolismo e interacciones de con la microbiota intestinal.

1.2.2 Biodisponibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos

Para evaluar la eficacia de los polifenoles en la prevención de enfermedades y la mejora de la salud humana, es importante comprender su naturaleza química y su distribución en la dieta, a fin de determinar aquellos compuestos con mayor potencial en términos de biodisponibilidad. El término “biodisponibilidad” hace referencia al porcentaje de un compuesto ingerido que alcanza la circulación sanguínea y ejerce sus efectos biológicos en el sitio de acción. Para que un compuesto sea biodisponible debe ser bioaccesible, es decir, debe liberarse de la matriz alimentaria para ser capaz de absorberse en el tracto gastrointestinal. La bioaccesibilidad depende de las características fisicoquímicas del compuesto (como solubilidad o estructura química) y está fuertemente influenciada por las interacciones con otros componentes de la matriz alimentaria, como la fibra, los lípidos y las proteínas (Santos-Buelga et al., 2019).

Generalmente, la biodisponibilidad de los flavonoides es relativamente baja debido a las limitaciones en la absorción, las modificaciones que sufren a lo largo del tracto gastrointestinal, al metabolismo hepático y a una rápida excreción (Tsanova-Savova et al., 2018). Se ha estimado que las concentraciones plasmáticas de polifenoles y sus metabolitos, tras un consumo habitual, se encuentran en el rango de nmol/L y, ocasionalmente, en concentraciones muy bajas del orden de $\mu\text{mol/L}$ (Rodríguez-Mateos et al., 2014), alcanzándose los niveles plasmáticos máximos entre 1 y 2 horas después de la ingesta, en el caso de los metabolitos conjugados derivados de la absorción en el intestino delgado, y entre 6 y 24 horas para los metabolitos producidos por la microbiota intestinal (Santos-Buelga et al., 2019). Se ha indicado que, de las diferentes clases de flavonoides, las isoflavonas son las más biodisponibles, seguidas de flavonoles, flavan-3-oles y flavanonas y, por último, proantocianidinas y antocianos (Di Lorenzo et al., 2021). A pesar de las limitaciones en su biodisponibilidad, diversos estudios han demostrado que los flavonoides y sus metabolitos ejercen efectos beneficiosos sobre la salud humana, con especial relevancia en la neuroprotección (Del Rio et al., 2013; Rodrigo-Gonzalo et al., 2022), de la que se hablará en las siguientes secciones.

La mayoría de los flavonoides en los alimentos, a excepción de los flavan-3-oles, se presentan en forma de glicósidos (o, en su caso, como polímeros; p.ej., taninos), que no pueden absorberse en su forma nativa. La absorción de los glicósidos en el intestino delgado se asocia a la acción hidrolítica de enzimas como la lactasa floridzina hidrolasa (LPH), ubicada en el cepillo de las células epiteliales, que presenta una amplia especificidad por los flavonoides-O- β -D-glucósidos; una vez liberadas, las agliconas pueden ingresar en el enterocito por difusión pasiva debido a su mayor lipofilicidad en comparación con las formas glicosiladas (Day et al., 2003;

I. INTRODUCCIÓN

Németh et al., 2003). Alternativamente, algunos glucósidos pueden ser transportados directamente al interior del enterocito mediante transportadores de membrana como el transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT-1); posteriormente, dentro de la célula la enzima β -glucosidasa citosólica (CBG) sería capaz de hidrolizar los glucósidos y liberar las agliconas (Cassidy & Minihane, 2017; Gee et al., 2000).

Estudios en modelos celulares de enterocito (Caco-2) tratados con diferentes derivados glicosilados de cianidina y quercetina en la cara apical, detectaron cianidina 3-*O*-glucósido, cianina (cianidina 3,5-diglucósido), quercetina 3- β -*D*-glucósido y rutina (quercetina 3-rutinósido) en el compartimento basolateral, sugiriendo que podrían haber sido transportados directamente por el transportador de hexosas GLUT2, el cual desempeñaría un papel clave en la absorción de glucósidos de algunos tipos de flavonoides (Zhang et al., 2020). No obstante, la estructura del compuesto y el número y tipo de azúcares unidos al flavonoide tendría un impacto notable en la forma de absorción, el metabolismo y, consecuentemente, en su funcionalidad. Los mismos autores mostraron que los glicósidos de flavonoides testados también bloqueaban significativamente la captación de glucosa. El hecho de que estos compuestos actuaran como competidores potentes de la captación de glucosa a través de GLUT2 proporciona un respaldo al consumo de alimentos ricos en flavonoides que puede contribuir a la homeostasis de la glucosa, reduciendo así el riesgo de desarrollar trastornos metabólicos como la diabetes y la hiperglucemia, que también se relacionan con el mantenimiento del sistema nervioso central (Zhang et al., 2020).

Una vez absorbidos, tanto los flavonoides como otros compuestos fenólicos llegan al hígado a través de la vena porta donde experimentan un metabolismo enzimático de fases I y II. En fase I, pueden sufrir oxidación o desmetilación por las monooxigenasas del citocromo P450. Sin embargo, los productos derivados del metabolismo de fase I tienden a ser metabolitos minoritarios al ser sustratos potenciales del metabolismo de fase II (Cassidy & Minihane, 2017). En fase II, los compuestos pueden conjugarse con ácido glucurónico, sulfato y grupos metilo en reacciones catalizadas por UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs), sulfotransferasas (SULTs) y catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), respectivamente. Los glucurónidos, sulfatos y ésteres metílicos generados ingresan posteriormente en sangre o se reabsorben en el lumen intestinal a través de transportadores ABC (ATP-binding cassette) (Murota et al., 2018; Rodríguez-Mateos et al., 2014). Los metabolitos que entran al torrente sanguíneo se distribuyen en el organismo a diferentes tejidos, donde podrían ejercer su bioactividad, o son excretados por orina (Figura 12) (Lippolis et al., 2023). De este modo, los compuestos que pueden alcanzar los objetivos metabólicos son químicamente y, en muchos casos, funcionalmente distintos de los presentes en los alimentos (Kroon et al., 2004). En general, los metabolitos conjugados tienen menor capacidad para donar hidrógenos y actuar como captadores de radicales libres que los compuestos originales (Dueñas et al., 2010, 2011). No obstante, a pesar de su menor bioactividad, parte de los efectos asociados al consumo de flavonoides se han relacionado con sus metabolitos de fase II. Se ha comprobado que algunos metabolitos conjugados pueden ser nuevamente desconjugados en sus dianas celulares, liberando la aglicona, que sería la responsable final de los efectos producidos (Galindo et al., 2012; Pérez-Vizcaino et al., 2012; Terao et al., 2011). Se ha estimado, sin embargo, que solo el 5-10 % de la ingesta total de polifenoles de la dieta se absorbe directamente a través del estómago o el intestino delgado; el resto (90-95 %) llega al colon, donde interaccionan y pueden ser transformados por la microbiota intestinal (Clifford, 2004).

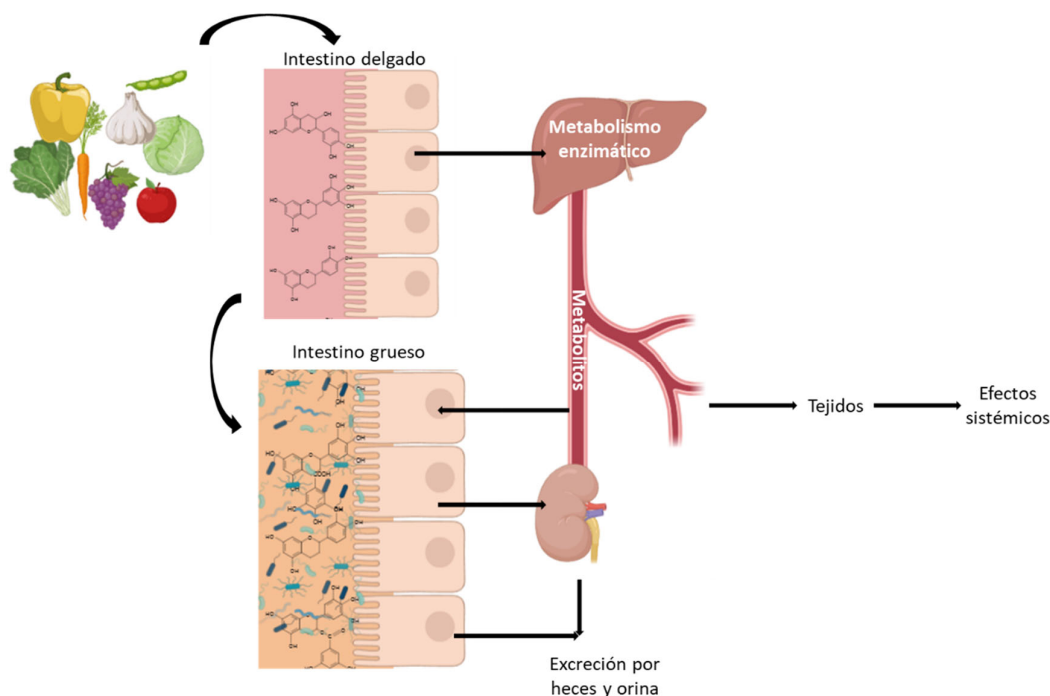


Figura 12: Panorama general del metabolismo y los efectos de los polifenoles dietéticos sobre la salud. Adaptado de Cueva et al. (2017). Imagen elaborada con iconos de <https://www.biorender.com/>

Las interacciones entre sustancias fenólicas y la microbiota intestinal pueden actuar en un doble sentido. Por una parte, las bacterias del colon son capaces de degradar los polifenoles dando lugar a metabolitos que pueden ser absorbidos y ejercer efectos en el organismo. Por otra, los compuestos fenólicos y sus metabolitos microbianos pueden influir sobre la microbiota e inducir efectos prebióticos, estimulando el crecimiento de bacterias beneficiosas (como lactobacilos y bifidobacterias) e inhibiendo la acción de las patógenas (Dueñas et al., 2015; Rodríguez-Daza et al., 2021).

La microbiota colónica produce una amplia gama de enzimas bacterianas, como las β -glicosidasas, capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos entre los azúcares y los polifenoles, liberando las agliconas correspondientes (Baky et al., 2022). Asimismo, pueden expresar glucuronidasas y sulfohidrolasas, lo que permite la desconjugación de glucurónidos y sulfatos, generando las formas libres (Williamson et al., 2018). Las agliconas liberadas pueden ser adicionalmente biotransformadas mediante reacciones de descarboxilación, desmetilación, deshidroxilación e hidrogenación, que simplifican las estructuras del compuesto antes de ser eventualmente absorbido. En el caso de los flavonoides, se puede producir la ruptura del heterocíclico oxigenado (anillo C), con separación de los restos correspondientes a los anillos aromáticos A y B, dando lugar a catabolitos de bajo peso molecular, principalmente ácidos fenólicos (Figura 13) (Wang et al., 2023).

I. INTRODUCCIÓN

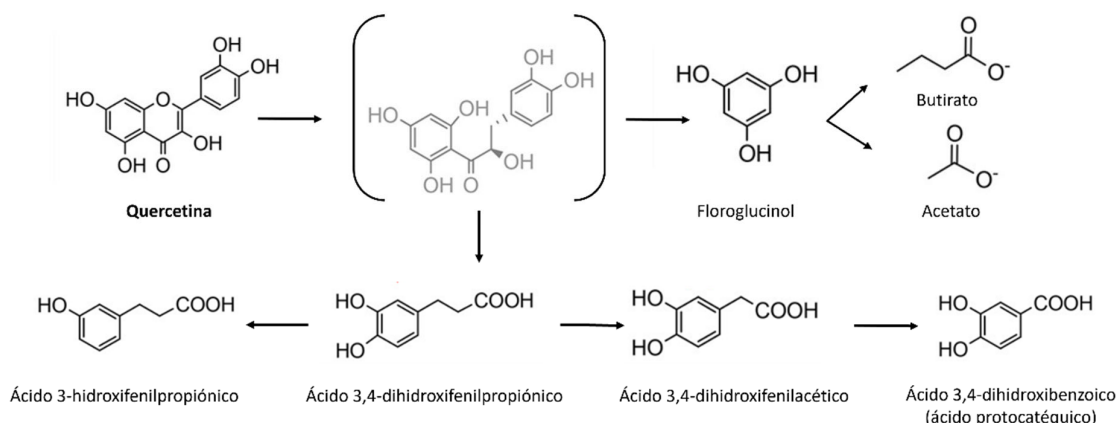


Figura 13: Ejemplo de degradación del flavonol quercetina por las enzimas bacterianas de la flora colónica en ácidos fenólicos y derivados relacionados. Adaptado de Wang et al. (2023).

Algunos de los catabolitos predominantes generados por la microbiota a partir de los flavonoides son ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico. Entre ellos, destacan por ser de los más comunes los ácidos protocatéquico (PCA), vanílico (VA), 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA), 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA), dihidrocafeico (DHCA) y cafeico (CA) (Figura 14). Los ácidos fenólicos generados a partir del metabolismo microbiano son fácilmente absorbidos a través del epitelio colónico y pasan directamente a circulación sistémica o, de manera más frecuente, entran al sistema hepático donde son conjugados por enzimas de fase II (UGTs, SULTs, COMT) antes de ingresar en el torrente sanguíneo y distribuirse a los órganos distales (L. Chen et al., 2018; Oteiza et al., 2018). Cabe destacar que, tras ser procesados por microorganismos, la bioactividad de algunos metabolitos de flavonoides puede incluso aumentar, lo que potencia los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los compuestos originales (Baky et al., 2022; Cassidy & Minihane, 2017). Además, una fracción significativa del carbono derivado de los glucósidos y del anillo A puede metabolizarse a ácidos grasos de cadena corta que se integrarían al metabolismo energético del huésped (Wang et al., 2024).

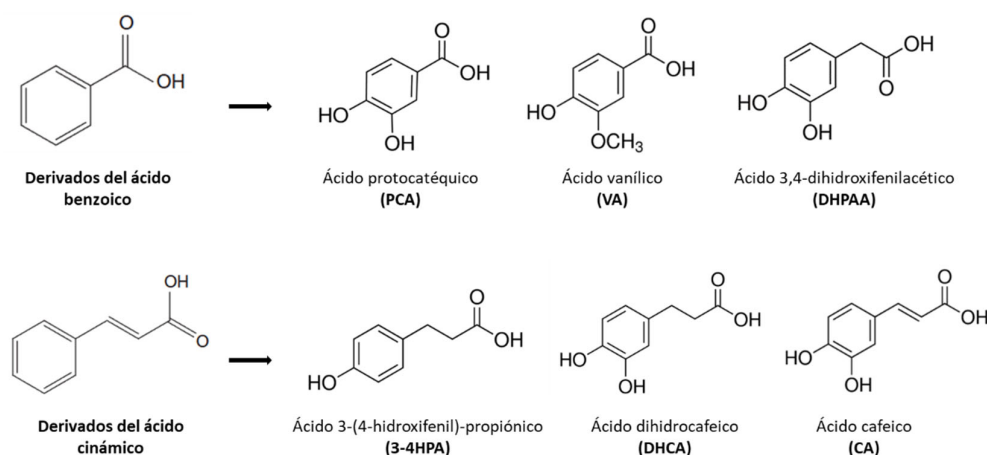


Figura 14: Estructura química de los ácidos fenólicos más comunes generados por la flora colónica a partir de flavonoides de la dieta. Adaptado de Williamson & Clifford (2017).

Al igual que otros compuestos fenólicos como los flavonoides, los ácidos fenólicos también han demostrado poseer diferentes actividades biológicas relacionadas con efectos beneficiosos en la salud humana. Entre otras, diversos autores han informado que diferentes compuestos de esta familia pueden actuar como antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos, antidiabéticos o anticancerígenos (Santos-Buelga et al., 2023). Sin embargo, las interacciones entre el entorno, el huésped, sus hábitos y los microorganismos, dificultan la identificación de los mecanismos implicados en los efectos. Por ello, se requiere mayor investigación sobre las cepas microbianas específicas y las moléculas producidas por los microorganismos que actúan como mediadores de los efectos biológicos y sus dianas moleculares en el huésped (Medina-Rodríguez et al., 2026).

Asimismo, se debe tener en cuenta que la composición de la microbiota intestinal es variable entre individuos y, además, puede cambiar en el tiempo en un mismo individuo. Pueden existir, por tanto, importantes diferencias interindividuales e intraindividuales en cuanto a biodisponibilidad, absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos, por lo que los efectos producidos podrían variar según la idiosincrasia de la persona y las circunstancias (Williamson, 2025; Williamson & Clifford, 2017).

1.2.3 Compuestos fenólicos y neuroprotección

En los últimos años, los compuestos fenólicos y, más concretamente los flavonoides, han generado un gran interés en el campo de las enfermedades neurodegenerativas que se atribuye tanto a su potencial antioxidante y antiinflamatorio como a la generación de metabolitos bioactivos derivados de su interacción con la microbiota intestinal. Son numerosos los estudios *in vitro* e *in vivo* que han demostrado su eficacia y beneficios preventivos contra diversos trastornos neurológicos; sin embargo, resulta complejo determinar los mecanismos de acción específicos (Shen et al., 2022).

La evidencia epidemiológica reciente, en la que se incluyen estudios experimentales y observacionales, sugiere que una mayor ingesta de polifenoles se asocia con una mejor función cognitiva. A pesar de ello, esta evidencia presenta limitaciones y resultados heterogéneos, lo que hace necesario estudios más controlados y consistentes para confirmar o complementar los resultados de investigaciones previas (Colizzi, 2019). Shishtar et al. (2020) examinaron la relación entre la ingesta total de seis clases de flavonoides dietéticos y el riesgo de desarrollar la EA, abordando las limitaciones de estudios observacionales previos. Entre las limitaciones encontradas en los cinco estudios observacionales prospectivos anteriores revisados por estos investigadores se incluían el uso de bases de datos parciales de flavonoides, la falta de consideración de la calidad general de la dieta o la evaluación de ésta únicamente al inicio del estudio. Tras un seguimiento promedio de 19.7 años a 2801 participantes adultos estadounidenses concluyeron que las personas con mayor ingesta de flavonoles y antocianos presentaban un menor riesgo de sufrir EA en comparación con aquellas con menor ingesta (Shishtar et al., 2020).

Una reciente revisión sistemática de estudios observacionales que investigan la relación entre el consumo de (poli)fenoles dietéticos y el deterioro cognitivo también concluyó que, entre los (poli)fenoles, la inclusión habitual de flavonoides en la dieta puede desempeñar un papel preventivo contra los trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad. En cuanto a las clases de compuestos no flavonoides, también se observó que los ácidos fenólicos podrían

I. INTRODUCCIÓN

tener efectos protectores sobre el estado cognitivo en adultos mayores, aunque los datos sobre ácidos fenólicos eran aún preliminares y escasos para extraer conclusiones consistentes (Godos et al., 2024). Los resultados de esa revisión deben interpretarse teniendo en cuenta las limitaciones de los estudios revisados, ya que, en la mayoría de los casos, la estimación de la ingesta dietética estaba basada en autoinformes y, de este modo, influida por fallos de memoria del participante o la tendencia a reportar respuestas socialmente aceptables. Además, el uso de diferentes bases de datos de referencia podía afectar la estimación del contenido de (poli)fenoles en los alimentos. Por tanto, dada la diversidad metodológica, el análisis de los resultados no hacía posible llegar a una conclusión científicamente sólida (Godos et al., 2024). No obstante, los resultados de los estudios presentados en esta revisión sistemática son los más completos y robustos que sugieren que los (poli)fenoles ingeridos a través de una dieta alta en vegetales pueden ser, al menos en parte, los responsables de los efectos beneficiosos sobre la salud cognitiva. De acuerdo con los autores de la revisión, para mejorar la comprensión del papel directo e indirecto de los (poli)fenoles en el funcionamiento cerebral, los futuros ensayos deberían integrar y explorar las variables que influyen en la biodisponibilidad, así como en la investigación de los metabolitos de fase II y colónicos.

Las fuentes dietéticas comunes de (poli)fenoles incluyen hortalizas, frutas, y derivados o cereales integrales. Algunos ejemplos, entre otros, son: manzanas, fresas, arándanos, cacao, café, uvas, legumbres, aceite de oliva, naranjas o té (Román et al., 2019). Promover cambios hacia una alimentación más rica en compuestos fenólicos es fundamental para mejorar la salud pública, especialmente entre la población de mayor riesgo. Por ejemplo, un estudio en adultos mayores de 60 años, residentes en el condado de Marion (Indiana, EEUU), con bajo nivel educativo mostró una mejora en la puntuación de pruebas cognitivas validadas tras una intervención nutricional centrada en el cambio de sus meriendas habituales por una rica en (poli)fenoles compuesta por higos, arándanos, frutos secos, pasas, manzanas, bananas, pudín de cacao o avena (Clark et al., 2025). Aunque el ensayo presentaba ciertas limitaciones, como un tamaño de muestra relativamente pequeño y un periodo de intervención y seguimiento breve (3-6 meses), permitió establecer la viabilidad de lograr, entre la población con formación académica limitada, una mayor adherencia a estos alimentos confirmada por el análisis de los compuestos fenólicos urinarios, así como la mejora en el rendimiento cognitivo, posiblemente asociada al aumento en el consumo de polifenoles (Clark et al., 2025). En la misma línea, un ensayo en el que se evaluó a mujeres de mediana edad (entre 45 y 59 años) con signos de deterioro cognitivo, la intervención durante 10 semanas con un zumo elaborado con frutas tropicales ricas en antocianos mostró una mejora significativa en la memoria mediante la Prueba de Aprendizaje Verbal Auditivo de Rey (RAVLT) en comparación con el grupo placebo (Rosli et al., 2022). El estudio incluía un análisis metabolómico que reveló la presencia de metabolitos relacionados con la ingesta de polifenoles. Sin embargo, una de sus limitaciones es que solo se reclutaron mujeres como participantes para la intervención y el tamaño de la muestra era reducido, lo que puede limitar el alcance de las conclusiones.

En otro estudio, diez sujetos de edad media 72.2 ± 4.7 años con deterioro cognitivo leve recibieron una formulación de uva liofilizada que contenía 495 mg/100 g de polifenoles totales durante seis meses. Entre ellos, catequinas (catequina y epicatequina), antocianos (peonidina, cianidina y malvidina), flavonoles (quercetina, kaempferol e isorhamnetina) y estilbenos (resveratrol). El rendimiento cognitivo se midió mediante evaluaciones neuropsicológicas realizadas al inicio del estudio y seis meses después del comienzo del tratamiento y también se

evaluaron los cambios en el metabolismo cerebral mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET) (Lee et al., 2017). En este estudio, no se observaron diferencias significativas en las puntuaciones de las pruebas neuropsicológicas entre los grupos intervenidos y placebo. Sin embargo, el grupo placebo presentaba un deterioro en regiones cerebrales que se ven afectadas significativamente en las primeras etapas de la enfermedad de Alzheimer que no era detectado en el grupo que había recibido la formulación. Estas observaciones sugieren un efecto protector de la uva contra el deterioro metabólico patológico temprano, aunque los hallazgos deben interpretarse considerando el tamaño reducido de la muestra. Un ensayo posterior evaluó el consumo de uvas pasas sobre el rendimiento cognitivo, la calidad de vida y las actividades funcionales en 80 sujetos mayores de 70 años sanos durante seis meses. El grupo de intervención (n = 40) consumía 50 g de pasas al día, añadidas a su dieta habitual, mientras que el grupo control (n = 40) no recibía ningún suplemento. La composición de polifenoles de las pasas incluía como polifenoles destacados, glucósidos de quercetina y de kaempferol, epicatequina, ácido cumárico y ácido cafeico. El rendimiento cognitivo, valorado mediante diferentes pruebas de evaluación cognitiva, mostró una mejoría en el grupo de intervención en la orientación, la capacidad visioespacial y el lenguaje, así como una mayor autonomía en las actividades de la vida diaria después de 6 meses (Rodrigo-Gonzalo et al., 2023). Aunque los resultados obtenidos fueron positivos, el estudio también presentaba ciertas limitaciones, siendo necesaria más investigación para establecer el papel y mecanismo de acción de los polifenoles en los efectos beneficiosos observados.

Brickman et al. (2023) realizaron un estudio de intervención con incorporación diaria a la dieta a lo largo de 3 años de un extracto de cacao que contenía 500 mg de flavan-3-oles (entre los que se incluían 80 mg de epicatequina) o placebos asignados aleatoriamente a más de 3500 adultos mayores generalmente sanos. Se observó una mejora de la memoria dependiente del hipocampo en los sujetos que, al inicio de la intervención, presentaban un bajo consumo habitual de alimentos ricos en flavan-3-oles. Estos resultados sugieren que una ingesta adecuada de estos compuestos podría considerarse en el diseño de estrategias dietéticas orientadas a preservar la función cognitiva durante el envejecimiento.

Los trastornos metabólicos, como la resistencia a la insulina y la obesidad, también constituyen un factor de riesgo importante para la demencia. Algunos estudios sugieren que el consumo de alimentos ricos en polifenoles, como los frutos rojos, puede mejorar el rendimiento cognitivo e influir en el metabolismo y la función cerebral, por lo que podría tener un papel en la intervención temprana para prevenir la neurodegeneración (Kalt et al., 2020). El efecto de la suplementación diaria con polvo de arándano (equivalente a media taza de arándanos) o con polvo placebo, en una muestra de participantes de mediana edad (entre 50 y 65 años), con sobrepeso y deterioro cognitivo subjetivo fue investigado por Krikorian et al. (2022). Se realizaron evaluaciones antes y después de una intervención de 12 semanas, incluyendo valoraciones neuropsicológicas, análisis de sangre para determinar marcadores metabólicos y lipídicos, e índices antropométricos. Se encontró que el grupo de intervención experimentaba una mejoría en el rendimiento cognitivo y una corrección de la hiperinsulinemia periférica, es decir, redujeron sus niveles elevados de insulina en sangre. Estas observaciones apuntan al potencial de los arándanos para proteger contra el deterioro cognitivo en individuos de alto riesgo.

I. INTRODUCCIÓN

En general, los hallazgos derivados de estudios observacionales y de intervención sobre el consumo de compuestos fenólicos son relevantes y aportan evidencias interesantes sobre los posibles beneficios de estas sustancias en la mitigación de las demencias. Sin embargo, deben interpretarse con cautela debido a las limitaciones de diseño. En este contexto, es fundamental analizar compuestos fenólicos concretos, profundizar en sus vías de actuación y recurrir a estudios *in vitro* y en modelos animales para obtener una comprensión más precisa sobre su potencial y mecanismos de acción como moléculas neuroprotectoras.

Las enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluye la EA, son multifactoriales y entre los procesos implicados se encuentran el estrés oxidativo y la generación de ROS que, como se ha señalado, conducen a disfunción mitocondrial, respuesta inflamatoria y apoptosis celular, así como a la acumulación de proteínas defectuosas (agregados A β y p-Tau). La muerte neuronal y la progresión de las enfermedades neurológicas son el resultado colectivo de estos daños (Dash et al., 2024).

En estudios *in vitro* y en modelos animales se ha observado que los (poli)fenoles podrían atenuar el desarrollo de la EA a través de mecanismos diversos. Entre ellos, se incluyen efectos antioxidantes y antiinflamatorios, la modulación de la actividad de diferentes enzimas e influencia sobre expresión génica y vías de señalización intracelular que pueden estimular o inhibir procesos relacionados con los procesos neurodegenerativos (Román et al., 2019).

Los compuestos fenólicos podrían reducir el **estrés oxidativo**, uno de los factores que influye notablemente en la patogénesis de los trastornos cognitivos (Uddin et al., 2020). Se ha indicado, por ejemplo, que los flavonoides del té verde, entre los que se incluyen principalmente flavan-3-oles como epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina (EC) y epigallocatequina (EGC), podrían inducir la expresión de diferentes enzimas antioxidantes y prevenir el daño oxidativo (Prasanth et al., 2019). Estudios realizados tanto en células como ratones o ratas tratados con EGCG, identificaron este compuesto como una molécula inductora del factor de transcripción Nrf2, cuya activación desencadena la transcripción de enzimas antioxidantes que neutralizan las ROS (Datta et al., 2022). Asimismo, en ratones afectados por una lesión cerebral traumática en la que se producen ROS y se genera estrés oxidativo, el tratamiento con EC protegió el cerebro de los animales mediante la activación de la vía Nrf2 (Cheng et al., 2015). También se observó que el té verde era capaz de reducir el deterioro de la memoria y prevenir el estrés oxidativo y el daño en el hipocampo en un modelo con enfermedad de Alzheimer en rata (Schmidt et al., 2017). Por otra parte, otros compuestos fenólicos no flavonoides, como resveratrol y curcumina, también han demostrado capacidad para mitigar el estrés oxidativo en roedores a través de la activación de Nrf2 (Brandes & Gray, 2020). Estas evidencias sugieren que distintos compuestos fenólicos podrían atenuar el daño cerebral producido por el estrés oxidativo. Sin embargo, también se ha descrito que estos compuestos pueden producir un efecto hormético, es decir, ejercer efectos tóxicos a concentraciones altas, e inducir la apoptosis y muerte celular, por lo que se deben consumir en dosis óptimas para proporcionar sus efectos beneficios en la salud (Datta et al., 2022; Prasanth et al., 2019).

En ensayos realizados en *Drosophila melanogaster*, el tratamiento con un extracto de cáscara de rambután, una fruta tropical originaria del sudeste asiático, condujo a un aumento de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa, así como a un aumento de la vida media de *Drosophila*, que se asociaron a la presencia en el extracto de flavonoles, como quercetina y rutina, y ácido gálico (J.C. Huang et al., 2025). De la misma manera, un extracto de hojas de *Camellia longii* Orel & Luu, planta nativa de Vietnam, demostró actividad antioxidante

in vitro y una prolongación significativa de la esperanza de vida de *D. melanogaster* expuesta a cloruro de aluminio como inductor de la neurodegeneración. Entre los 23 compuestos identificados en el extracto destacaron galato de epicatequina, isovitexina, quercetina y ácido gálico como posibles moléculas con actividad antioxidante y anti-neurodegenerativa (Anh Phan et al., 2024).

En experimentos *in vitro* realizados con células PC12 como modelo de neurodegeneración, el tratamiento con cianidina, una de las antocianidinas más extendidas en el reino vegetal, consiguió reducir el estrés oxidativo inducido por exposición a bisfenol A, mediante la eliminación de ROS (Suresh & Vellapandian, 2024). También se han explorado las propiedades anti-neurodegenerativas de ácidos fenólicos en células de neuroblastoma SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂. El pretratamiento con 5 µM de PCA, VA y ácido ferúlico logró atenuar la muerte celular causada por la toxicidad inducida por H₂O₂, así como disminuir el nivel de ROS y el número de células apoptóticas, lo que sugiere que estos ácidos fenólicos tienen potencial como moléculas protectoras contra la neurodegeneración (Gay et al., 2018).

En lo que respecta a la **respuesta inflamatoria**, diversos estudios han identificado a los (poli)fenoles como compuestos bioactivos antiinflamatorios capaces de inhibir o reducir la producción excesiva de citoquinas proinflamatorias que se observa en enfermedades neurodegenerativas como la EA (Joseph et al., 2016). Una reciente revisión destaca los efectos antiinflamatorios de extractos de *Moringa oleífera*, cuyas hojas son ricas en ácidos fenólicos y flavonoles, como kaempferol y quercetina, al ejercer efectos inmunomoduladores mediante reducción de los niveles de expresión de ARNm del factor nuclear kappa B (NF-κB), TNF-α, IL-1 e IL-6, suprimiendo así la respuesta inflamatoria tanto de células de microglía activadas como de ratones con neuroinflamación inducida (Azlan et al., 2023). En ensayos con la línea celular de microglia N9, un extracto rico en antocianos obtenido de arándanos mostró potencial para combatir la neuroinflamación, así como para suprimir la activación de NF-κB (Serra et al., 2020). El factor NF-κB, expresado ampliamente en células cerebrales, entre las que se incluyen las células de la microglia, funciona en condiciones basales para mantener la salud neuronal, sin embargo, la activación crónica o excesiva provoca la sobreproducción de marcadores inflamatorios, como TNF-α, y oxidativos (Dresselhaus & Meffert, 2019). Estos resultados sugieren que los flavonoides podrían desempeñar un papel en la prevención de trastornos neurológicos relacionados con la neuroinflamación vía supresión de la ruta NF-κB.

En ensayos realizados sobre ratones sometidos a una dieta deficiente en nutrientes, que da lugar a una inflamación crónica desregulada que favorece el desarrollo de trastornos metabólicos, incluyendo enfermedades neurodegenerativas como la EA, la suplementación con un extracto de cacao rico en flavan-3-oles condujo a una reducción de la expresión del marcador CD11b, sobreexpresado en células de microglía cuando se induce inflamación (Carrera et al., 2025). Una revisión centrada en las propiedades antiinflamatorias de los (poli)fenoles dietéticos analizó estudios en los que ratas y ratones con patologías neurodegenerativas eran tratados con diversos compuestos fenólicos, como los ácidos cafeico y vanílico, la flavona luteolina o la isoflavona genisteína, concluyendo que se reducían la neuroinflamación y la apoptosis inhibiendo la liberación de factores inflamatorios (R. Li et al., 2022). Es decir, las propiedades bioactivas de los compuestos fenólicos de los alimentos parecen influir, directa o indirectamente, en las vías de transducción de señales relacionadas con marcadores de inflamación, lo que podría proteger frente a la neurodegeneración.

I. INTRODUCCIÓN

Los procesos autofágicos son cruciales para el mantenimiento de la salud cerebral, especialmente en los trastornos degenerativos, ya que la autofagia alterada puede provocar la acumulación de A β y p-Tau. En este sentido, la **activación de la autofagia**, proceso que facilita eliminación de componentes celulares dañados o defectuosos, podría representar una diana interesante para proporcionar efectos neuroprotectores (Aman et al., 2021). Varios (poli)fenoles han mostrado capacidad para actuar como inductores de los procesos de autofagia. Un estudio *in vitro* demostró que la EGCG podía proteger contra el daño neuronal inducido en células neuronales SH-SY5Y mediante la activación de vías autofágicas, como el aumento de los niveles de expresión de Sirt1 y LC3-II, proteínas implicadas en la formación de los autofagosomas, así como de prevenir la muerte neuronal, ejerciendo de este modo neuroprotección contra la vía apoptótica (Lee et al., 2015). De manera similar, en células SH-SY5Y cultivadas con atrazina, un herbicida neurotóxico, el tratamiento con isoflavonas mostró actividad contra la apoptosis neuronal y un incremento de las proteínas LC3-II, sugiriendo que este tipo de sustancias fenólicas tenían potencial como inductoras de la autofagia, protegiendo contra la apoptosis neuronal (Li et al., 2018). Una reciente revisión analizó diferentes estudios poniendo de manifiesto que flavonoles, como quercetina y kaempferol, y el estilbeno resveratrol eran capaces de promover la autofagia, facilitando la eliminación de los agregados A β y p-Tau y suprimiendo la apoptosis neuronal inducida por estrés oxidativo en modelos celulares y animales (Chen et al., 2025).

De manera específica, la mitofagia, tipo de autofagia especializada en eliminar mitocondrias defectuosas, destaca por cumplir un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Por ello, reducir la disfunción mitocondrial, altamente relacionada con la patogénesis de la EA, a través de la estimulación de la mitofagia, podría ser una estrategia prometedora para frenar los procesos neurodegenerativos (E.H. Choi et al., 2024). De nuevo, varios compuestos fenólicos parecen tener la capacidad de estimular la mitofagia y mantener la función mitocondrial. En ensayos con moscas modelo de la enfermedad de Parkinson suplementadas con un extracto de hollejo de uva se encontró una prolongación de la vida media que se relacionó con la activación de la mitofagia y la eliminación de las mitocondrias disfuncionales o dañadas. Estos efectos se asociaron a los polifenoles presentes en el extracto, entre los que se incluían quercetina, miricetina, catequinas, taninos, antocianos, resveratrol y ácido ferúlico, que podrían actuar conjuntamente sobre diversos mecanismos patogénicos de la enfermedad de Parkinson, incluyendo la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo (Z. Wu et al., 2018). Se ha sugerido que PINK1 y PARKIN son proteínas clave en la vía de la mitofagia y desempeñan un papel fundamental en el control de la calidad mitocondrial. Se ha visto que (poli)fenoles como ácido vanílico, curcumina o resveratrol, eran capaces de mitigar el estrés oxidativo y la inflamación en estudios con líneas celulares y modelos animales, aumentando el flujo de la mitofagia y modulando al alza la expresión de PINK1 y PARKIN, reduciendo, además, la expresión de genes relacionados con la apoptosis (Mei et al., 2022; Wu et al., 2024; Zou et al., 2025). Por lo tanto, la activación y estimulación de la vía de la mitofagia por parte de los compuestos fenólicos podría constituir una vía para atenuar el daño neuronal en los trastornos cognitivos como la EA.

La modulación del **estrés del retículo endoplasmático (RE)**, orgánulo esencial en la síntesis y plegamiento de las proteínas y en la homeostasis del calcio, se ha considerado también una posible estrategia terapéutica en afecciones como los trastornos neurodegenerativos (Saleh et al., 2025). La agregación de A β y p-Tau en la EA se vincula con una respuesta a proteínas mal

plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR) prolongada, donde la generación ROS y la disfunción mitocondrial pueden ser tanto causa como resultado del estrés del RE, formándose un círculo vicioso que contribuye a la patogénesis de la EA (Kim et al., 2022). Además, la alteración de la homeostasis del calcio, proceso regulado por el RE y las mitocondrias, influye en la disfunción mitocondrial, así como en el aumento del estrés oxidativo y la acumulación de proteínas aberrantes (Callens et al., 2022). Diferentes estudios han sugerido que los (poli)fenoles podrían proteger frente a la neurodegeneración modulando las vías de señalización del calcio y reduciendo el estrés del RE (Amiri et al., 2024; Viskupicova & Rezbarikova, 2022). Como evidencia de ello, una investigación *in vivo* en la que se indujo neurotoxicidad en ratas con cloruro de cadmio (CdCl_2), mostró que los homogenizados cerebrales de las ratas expuestas a CdCl_2 presentaban una activación del estrés del RE, caracterizada por el aumento en la expresión de proteínas como XBP-1, factor de transcripción principal en la activación de la UPR, y caspasa-3, implicada en la finalización de la apoptosis (muerte celular). El tratamiento con rutina (quercetina-3-*O*-rutinosido), un flavonol presente en alimentos como cebolla, manzana o uva, atenuó eficazmente la UPR y redujo los marcadores asociados al estrés del RE y los niveles citosólicos de la caspasa-3 (Mostafa et al., 2019). De manera similar, en estudios *in vitro* en los que se inducía estrés del RE en células derivadas del neuroblastoma (SK-N-SH) y del epitelio pigmentario de la retina (ARPE-19), también se observó una reducción de XBP-1 y una atenuación de la apoptosis celular en las células tratadas con antocianos, en concreto, cianidina y malvidina (X. Liu et al., 2021; Thummayot et al., 2016). En otro ensayo con células murinas neuronales HT22 de hipocampo dañadas con metanfetamina, se observó que el pre-tratamiento con epicatequina reducía la expresión de CHOP y DR4, dos proteínas que promueven la apoptosis inducida por estrés del RE (Kang et al., 2019). En general, estos hallazgos respaldan la eficacia de los compuestos fenólicos para inhibir el estrés del RE, lo que se suma a otros posibles mecanismos neuroprotectores.

Como se mencionó en la sección 1.1, ruta de señalización por insulina, las **alteraciones del metabolismo de la glucosa** en el cerebro también están implicadas en la progresión de la EA. Tanto la insulina como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) influyen en la homeostasis energética cerebral y la supervivencia neuronal, ya que ambos interactúan en la captación de la glucosa cerebral. Por lo tanto, la señalización desregulada de insulina/IGF-1 puede tener un impacto crucial en las funciones cognitivas (De la Monte, 2017). Algunos compuestos fenólicos han mostrado capacidad para estimular la señalización cerebral de insulina/IGF-1, lo que constituye otro posible mecanismo de protección que podría contribuir a mitigar la patología de la EA (Piccialli et al., 2022). En un estudio realizado en ratas a las que se interrumpía la transducción de señales de insulina/IGF-1 con estreptozotocina (STZ) se redujo la expresión de los receptores de insulina e IGF-1 (IGF-1R), lo que se tradujo en daños en la estructura morfológica de las células neuronales del hipocampo. El tratamiento con silibinina, un flavonoide extraído de las semillas de *Silybum marianum* (cardo mariano), restauró significativamente los niveles de expresión de las proteínas IR e IGF-1R en el hipocampo, disminuyó la hiperfosforilación de Tau y suprimió la apoptosis neuronal, manteniendo la función de las vías de señalización de la insulina en el cerebro y ejerciendo un efecto neuroprotector en las ratas tratadas con STZ (P. Liu et al., 2020). Diferentes investigaciones resumidas en una reciente revisión apuntan a la luteolina, una flavona ampliamente distribuida en hierbas como el orégano, como un compuesto que puede promover, directa e indirectamente, la señalización de la insulina/IGF-1 en las células neuronales. IGF-1 bloquea la activación de GSK-3 β , una quinasa crucial involucrada en la fosforilación de Tau; de este modo, la estimulación de IGF-1

I. INTRODUCCIÓN

por parte de la luteolina reduciría la acumulación de los ovillos neurofibrilares y la deposición de A β promovida por p-Tau, aliviando los procesos neurodegenerativos. También se ha observado que la luteolina podría contribuir a modular la microbiota, favoreciendo el crecimiento de microorganismos que generan metabolitos neuroprotectores (Daily et al., 2021).

En estudios *in vivo* con cepas transgénicas del nematodo *Caenorhabditis elegans* que expresaban A β ₁₋₄₂ humano en células musculares, se observó un retraso en la aparición de la parálisis asociada a la toxicidad inducida por A β y un aumento de la longevidad en los grupos de nematodos tratados con cinarósido (luteolina-7-O-glucósido), una flavona presente en plantas medicinales (Xiao et al., 2024), y con un extracto de *Gastrodia elata* (orquídea medicinal) rico en flavonoides y otros compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Shi et al., 2023). Mediante ensayos de expresión génica ambos estudios concluyeron que los efectos neuroprotectores estaban relacionados con la modulación de la vía de señalización de insulina/IGF-1. En la siguiente sección se describen con más detalle las características de *C. elegans* como organismo modelo habitualmente utilizado en el estudio de procesos biológicos como el envejecimiento y la neurodegeneración, al tratarse del modelo utilizado para buena parte de los estudios desarrollados en esta tesis doctoral.

En definitiva, los compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoides por su abundancia en el reino vegetal, parecen ejercer efectos neuroprotectores al actuar sobre algunos de los principales mecanismos patológicos de la enfermedad de Alzheimer, como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial o la neuroinflamación. De esta manera, tanto los compuestos originales como sus metabolitos podrían contribuir a reducir la agregación del péptido β -amiloide y de la proteína Tau hiperfosforilada, además de favorecer la eliminación de estos agregados tóxicos. Aunque diferentes investigaciones refuerzan este potencial de los compuestos fenólicos como agentes preventivos frente a la EA, es necesario aún profundizar en el estudio de los mecanismos de acción específicos y los posibles enfoques terapéuticos (Zheng et al., 2019). En la Tabla 3 se resumen las propiedades bioactivas y los potenciales mecanismos de acción asociados a la neuroprotección de algunos de los (poli)fenoles más comunes en la dieta.

Tabla 3: Compuestos fenólicos y neuroprotección. Ensayos *in vitro* y en modelos animales.

No Flavonoides	Ácidos fenólicos	Protocatéquico 400 μ mol/L (H. Li et al., 2022)	Neuronas hipocampales primarias de ratas inducidas con A β ₂₅₋₃₅ 5 μ mol/L	-Reducción de los niveles de ROS intracelulares, regulación positiva de la vía lisosomal
		Vanílico 1 mM (Dai et al., 2024)	<i>Drosophila melanogaster</i> con estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂	-Aumento de la longevidad y de la expresión de ARNm de la catalasa y superóxido dismutasa
		Cafeico 300 μ M (Li et al., 2021)	<i>Caenorhabditis elegans</i> CL4176 con expresión de A β ₁₋₄₂ en células musculares	-Retraso de la parálisis inducida -Aumento de la expresión de ARNm de genes antioxidantes
	Estilbenos	Resveratrol 3 μ M (Y.L. Wu et al., 2018)	Células SK-N-SH-MJD78 como modelo de neurodegeneración	-Activación de Nrf2, aumento de la expresión de proteínas antioxidantes y autofágicas

Tabla 3: Compuestos fenólicos y neuroprotección. Ensayos *in vitro* y en modelos animales. (Continuación).

Tipo de compuesto fenólico y tratamiento			Modelo	Bioactividad
Extractos vegetales	Té verde 100 µg/mL (Lee et al., 2020)		Células endoteliales de cerebro humano (HBMEC) inducidas con Aβ ₁₋₄₂ 10 µM	-Disminución de ROS -Inhibición de la formación de fibrillas de Aβ ₁₋₄₂
	Semilla de uva 500 mg/kg en agua durante un mes (C. Chen et al., 2016)		Ratas con hipoperfusión cerebral crónica	-Reducción del estrés oxidativo -Aumento de la actividad de catalasa y superóxido dismutasa
	Granada 200 µg/mL (Alami et al., 2024)		Células microgliales humanas (HMC3) inducidas con Aβ ₁₋₄₂ 5 µg/mL o LPS 1 µg/mL	-Disminución de ROS -Cambio en el tipo de activación de la microglía (del M1 al M2)
	Frutos rojos (arándano y mora) 300 mg/kg·día durante 6 semanas (H. Li et al., 2023)		Ratones de 18 meses (envejecidos) con pérdida neuronal evidente	-Mejor rendimiento cognitivo -Reducción eficaz de los niveles de IL-6, IL-2 y TNF-α
Flavonoides	Flavan-3-oles	Epicatequina (oral) 18 mg/día, 21 días (Hole et al., 2021)	Ratones rTg4510, que expresan Tau mutante (P301L), de 6.5 meses de edad	-Inhibición de la fosforilación de Tau en la serina 262
		Epigallocatequina-3-galato 20 µM (Wei et al., 2016)	Células de microglía de ratón inducidas con Aβ ₁₋₄₂ 10 µM	-Reducción de la concentración de TNFα, IL-6 e IL-1β, inhibición de la producción de ROS
	Flavanonas	Naringenina 0.4 µM (Zhang et al., 2017)	Células PC12 de rata como modelo neuronal expuestas a Aβ ₂₅₋₃₅ 20 µM	-Reducción de la apoptosis, la muerte neuronal y los niveles de la proteína caspasa-3
		Hesperidina 150 µM (Kumar et al., 2023)	Caenorhabditis elegans CL4176 con expresión de Aβ ₁₋₄₂ en células musculares	-Retraso de la parálisis inducida por Aβ, sobreexpresión de genes autofágicos (lgg-1, bec-1)
	Flavonas	Apigenina 30 mg/kg intraperitoneal (Jamshidi et al., 2024)	Ratas estimuladas con LPS 30 µg/kg intraperitoneal	-Reducción de los niveles de TNFα, IL-6 e IL-1β a las 24 horas de la estimulación con LPS
		Luteolina 40 mg/kg·d 3 semanas, intraperi. (Kou et al., 2021)	Ratones 3×Tg-AD	-Reducción de la expresión de proteínas relacionadas con el estrés del RE (GRP78 e IRE1α)
	Isoflavonas	Genisteína 30 mg/kg·d, 49 días (Wang et al., 2016)	Ratas Sprague-Dawley de 10 meses de edad inducidas con 2 mg/mL de Aβ ₂₅₋₃₅	-Reducción de la expresión de la caspasa-3 y de la pérdida neuronal, mejora de la memoria
		Gliciteína 10 µM (J.Y.H. Liu et al., 2020)	Tejidos triturados de ratón inducidos con Aβ 2 µg/mL	-Reducción en la expresión de la β-secretasa en la corteza cerebral e hipocampo
	Flavonoles	Quercetina 10 µM (J. Chen et al., 2016)	Células SH-SY5Y expuestas a á. okadaico 50 nM para inducir la acumulación de p-Tau	-Alivio del estrés del RE -Inhibición de la fosforilación de Tau en la serina 396
		Kaempferol 0.2 mM (Xie et al., 2022)	Caenorhabditis elegans con expresión de la proteína Tau humana con la mutación P301L	-Aumento del nivel de ARNm de diferentes genes relacionados con la mitofagia/autofagia
	Antocianos	Cianidina 20 µM (Thummayot et al., 2016)	Células SK-N-SH inducidas con Aβ ₂₅₋₃₅ 10 µM	-Alivio del estrés del RE -Reducción de la expresión de la proteína XBP-1
		Pelargonidina 3 mg/kg intraperiton. (Asl et al., 2019)	Ratas inducidas con 5 µg de Aβ ₂₅₋₃₅ en el hipocampo	-Mejora del aprendizaje y memoria -Reducción del estrés oxidativo

I. INTRODUCCIÓN

1.3 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

El nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) es un organismo de vida libre que se introdujo como organismo modelo para investigación en Biología del desarrollo en la década de 1970 por Sydney Brenner (Brenner, 1974) y, desde entonces, se ha vuelto extremadamente útil para la investigación biomédica. La combinación de su simplicidad, fácil manipulación genética y procesos biológicos bien conservados con organismos superiores, lo convierte en un sistema ideal para una amplia gama de estudios, incluyendo aquellos centrados en la neurodegeneración (Torres et al., 2025).

1.3.1 Características generales

En estado silvestre, *C. elegans* vive principalmente en regiones templadas. Las larvas y adultos se han aislado con mayor facilidad de suelos ricos en materia vegetal en descomposición con alta abundancia de bacterias, que utiliza como fuente de alimento. Fuera de los frutos y tallos en descomposición, *C. elegans* se encuentra generalmente como larva *dauer*, la forma de resistencia y dispersión del animal (Barrière & Félix, 2014).

Para el mantenimiento y cultivo de estos nematodos en el laboratorio se utilizan placas de agar con medio de crecimiento de nematodos (NGM), aunque también pueden mantenerse en medio líquido. En ambos casos, se alimentan generalmente con cepas no patógenas de *Escherichia coli* (*E. coli*), siendo la cepa OP50 la más utilizada (Stiernagle, 2006). Ante la falta de alimento, las fases larvianas más jóvenes detienen su desarrollo y pueden entrar en la fase *dauer*, lo que permite su supervivencia durante varios meses en el laboratorio. Cuando se reintroduce el alimento, transfiriendo una porción de agar de la placa anterior a una nueva placa con *E. coli*, las larvas *dauer* reanudan su desarrollo sin efectos adversos (Corsi et al., 2015). *Caenorhabditis elegans* se cultiva generalmente a 20 °C, pero puede crecer entre 15 y 25 °C; su ritmo de desarrollo variará en función de la temperatura (Corsi et al., 2015; Stiernagle, 2006).

a) *Ciclo de vida*

El tamaño de *C. elegans* varía desde los 0.25 mm en las primeras fases larvianas, hasta aproximadamente 1 mm de longitud en los adultos. Los adultos son principalmente hermafroditas autofecundantes, aunque pueden aparecer machos con una frecuencia inferior al 0.2 % (Figura 15). Su ciclo de vida es corto, en condiciones estándar de laboratorio, a 20 °C, el desarrollo desde huevo hasta adulto fértil se completa en 3-4 días y la esperanza de vida media es de unos 20 días. El ciclo de vida consta de una etapa embrionaria que se inicia en el útero del animal, cuatro etapas larvianas (L1, L2, L3 y L4) y la edad adulta (Figuras 15 y 16) (Altun & Hall, 2009). La embriogénesis comienza dentro del adulto hermafrodita y se divide en dos etapas: proliferación y organogénesis. La proliferación abarca el tiempo entre la formación del cigoto y la gastrulación. Los primeros 150 minutos de proliferación tienen lugar dentro del útero y, posteriormente, los embriones, envueltos por una cáscara de huevo impermeable, se depositan en el medio cuando han alcanzado la etapa de 24-30 células, donde la proliferación celular continúa hasta el comienzo de la organogénesis (150-350 minutos). Al final de la etapa de proliferación, el embrión es un esferoide de células organizadas en tres capas germinales: ectodermo, que da lugar a la hipodermis y las neuronas; mesodermo, que genera la faringe y el músculo; y endodermo, que da lugar a la línea germinal y el intestino. Durante la organogénesis, el embrión se elonga tres veces y se diferencian completamente los tejidos y órganos del animal (Altun & Hall, 2009).

I. INTRODUCCIÓN

El embrión eclosiona con 558 núcleos y se convierte en una larva de primer estadio (L1). Posteriormente, las larvas L1 van pasando por los diferentes estadios larvarios (L1-L4). Cada estadio termina con un período de inactividad o letargo en el que se forma una nueva cutícula y se muda la anterior (Figura 16) (Corsi et al., 2015). El sistema reproductor de los nematodos hermafroditas se desarrolla durante los estadios L3 y L4. En la gónada, con forma de U, las células germinales se diferencian primero en espermatozoides que se almacenan en la espermateca (en la muda L3/L4) y, después, en ovocitos que serán fecundados por los espermatozoides almacenados (en la muda L4/adulta) (L'Hernault, 2006). En el estadio L4, los hermafroditas tienen la vulva en desarrollo y se puede observar un semicírculo en el centro del lado ventral (Figura 15). Cada hermafrodita autofecundado puede producir unos 300 embriones a lo largo de su etapa fértil (3-4 días) debido al número limitado de espermatozoides. Cuando los hermafroditas son fecundados por nematodos macho, el número de descendientes puede aumentar a 1200-1400 (Altun & Hall, 2009; Corsi et al., 2015). Los sexos individuales no se distinguen fácilmente hasta el estadio L4. Los machos se diferencian por un perímetro del cuerpo más delgado y una cola más ancha en forma de abanico, mientras que los hermafroditas presentan una cola afinada (Figura 15) (Corsi et al., 2015).

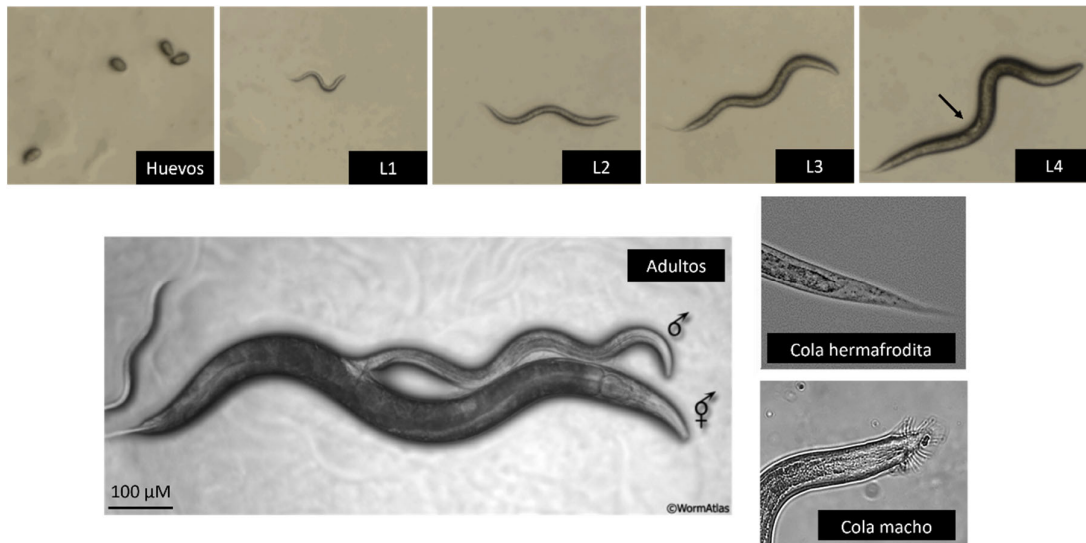


Figura 15: Imágenes bajo microscopio de *Caenorhabditis elegans*: huevos, estadios larvarios (L1-L4) y adultos (hermafrodita y macho). La flecha en L4 señala la vulva en desarrollo del hermafrodita. Adaptado de Shen et al. (2018) y <http://www.wormatlas.org>

Si las condiciones en el mantenimiento son desfavorables, por ejemplo, falta de alimento o alta densidad de población, las larvas L2 activan un ciclo de vida alternativo en el que mudan a la denominada larva *dauer* (Figura 16). En este caso, la cutícula rodea completamente al animal y obstruye la boca, impidiéndole comer y, por tanto, deteniendo su desarrollo. Además, la cutícula *dauer* proporciona una mayor protección contra el estrés ambiental. Las adaptaciones morfológicas, conductuales y metabólicas que ocurren durante la etapa de *dauer* permiten a *C. elegans* sobrevivir en ambientes hostiles durante meses y son la forma de dispersión más común en la naturaleza. Cuando las condiciones ambientales mejoran y el alimento vuelve a estar disponible, el tapón bucal se deshace, mudan a la etapa larvaria L4 y continúan su desarrollo (Corsi et al., 2015).

I. INTRODUCCIÓN

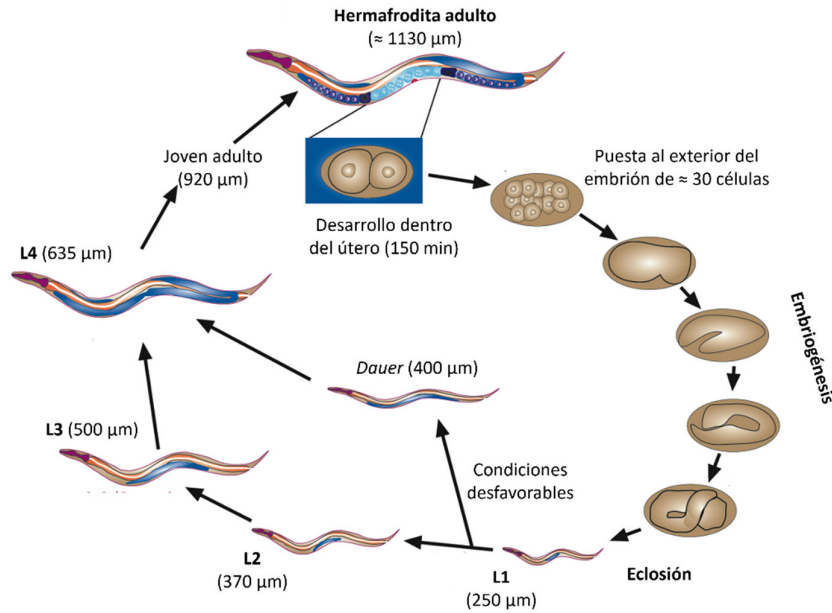


Figura 16: Ciclo de vida de *C. elegans*. Adaptado de <http://www.wormatlas.org> y Cummings & Esko (2009).

b) Anatomía y organización tisular

Caenorhabditis elegans presenta tejidos definidos a pesar de su simplicidad. Su cuerpo, al igual que el de otros nematodos, es cilíndrico, no segmentado, con un tubo externo y un tubo interno separados por la cavidad pseudocelómica que alberga los principales sistemas orgánicos. El tubo externo está compuesto por la cutícula, la epidermis (hipodermis), los músculos y los cordones nerviosos ventrales y dorsales que inervan los músculos. El tubo interno comprende la faringe, el intestino y la gónada en los adultos (Figura 17A) (Altun & Hall, 2009; Corsi et al., 2015).

La epidermis o **hipodermis** es la capa externa de células que secretan la **cutícula**, una capa protectora compuesta principalmente por colágeno, lípidos y glucoproteínas que determina la forma del cuerpo. Al final de cada etapa larvaria, *C. elegans* muda su cutícula y secreta una nueva para acomodarse al crecimiento corporal. Algunas células epiteliales especializadas en secretar la cutícula forman estructuras que actúan como células de soporte para los receptores sensoriales neuronales y como células de enlace que unen la hipodermis a los tejidos internos conectados con el exterior. Los tejidos que se abren al exterior a través de esta cutícula son el poro excretor, la vulva y el ano (Figura 17B) (Chisholm & Hardin, 2005; Page & Johnstone, 2007).

Los **músculos** se encuentran en el interior de la hipodermis y conectados a ella. La pared corporal está compuesta por 95 células musculares con estriaciones oblicuas que recorren todo el cuerpo. Las células musculares se conectan con las neuronas motoras a través de extensiones o "brazos musculares", que reciben las sinapsis de los cordones nerviosos. Además, *C. elegans* también tiene músculos no estriados, como los faríngeos, que controlan la alimentación, los vulvares y uterinos, implicados en la puesta de huevos, y los entéricos, encargados de la defecación al presurizar el contenido intestinal al extremo posterior del intestino y permitir la expulsión de los desechos (Moerman & Fire, 1997).

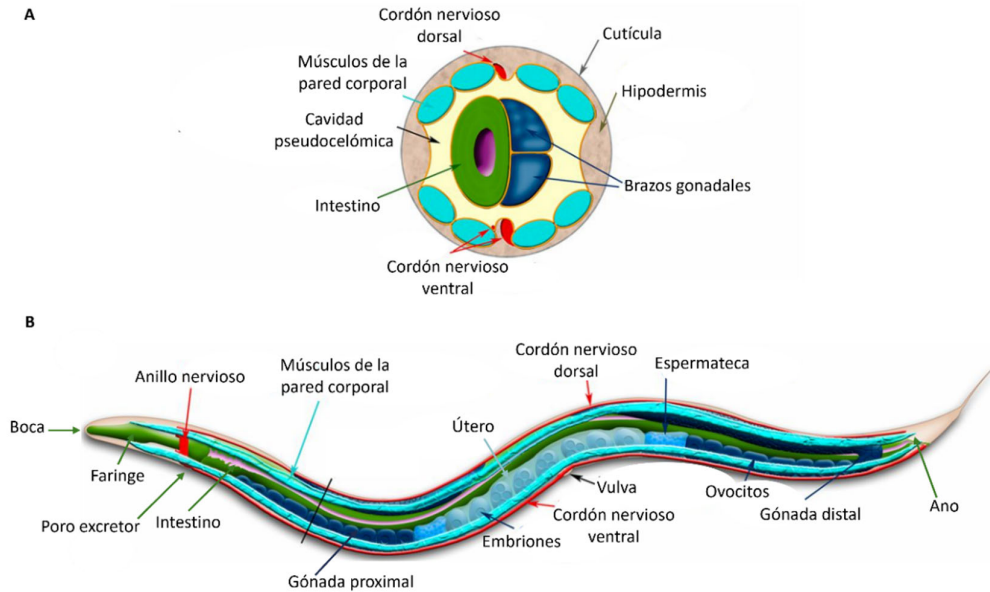


Figura 17: Organización tisular de *C. elegans*. Las flechas apuntan a las principales características anatómicas de un hermafrodita. **(A)** Sección transversal de la región anterior. **(B)** Vista lateral del nematodo. Adaptado de Corsi et al. (2015).

El sistema digestivo de *C. elegans* se compone de la **boca**, en la parte anterior del animal, por donde ingresan las bacterias (fuente de alimento), que pasan a la **faringe**, donde son trituradas antes de llegar al **intestino** para su digestión. La faringe es una estructura bilobulada con su propio sistema neuronal, músculos y epitelio, que transfiere el alimento triturado al intestino a través de la válvula faríngea intestinal. El intestino, con forma de tubo con un lumen central, está formado por células que presentan numerosas microvellosidades en su superficie apical. Los desechos intestinales se excretan al exterior a través de una válvula rectal que conecta el intestino con el recto y el ano con la contribución de los músculos entéricos (Figura 17B) (Avery & Shtonda, 2003; McGhee, 2007).

Caenorhabditis elegans también tiene sistema excretor abierto al exterior a través del **poro excretor**. Su función es la osmorregulación y la eliminación de desechos, de forma análoga al sistema renal de los animales superiores. Las células que conforman el sistema excretor se localizan en la región cefálica, justo debajo del bulbo terminal de la faringe (Figura 17B). El poro excretor permanece abierto durante todas las etapas del desarrollo, incluida la larva *dauer*. Parece que el sistema excretor es fundamental para la supervivencia de los nematodos, ya que cuando está deteriorado los animales se inflaman por el exceso de líquido (Liégeois et al., 2007).

El sistema reproductor de los hermafroditas consta de la gónada somática, la línea germinal y el aparato de puesta de huevos (formado por el útero, la vulva y los músculos asociados regulados por neuronas motoras). La **gónada somática** se encuentra en el centro del cuerpo y se compone de dos brazos gonadales simétricos, en forma de U, que están conectados al útero a través de la espermateca (Figura 17B). La gónada somática alberga la **línea germinal**, células que pasan por fase de meiosis para diferenciarse en espermatozoides, durante el estadio L4, y ovocitos, a lo largo de la etapa fértil adulta. Tanto la gónada somática como la línea germinal se desarrollan conjuntamente durante las etapas larvarias L3/L4 hasta que los animales

I. INTRODUCCIÓN

alcanzan la madurez. Los ovocitos maduran a medida que avanzan por el oviducto (curva de los brazos gonadales) hasta la espemateca, donde son fertilizados por los espermatozoides que quedaron almacenados previamente. Los cigotos diploides resultantes acumulados en el **útero** durante las primeras fases de la embriogénesis, salen a través de la **vulva**, localizada en la línea media ventral (Figura 17B) (Hubbard & Greenstein, 2005; Sternberg, 2005). Los machos adultos son más delgados que los hermafroditas, presentan un solo brazo gonadal y no desarrollan embriones. La cola del macho es el órgano copulatorio, de la que derivan 18 proyecciones de neuronas y células de soporte asociadas, así como músculos diagonales que participan en el proceso de copulación (Emmons, 2005).

El sistema nervioso de *C. elegans* en la forma de hermafrodita adulto cuenta con 302 neuronas, mientras que el del macho tiene 383 neuronas. La mayoría de ellas se organizan en forma de ganglios en la zona de la cabeza, formando un **anillo nervioso** alrededor de la faringe. El anillo nervioso constituye el centro de integración principal del animal, capaz de procesar señales sensoriales y coordinar respuestas locomotoras y conductuales. De este anillo nervioso parten un **cordón nervioso ventral** y otro **dorsal** que recorren longitudinalmente el animal y cumplen la función de controlar el movimiento al estar inervados con la musculatura (Figura 18). Además, en la cola también se presentan ganglios formados por agrupaciones de cuerpos de células neuronales que participan en la locomoción, la defecación y la función reproductiva (Figura 18) (Hobert, 2010; White et al., 1986).

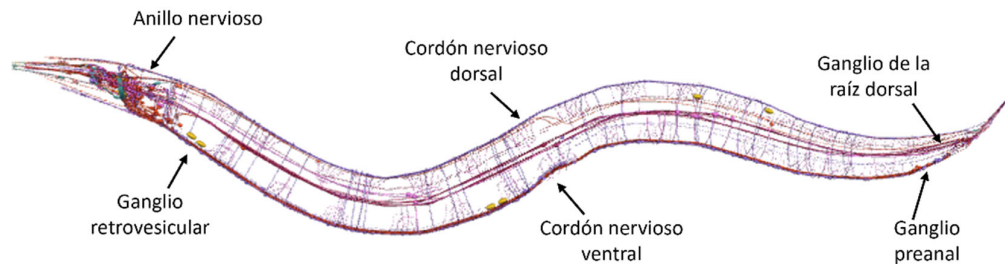


Figura 18: Anatomía del sistema nervioso de *C. elegans*. Las flechas indican los ganglios nerviosos principales y los cordones nerviosos. Adaptado de Corsi et al. (2015). Imagen generada con la herramienta de navegación OpenWorm (openworm.org).

La estructura de la mayoría de las neuronas es simple, con una o dos prolongaciones neuronales (neuritas) que pueden tener funciones sensoriales (dendrita), sinápticas (axón) o mixtas, con capacidad para recibir y enviar señales. Sin embargo, algunas neuronas motoras pueden llegar a tener varias ramificaciones para alcanzar sus dianas musculares. Las sinapsis se establecen en cuatro áreas principales: el anillo nervioso (que rodea la faringe), el cordón nervioso ventral, el cordón nervioso dorsal y la cola (Hobert, 2010; White et al., 1986).

Pese a tener un sistema nervioso sencillo y compacto, hay una gran variedad de tipos de neuronas (118 clases distintas en los hermafroditas según su topología y patrones de conexión sináptica). Esto permite a *C. elegans* llevar a cabo comportamientos que van desde los más básicos, como la locomoción o la motilidad de los sistemas digestivo y reproductivo, de las que se encargan las neuronas motoras, hasta los más complejos, relacionados principalmente con procesos sensoriales. La percepción de señales ambientales a través de neuronas

sensoriales incluye estímulos mecánicos, temperatura, numerosas sustancias químicas hidrosolubles y volátiles a las que se acercan o alejan (quimiotaxis), osmolaridad ambiental, fuentes de alimento, niveles de oxígeno, pH y luz, así como la presencia de nematodos cercanos o el sexo. Además, cada sexo muestra comportamientos específicos, como la puesta de huevos en los hermafroditas o el apareamiento en los machos (Bargmann, 2006; Oikonomou & Shaham, 2010). Algunas neuronas individuales son polimodales y pueden realizar más de un tipo de función; por ejemplo, las neuronas M3 de la faringe tienen funciones tanto motoras como sensoriales. Esta multifuncionalidad podría ser una consecuencia evolutiva del reducido número de neuronas en el sistema nervioso de *C. elegans* (Corsi et al., 2015). Por otro lado, los comportamientos son flexibles y pueden modificarse por medio del aprendizaje, la memoria o la disponibilidad de alimento, que es un modulador significativo del comportamiento, lo que demuestra la capacidad de este organismo para la plasticidad neuronal dependiente de la experiencia. *Caenorhabditis elegans* posee varios receptores para detectar y utilizar neurotransmisores comunes con los humanos, como la acetilcolina, el glutamato, el ácido γ -aminobutírico (GABA), la dopamina y la serotonina (Hobert, 2013). En general, *C. elegans*, primer organismo para el que se describió su conectoma completo (White et al., 1986), constituye un buen modelo para el estudio de mecanismos de gran relevancia para la investigación neurobiológica.

1.3.2 Contribuciones científicas relevantes

Caenorhabditis elegans fue el primer organismo eucariota multicelular cuyo genoma se secuenció totalmente, con una primera versión publicada en 1998 y completada en 2002. La secuencia total contiene alrededor de 100 Mb con un número estimado de 20470 genes codificantes (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Genéticamente, *C. elegans* presenta 5 pares de cromosomas autosómicos (I, II, III, IV y V) y un par de cromosomas sexuales (XX en hermafroditas y XO en machos) (Corsi et al., 2015). En comparación con los genes de vertebrados, los genes de *C. elegans* son relativamente pequeños, con un tamaño promedio de 3 Kb, debido principalmente a la presencia de intrones significativamente más cortos. Sin embargo, a pesar de las diferencias con los humanos, que poseen un cariotipo compuesto por 23 pares de cromosomas (22 autosómicos y un par sexual), muchos procesos celulares y moleculares se conservan entre *C. elegans* y los humanos. De hecho, se ha descrito que entre el 60 % y el 80 % de los genes humanos tienen ortólogos correspondientes en *C. elegans* (Lai et al., 2000; Shaye & Greenwald, 2011). Esto ha permitido que aspectos relacionados con la regulación génica como la transcripción, la traducción, la remodelación de la cromatina y las modificaciones postranscripcionales (ubiquitinación, fosforilación, metilación de histonas y glicosilación), se hayan estudiado utilizando herramientas genéticas en *C. elegans* (Ahringer & Gasser, 2018; Wenzel et al., 2011).

Una de las principales razones por las que Sydney Brenner decidió estudiar a estos nematodos fue la facilidad para manipularlos genéticamente mediante herramientas y tecnologías, que, en la actualidad, están bien descritas y protocolizadas (Katz, 2022; Sugi, 2017). La secuenciación del genoma completo facilitó la obtención de cepas mutantes de forma muy rápida, muchas de las cuales pueden obtenerse en el banco de cepas del *Caenorhabditis* Genetics Center de la Universidad de Minnesota (<https://cgc.umn.edu/>). Por otra parte, la autofecundación en los hermafroditas implica que, una mutación realizada mediante cualquier método de edición genética estará presente en las siguientes generaciones sin necesidad de apareamiento, lo que permite preservar cepas mutantes (Katz, 2022).

I. INTRODUCCIÓN

Desde que se inició el trabajo sobre la genética de *C. elegans* en la década de 1970 se han ido identificando genes y vías que desempeñan funciones importantes en animales superiores, incluidos los humanos. Estos descubrimientos incluyen genes clave que regulan la apoptosis (muerte celular programada), la función sináptica o la longevidad (Ellis & Horvitz, 1986; Gengyo-Ando et al., 1993; Kimura et al., 1997). También se produjeron importantes avances técnicos que posteriormente se adaptaron y aplicaron a otros sistemas biológicos. Un ejemplo de ello son las herramientas utilizadas para secuenciar el genoma de *C. elegans*, que facilitaron la secuenciación del genoma humano (Wilson, 1999).

Las aportaciones científicas derivadas de los estudios en *C. elegans* han sentado las bases de numerosos avances en las áreas de la biología y la biomedicina, lo que refleja su alto valor como organismo modelo. Particularmente, las investigaciones clave en biología molecular y celular realizadas por Sydney Brenner, Robert Horvitz y John Sulston fueron reconocidas con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2002 por la importancia del “proyecto linaje”, en el que se identificaron genes que regulan el destino celular y la apoptosis programada (Brenner, 1974; Ellis & Horvitz, 1986; Horvitz & Sulston, 1980). Asimismo, Andrew Fire y Craig Mello obtuvieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2006 por el desarrollo de la técnica del ARN de interferencia (RNAi), la cual permite el silenciamiento de la expresión de cualquier gen de interés (Fire et al., 1998). Por otro lado, el Premio Nobel de Química 2008 fue otorgado conjuntamente a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador biológico (Chalfie et al., 1994). Actualmente, la expresión de GFP y otras proteínas fluorescentes son herramientas ampliamente utilizadas para monitorizar la expresión génica y la localización de proteínas en organismos vivos, extensamente aplicadas en estudios en *C. elegans*. En la actualidad y de cara al futuro, *C. elegans* seguirá siendo una fuente importante de descubrimientos científicos que ayudarán a elucidar procesos celulares y enfermedades humanas.

1.3.3 Ventajas y limitaciones

Caenorhabditis elegans presenta numerosas ventajas como modelo de estudio en investigaciones biológicas. Entre sus características de interés se incluyen su pequeño tamaño y ciclo de vida corto, el alto número de progenie por autofecundación, la transparencia, el número invariable de células, la facilidad de cultivo, el bajo coste de mantenimiento, la criopreservación a largo plazo y la facilidad para su manipulación genética. Además, es inocuo para humanos y su desarrollo se produce entre los 15 y 25 °C, lo que imposibilita que crezca a temperatura corporal (37 °C) (Corsi et al., 2015).

El pequeño tamaño de *C. elegans* (aproximadamente 1 mm el adulto) permite que se pueda observar por completo con microscopios de disección, compuestos o confocales con aumentos de 2X a 1000X. Además, el tamaño milimétrico facilita el cultivo de miles de individuos en un espacio reducido, ya sea en placas de agar o en medio líquido. Esto, a su vez, reduce costes experimentales, ya que se requieren escasos recursos para el cultivo y almacenamiento.

El corto ciclo de vida proporciona ventajas en comparación con otros modelos animales como los roedores. Por ejemplo, en estudios de envejecimiento, los ratones silvestres deben alcanzar los 18 meses para considerarlos animales envejecidos, mientras que la vida media de los nematodos silvestres ronda los 21 días, siendo la vida máxima de aproximadamente 35 días (Torres et al., 2025). Por otro lado, la temperatura influye en el ciclo

de vida, pudiendo vivir sin problemas entre 15 °C, donde el crecimiento es más lento, y 25 °C, donde el crecimiento es más rápido. La variabilidad en el tiempo de desarrollo en función de la temperatura llevó al descubrimiento de genes y promotores sensibles a esta, lo que ha supuesto una herramienta destacada en el desarrollo de cepas de expresión génica inducible (Bacaj & Shaham, 2007; Link et al., 2003).

La autofecundación y el tamaño de la progenie (alrededor de 300 crías en la cepa silvestre hermafrodita) simplifica el mantenimiento de poblaciones, ya que un solo animal puede dar lugar a una población completa. En ese sentido, es viable mantener a las cepas mutantes generadas a través de las diferentes herramientas genéticas, puesto que la mutación estará presente en las siguientes generaciones debido a la autofecundación, sin necesidad de apareamiento.

La facilidad para manipular genéticamente a los nematodos y la secuenciación completa de su genoma, junto con los avances en métodos de edición genómica, como CRISPR/Cas9 (Katz, 2022), han dado lugar a una amplia biblioteca de cepas transgénicas disponibles comercialmente en el *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), entre las que se incluyen varias cepas modelo de enfermedades neurodegenerativas como la EA (Paul et al., 2020). Además, también se pueden obtener fenotipos similares a mutantes mediante la técnica del ARN de interferencia para reducir la expresión génica, lo que permite la búsqueda de genes necesarios para funciones específicas (Fire et al., 1998).

La transparencia del animal permite a los investigadores examinar el desarrollo a nivel de una sola célula particular dentro del organismo y, gracias al marcaje con proteínas fluorescentes como la GFP, la transparencia también hace posible la realización de análisis genéticos para identificar procesos celulares concretos (Corsi et al., 2015).

El mantenimiento y cultivo de *C. elegans* no necesita un equipo especialmente costoso y los animales se pueden cultivar en masa. Además, el detenimiento del desarrollo en el estadio larva *dauer*, facilita las condiciones de cultivo en el laboratorio durante varios meses bajo condiciones desfavorables. Asimismo, los nematodos pueden conservarse durante largos periodos mediante congelación a -80 °C, siendo el estadio L1 particularmente resistente a este proceso (Stiernagle, 2006). Por otro lado, es posible mantener las poblaciones limpias y libres de microorganismos tratando a los adultos grávidos con lejía y aislando los huevos resistentes al tratamiento. Al mismo tiempo, esta técnica consigue que la población esté sincronizada, lo que evita la mezcla de nematodos en diferentes fases del desarrollo al inicio de un experimento (Stiernagle, 2006).

Otra de las ventajas de este modelo es que todos los conocimientos generados a partir de las investigaciones en *C. elegans* están disponibles a través de recursos en línea. Entre estos, destacan WormBase (www.wormbase.org), que incluye información sobre la expresión y función génica, WormBook (www.wormbook.org), con información sobre la biología básica de *C. elegans*, incluyendo una colección de métodos (WormMethods), WormAtlas (<http://www.wormatlas.org>), que proporciona imágenes detalladas sobre la anatomía del animal, y el *Caenorhabditis* Genetics Center (<https://cgc.umn.edu/>), el banco de reserva de cepas de nematodos silvestres y mutantes.

I. INTRODUCCIÓN

En definitiva, *C. elegans* ofrece varias ventajas sobre otros modelos *in vitro* e *in vivo*. Su cultivo en el laboratorio es sencillo y rentable, no supone riesgo para la salud humana y su corta vida facilita la rápida finalización de los experimentos. Como organismo eucariota, constituye un excelente modelo para el estudio de mecanismos clave en varios campos científicos, incluyendo la neurobiología y neurodegeneración. Sus similitudes fisiológicas y genéticas con los eucariotas superiores, incluyendo a los humanos, han hecho que este modelo animal sea muy relevante para el estudio de la salud y las enfermedades humanas.

No obstante, *C. elegans* también presenta diversas limitaciones que deben considerarse al interpretar resultados. La ausencia de órganos complejos, como el sistema circulatorio o respiratorio, implica que la distribución de compuestos dependa de las propiedades de difusión de las moléculas. Además, la sencillez de su sistema excretor y la falta de un metabolismo hepático podría afectar a la cinética de la eliminación de desechos en estudios relacionados con la evaluación fármacos, compuestos tóxicos o sustancias bioactivas. Su naturaleza hermafrodita limita su utilidad en investigaciones donde las diferencias biológicas entre sexos condicionan una respuesta fisiológica específica. Por otro lado, *C. elegans* posee un sistema inmunitario innato funcional, pero carece de inmunidad adaptativa, por lo que no puede reproducir procesos mediados por linfocitos T y B. En lo que respecta al sistema nervioso, este nematodo presenta 302 neuronas, en comparación con las ~86 mil millones presentes en el humano, además, las neuronas no están mielinizadas. Esto limita el estudio de funciones cognitivas complejas o de velocidad de los impulsos eléctricos. Otra limitación es la ausencia de barrera hematoencefálica, por lo que está expuesto directamente a las sustancias del medio, lo que puede dificultar la predicción de la biodisponibilidad cerebral y sobreestimar el potencial tóxico o protector de diferentes compuestos testados debido a la falta de esta barrera protectora. Todo ello restringe su capacidad para modelar procesos presentes únicamente en mamíferos, sin embargo, esta simplicidad permite analizar de manera específica y directa mecanismos moleculares conservados evolutivamente (Kaletta & Hengartner, 2006).

1.3.4 *Caenorhabditis elegans* como modelo de neurodegeneración

Diversas investigaciones científicas han demostrado las posibilidades e implicaciones del uso de *C. elegans* como modelo *in vivo* alternativo a los modelos murinos en la exploración de mecanismos involucrados en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes relacionadas con el envejecimiento, así como para el cribado de fármacos y compuestos bioactivos contra esta enfermedad (Lin et al., 2023; Paul et al., 2020). Las manipulaciones genéticas en *C. elegans* han dado lugar a la generación de cepas transgénicas que expresan genes humanos en músculos y neuronas, cuya expresión puede ser inducible o constitutiva, para desencadenar la agregación de proteínas neurotóxicas relacionadas con la EA (Fatouros et al., 2012; Kraemer et al., 2003; Link, 2006), lo que hace que *C. elegans* sirva como modelo para estudiar este tipo de enfermedades neurodegenerativas (Torres et al., 2025).

Dos de las características principales de la EA son la presencia de placas amiloides, formadas por la acumulación del péptido A β , y de ovillos neurofibrilares, compuestos por la agregación de la proteína p-Tau, en las neuronas (Zhang, 2023). En *C. elegans*, los principales modelos de la EA se basan en la expresión de A β en células musculares o neuronales. Algunas de las cepas más utilizadas con este fin son CL2006, CL4176 y CL2355. En la cepa CL2006, el transgén que codifica el péptido A β , localizado en las células musculares, se expresa bajo el

control del promotor *unc-54*, promotor de la miosina en los músculos de la pared corporal; en esta cepa, la producción de A β es constitutiva y su acumulación induce una parálisis progresiva (Link, 1995). En la cepa CL4176, el transgén que codifica el péptido A β se expresa en células musculares bajo el control del promotor *myo-3*, el cual se induce por el aumento de temperatura de 16 °C a 23 °C, lo que conduce a una parálisis rápida de los animales que puede ser fácilmente identificada en todos los individuos. Este sistema inducible es útil para analizar diferentes estados antes y después de la expresión de A β (Link, 2006). Por su parte, CL2355 emplea el promotor inducible térmicamente (de 16 a 23 °C) de la sinaptobrevina (*snb-1*), regulador de la liberación de neurotransmisores en las sinapsis, para impulsar la expresión neuronal de A β ₁₋₄₂. Esta cepa se caracteriza por presentar un índice de quimiotaxis reducido, es decir, una alteración en la eficacia con la que el organismo responde a un estímulo (por ejemplo, un olor) (Link, 2006).

La proteína p-Tau es otro de los componentes clave en la EA. *Caenorhabditis elegans* presenta una proteína asociada a microtúbulos homóloga de la proteína Tau, llamada PTL-1 (Goedert et al., 1996). Sin embargo, su expresión no causa agregación ni neurodegeneración, por lo que se han generado cepas que expresan la hiperfosforilación de Tau en sus neuronas para el estudio dicha patología. Los nematodos con las mutaciones de Tau patogénica humana P301L y V337M (cepas KAE112, BR5486, entre otras) producen un aumento de la fosforilación en posiciones específicas como la serina 422, lo que precede a la agregación de Tau y a la aparición de signos de neurodegeneración en estos modelos transgénicos (Kraemer et al., 2003). También se encuentra disponible la cepa BR5270 con la delección de K280 en la proteína Tau humana, una mutación que induce la agregación de Tau que aparece comúnmente en pacientes con demencia. Este modelo de tauopatía manifiesta una motilidad deteriorada y una disfunción neuronal evidente (Fatouros et al., 2012).

La co-expresión de A β y p-Tau también es posible en *C. elegans*, lo que proporciona una estrategia refinada para el estudio de los procesos neurodegenerativos en la EA y una visión más completa de los mecanismos patológicos utilizando un solo modelo. CK1609 y UM0001 son cepas resultantes del cruzamiento entre cepas que expresan la Tau humana proagregante y A β de forma inducible por temperatura. Estos modelos muestran una locomoción reducida, disfunción neuronal grave (menor número de neuronas mecanosensoriales) y una menor esperanza de vida, además de una menor viabilidad de la progenie, lo que puede suponer una limitación para su uso (Sarparast et al., 2023; Wang et al., 2018). Sin embargo, estas cepas aún no se encuentran disponibles comercialmente en el CGC.

Gracias a la generación de las cepas transgénicas modelo de la EA y a la alta homología entre los genes de *C. elegans* y de mamíferos, se ha podido abordar el estudio de diferentes vías de señalización que impulsan la neurodegeneración (ver sección mecanismos implicados en la EA). Por ejemplo, los modelos de *C. elegans* han sido útiles para describir el papel de la mitofagia (Fang et al., 2019), del estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas (Joshi et al., 2021; Sorrentino et al., 2017), o el papel de la vía señalización de la insulina (Cohen et al., 2006), entre otras vías. Todo ello respalda la utilidad de *C. elegans* en el cribado de compuestos de diferente naturaleza química frente a la toxicidad inducida por A β , p-Tau y el resto de los procesos asociados a la EA, así como de sus posibles mecanismos de acción. Este nematodo constituye, además, una potente vía para probar nuevas hipótesis, mecanismos moleculares y el estudio de posibles nuevas estrategias terapéuticas en la investigación de las enfermedades neurodegenerativas.

I. INTRODUCCIÓN

1.3.5 Estudios de compuestos fenólicos en *Caenorhabditis elegans*

Diversas investigaciones han demostrado la relevancia e idoneidad de *C. elegans* y sus vías de señalización conservadas evolutivamente como herramienta para explorar las propiedades bioactivas de los compuestos fenólicos (Ayuda-Durán et al., 2020; Lin et al., 2023). Considerando la importancia del estrés oxidativo y la generación de ROS en la patogenicidad de la EA, es relevante detectar polifenoles con potencial antioxidante que puedan ser empleados como estrategia de prevención de la neurodegeneración mediante el consumo de alimentos ricos en estos compuestos o en forma de suplementos o productos terapéuticos.

La inducción del estrés oxidativo en *C. elegans* es posible a través de estresores químicos, como paraquat, juglona o peróxido de hidrógeno, o a través de estresores físicos, como el aumento de la temperatura. Este enfoque fue aplicado por el grupo de investigación para evaluar la eficacia antioxidante de los flavonoides epicatequina y quercetina (Figura 19). En estudios previos se observó que el pretratamiento con EC o Q (200 μ M en el medio de cultivo) aumentaba la resistencia al estrés oxidativo inducido por juglona en *C. elegans*, manifestado por un aumento de la supervivencia de los nematodos sometidos al inductor del estrés (Surco-Laos et al., 2011, 2012). De la misma manera, nematodos de la cepa silvestre cultivados en presencia de EC o Q a una concentración de 200 μ M en el medio NGM y sometidos a estrés térmico (8 h, 35 °C) mejoraban significativamente su supervivencia, lo que sugirió un efecto protector de ambos flavonoides contra el estrés oxidativo inducido térmicamente (Ayuda-Durán et al., 2019b, 2019c).

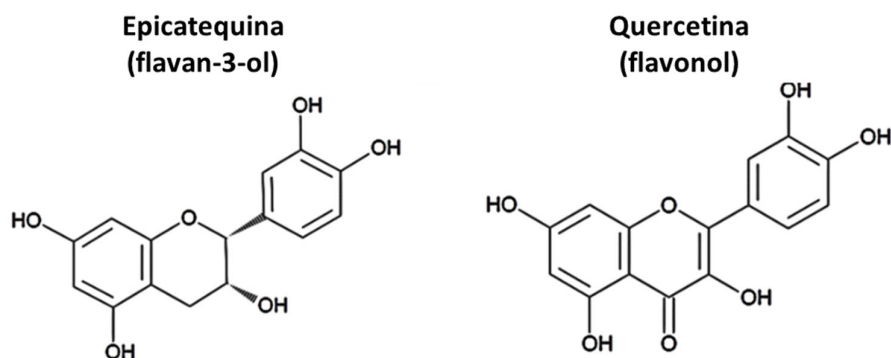


Figura 19: Estructura química de los flavonoides epicatequina (EC) y quercetina (Q).

Los procesos de resistencia al estrés en *C. elegans* están regulados por la vía de señalización de la insulina/IGF-I (IIS, *Insulin/IGF-1 Signaling*), la cual presenta numerosos componentes conservados evolutivamente que regulan el envejecimiento en diferentes especies, desde simples invertebrados hasta mamíferos, incluidos los humanos (Altintas et al., 2016). Los genes *daf-2* y *age-1* de *C. elegans* son ortólogos del receptor de insulina/IGF-1 (IGFR) y de la fosfatidilinositol-3-OH quinasa (PI3K, *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase*) (Kimura et al., 1997; Morris et al., 1996). En condiciones normales, péptidos similares a la insulina (ILPs, *Insulin-like peptides*) se unen al receptor DAF-2/IGFR, lo que conduce a la activación de AGE-1/PI3K y al aumento de los niveles de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3, *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). El aumento de PIP3 es equilibrado antagónicamente por DAF-18/PTEN, ortólogo de la fosfatasa y tensina humana (PTEN, *Phosphatase and tensin homolog*), que promueve la

conversión de PIP3 a fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PIP2, *Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate*). La generación de PIP3 también conlleva la activación de las quinasas PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), AKT-1/AKT-2 (*Protein kinase B*) y SGK-1 (*Serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1*), que fosforilan e inactivan a DAF-16/FoxO, el ortólogo del factor de transcripción *Forkhead box O*. Esta fosforilación impide la entrada de DAF-16/FoxO al núcleo y promueve su retención en el citoplasma, lo que favorece el desarrollo y un metabolismo activo (Murphy & Hu, 2013). Por el contrario, bajo condiciones adversas, producidas, por ejemplo, por estrés oxidativo, la señalización IIS se ve reducida, aumenta la actividad de DAF-16/FoxO y se potencia su translocación del citoplasma al núcleo junto con el factor de transcripción de choque térmico 1 (HSF-1, *Heat shock transcription factor 1*) y el factor de transcripción Nrf sensible al estrés oxidativo (SKN-1/Nrf2, *Oxidative stress-responsive Nrf transcription factor*). Una vez dentro del núcleo, DAF-16/FoxO, HSF-1 y SKN-1/Nrf2 regulan la expresión de genes relacionados con la resistencia al estrés que codifican enzimas antioxidantes como glutatión S-transferasa (*gst-4* y *gst-7*), catalasa (*ctl-1* y *ctl-2*) y superóxido dismutasa-3 (*sod-3*), además de chaperonas moleculares, como *hsp-70* y *hsp-16.2*, cuya sobreexpresión aumenta la longevidad (Figura 20) (Altintas et al., 2016; Murphy & Hu, 2013). Esta respuesta adaptativa en *C. elegans*, podría relacionarse con las evidencias que sugieren que el daño oxidativo y la producción de Aβ y p-Tau podrían reducirse por el aumento de la expresión de FoxO1 (Asadi et al., 2025). Es decir, la modulación de la vía de señalización de la insulina/IGF-1 podría influir en los procesos patológicos implicados en la EA (Maiese, 2021).

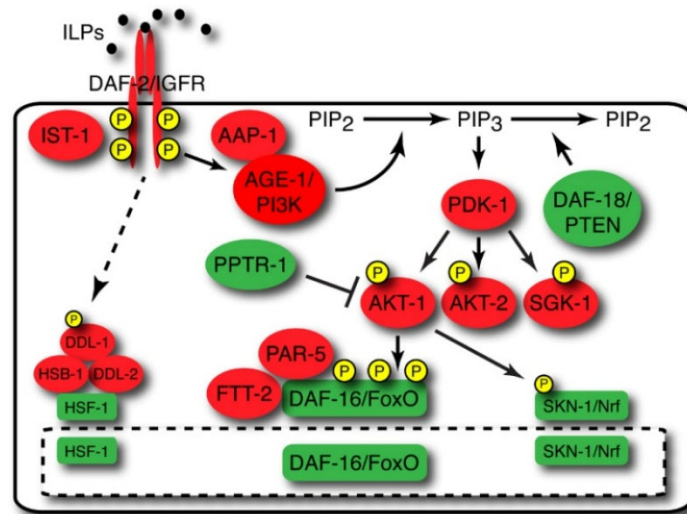


Figura 20: Ruta de señalización de la insulina (IIS) en *C. elegans*. La activación de la vía IIS, dependiente de una cascada de fosforilación, promueve el secuestro citoplasmático de los factores de transcripción DAF-16/FOXO, HSF-1 y SKN-1/Nrf. DAF-2, ortólogo del receptor insulina/IGF-1, y otros componentes de la ruta que promueven la señalización de IIS se muestran en rojo, mientras que las moléculas que antagonizan la vía o son antagonizadas por IIS se representan en verde. Los péptidos similares a la insulina (ILPs), capaces de modular la actividad de DAF-2, se indican como puntos negros. Adaptado de Murphy & Hu (2013) (www.wormbook.org).

Las capacidades de EC y Q como moléculas moduladoras de vías de señalización implicadas en la regulación del estrés oxidativo también se exploraron previamente en el grupo de investigación mediante diferentes estrategias, como el uso de nematodos con mutaciones de pérdida de función y cepas transgénicas que contienen genes fusionados a GFP, así como el análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (Ayuda-Durán et al., 2019b, 2019c). Las cepas

I. INTRODUCCIÓN

mutantes de *C. elegans* con pérdida de función de genes implicados en la IIS (*daf-2*, *age-1*, *akt-1*, *akt-2* y *sgk-1*) tratados con EC o Q (200 μ M) no mostraron ninguna mejora significativa en la supervivencia tras la inducción del estrés por choque térmico. Estos resultados sugieren que estos genes podrían ser necesarios para mediar la resistencia al estrés inducida en *C. elegans*. Por otro lado, el tratamiento con EC reguló al alza la expresión de enzimas antioxidantes como GST-4 y de proteínas de choque térmico como HSP-16.2 y HSP-70 en cepas transgénicas que expresan GFP bajo el control de los promotores *gst-4*, *hsp-16.2* y *hsp-70*, lo que podría indicar un impulso en la eliminación de ROS y de proteínas dañadas en los nematodos. Sin embargo, esto no ocurrió en las cepas transgénicas tratadas con Q (Ayuda-Durán et al., 2019b, 2019c), indicando que los mecanismos moleculares de acción pueden variar según el compuesto.

En un estudio en el que se evaluó el efecto antioxidante y neuroprotector frente a la toxicidad inducida por A β , se encontró que el tratamiento con un extracto de antocianos de arroz negro conseguía extender la esperanza de vida y proteger la cepa silvestre contra el daño oxidativo inducido por H₂O₂, paraquat, juglona, rayos UV y choque térmico. Asimismo, era capaz de retrasar la parálisis en la cepa CL4176 y mejorar el índice de quimiotaxis en la cepa CL2335. Los investigadores sugirieron que los efectos beneficiosos observados en las diferentes cepas utilizadas estaban relacionados con la IIS, ya que se observaba un aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes SOD-3, CTL-1 y GST-4, además de un incremento en la translocación de DAF-16 al núcleo (X. Li et al., 2023).

Otras investigaciones han explorado los beneficios de ácidos fenólicos comúnmente generados en el metabolismo microbiano de flavonoides, como los ácidos cafeico (CA) o vanílico. Estos estudios apuntaron a un efecto antioxidante y neuroprotector por parte del CA (300 μ M), el cual alivió significativamente la toxicidad inducida por A β en la cepa CL4176, que se manifestó por un aumento de la esperanza de vida y una disminución de la parálisis corporal en estos organismos. Además, la determinación de los niveles de ARNm por RT-qPCR revelaron un aumento de la expresión de *daf-16*, *hsf-1* y sus dianas posteriores *sod-3* y *gst-4* (Li et al., 2021). Asimismo, el tratamiento con VA (250 μ M) logró aumentar significativamente la longevidad, la resistencia al estrés térmico y el comportamiento quimiotáctico en la cepa PX627 de *C. elegans*, un modelo específico de envejecimiento, observando también un aumento en la expresión de *daf-16* y *skn-1* (Dilberger et al., 2021).

Todas estas evidencias apuntan a la influencia de la modulación, por parte de diferentes compuestos fenólicos, de la vía de señalización de la insulina/IGF-1 en el envejecimiento y en los procesos neurodegenerativos.

La disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y juega un papel crucial en la patogénesis de la EA (Swerdlow, 2018). El cribado y validación experimental en cepas transgénicas de *C. elegans* puede ayudar a descubrir moduladores de la mitofagia que estimulan la salud neuronal y la homeostasis cerebral. En este contexto, la relación entre la salud mitocondrial, los agregados A β y la patología de p-Tau ha sido investigada en *C. elegans*, revelando que la mitofagia es también imprescindible en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial en este organismo (Fang et al., 2019). Se han identificado compuestos fenólicos inductores de la mitofagia, como el flavonol kaempferol y el estilbeno rapontigenina, que conseguían aumentar la expresión relativa de ARNm de genes relacionados con dicho proceso en las cepas CL2355 y BR5270 como modelos de la EA. Además, el tratamiento con estos compuestos aumentaba la supervivencia y mejoraba la memoria de los animales (Xie et al., 2022).

En la misma línea, la activación de la autofagia y el alivio del estrés del retículo endoplasmático mediados por polifenoles también podrían desempeñar un papel en la prevención de la EA. Un estudio que evaluó los efectos de la quercetina en la cepa CL2006 de *C. elegans*, observó que este flavonol era capaz de reducir la acumulación de proteínas agregadas y la parálisis inducida por A β ₁₋₄₂. El uso de ARN de interferencia para disminuir la expresión de genes relacionados con la degradación proteasomal, la macroautofagia y la respuesta a proteínas mal plegadas, identificó que la Q actúa sobre proteínas clave implicadas en la reducción y degradación de A β en los nematodos CL2006 (Regitz et al., 2014).

Debido a su sistema nervioso conservado y a el grado de similitud genética con los humanos, *C. elegans* ha proporcionado información crucial sobre los mecanismos implicados en la neurodegeneración, como el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial o la muerte neuronal. Aunque este organismo modelo no puede replicar la complejidad estructural del sistema nervioso humano, permite elucidar mecanismos de gran relevancia para la investigación sobre la EA. Sin embargo, la extrapolación de la estimación de la concentración de los compuestos bioactivos de interés es una limitación, puesto que *C. elegans* incorpora los compuestos pasivamente a través de su cutícula o por ingestión y, además, carece de barrera hematoencefálica. Aunque no es un buen modelo para determinar dosis, *C. elegans* es una herramienta altamente valiosa que abre nuevas vías en el campo de la investigación de la EA, especialmente para cribados preliminares sobre la evaluación de los efectos biológicos de compuestos bioactivos (Ayuda-Durán et al., 2020; Lin et al., 2023).

En resumen, la evaluación de los potenciales beneficios para la salud de compuestos fenólicos se ha extendido en diferentes modelos de *C. elegans*. Sin embargo, se necesita una comprensión más profunda de las vías moleculares implicadas en el efecto de un determinado compuesto. Por ello, en la presente tesis doctoral, se explora el efecto y los mecanismos de acción de algunos compuestos fenólicos, en particular, epicatequina y quercetina, para retrasar la progresión de la EA en cepas transgénicas de *C. elegans*.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral es contribuir al conocimiento sobre la influencia que determinados componentes de la dieta, en particular los compuestos fenólicos, tienen para prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se propone el uso del organismo modelo *Caenorhabditis elegans* y líneas celulares de barrera hematoencefálica, con el fin de evaluar tanto la bioactividad como la biodisponibilidad de dichos compuestos y sus metabolitos. Además, se exploran los mecanismos moleculares implicados en su acción.

Para alcanzar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la contribución de epicatequina y quercetina, dos de los flavonoides mayoritarios en la dieta, para proteger o atenuar la progresión de la enfermedad de Alzheimer utilizando cepas transgénicas de *C. elegans* que expresan los marcadores principales de esta patología:
 - Cepas productoras de péptido beta-amiloide (A β).
 - Cepas productoras de proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau).
- Explorar los mecanismos moleculares implicados en el posible efecto protector de los compuestos fenólicos a nivel neurológico.
- Estudiar el transporte de flavonoides y sus principales metabolitos a través de la barrera hematoencefálica, utilizando la línea celular endotelial humana hCMEC/D3.
- Integrar los resultados obtenidos en los modelos *in vivo* e *in vitro*, con el fin de establecer el potencial neuroprotector de los flavonoides y contribuir a dilucidar los mecanismos moleculares asociados.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Materiales y equipos

- Agitador de placas (Labnet International)
- Agitador magnético con placa calefactora LSCI ACS-160 (SBS)
- Agitador Vortex Genius 3 (IKA)
- Asas de siembra en forma de L, estériles desechables (VWR)
- Autoclave vertical de esterilización Presoclave II (Selecta)
- Baño de agua Precistern (Selecta)
- Báscula de precisión AG245 (Mettler Toledo)
- Bolas de acero inoxidable de 1.6 mm (Celta Ingenieros S.L.)
- Bomba de vacío Vacusafe (Integra Biosciences)
- Cabina de Bioseguridad tipo II (BSC) (Haier Biomedical)
- Campana de flujo laminar AV-30/70 (Telstar)
- Cebadores específicos (Metabion)
- Circuito fluídico integrado (IFC) GE 96.96 Dynamic Array™ (Fluidigm)
- Columna apolar en fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (150 mm × 4.6 mm, 2.7 µm) (Agilent Technologies)
- Criotubos (Frilabo)
- Equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) serie 1200 Infinity con detector de diodos (DAD) (Agilent Technologies)
- Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher)
- Filtros 0.22 µm (Frilabo)
- Hemocitómetro o cámara de Neubauer (BRAND™)
- Incubadoras FTC 90I (VELP Scientifica) e IPP (Mettmert™)
- Jeringas 10 mL (Braun)
- Kit de aislamiento de ARN (NZYtech y Cytiva)
- Lector de placas Spectra Max i3x (Molecular Devices)
- Lupas M205 FA con cámara DFC7000 T y M205 C (Leica Microsystems)
- Materiales de vidrio: botellas 250 mL – 1 L, matraces aforados 10 mL – 1 L, matraces Erlenmeyer 100 mL, pipetas serológicas Pyrex 10 mL – 25 mL, probetas 25 mL – 1 L, vasos de precipitado 10 mL – 5 L.
- Microcentrífuga Heraeus Fresco™ 17 (Thermo Scientific)
- Microscopio óptico (ERMA OPTICAL WORKS)
- Multiplex PCR kit (QIAGEN®)
- pHmetro (Mettler Toledo)
- Pipeta automática (Nichiryo)
- Pipeta de repetición Multipette™ M4 (Eppendorf)
- Pipetas automáticas y puntas RAININ 0.5 µL – 5 mL (Mettler Toledo)
- Placas de 12 pocillos con insertos Transwell 0.4 µm poro, 12 mm diámetro (Corning Costar®)
- Placas de 6, 12, 24 y 96 pocillos (Corning Costar®)
- Placas Petri estériles Falcon™ de 3.5, 6 y 9 cm de diámetro (Corning®)
- Sistema BioMark HD (Fluidigm)
- Sistema de purificación de agua Autwomatic Plus 1+2 (Wasserlab)
- Tubos 200 µL, 1.5 mL y 2 mL (Eppendorf)
- Tubos criovial con tapón de rosca de 1.5 mL (VWR)
- Voltímetro epitelial con electrodos planos EVOM™ (World Precision Instruments)

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2 Reactivos, disolventes y componentes de los medios de cultivo

- **Acros Organics** (Geel, Bélgica): Ácido cafeico (CA).
- **Alfa Aesar** (Karlsruhe, Alemania): Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA), ácido dihidrocafeico (DHCA), quercetina dihidratada (Q).
- **Bio-Rad** (Madrid, España): Master Mix SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low ROX.
- **Extrasynthese** (Genay, Francia): Isorhamnetina (ISO) y Tamarixetina (TAM).
- **Fluka® Analytical** (Madrid, España): Ácido acético puro, medio TGEA (Agar Triptona Glucosa Extracto de Levadura) y peptona.
- **Fluidigm Standard BioTools** (San Francisco, CA, EEUU): 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent y 2X reactivo de carga de ensayo.
- **GRISP** (Porto, Portugal): Disolución salina tamponada con fosfato (PBS)
- **Invitrogen** (Madrid, España): SuperScript IV VILO Master Mix.
- **Labkem** (Barcelona, España): Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), cloruro de sodio (NaCl).
- **Lonza™** (Basilea, Suiza): Medio Basal Endotelial-2 Bullet Kit (EBM-2) compuesto por EBM-2, factor de crecimiento de fibroblastos-básico humano (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), hidrocortisona y suero bovino fetal (FBS).
- **Merck** (Darmstadt, Alemania): Acetonitrilo (ACN), dimetilsulfóxido (DMSO), medio triptona.
- **Panreac** (Barcelona, España): Alcohol isoamílico (AI) y cloruro de calcio (CaCl_2).
- **Sigma-Aldrich** (Madrid, España): (-)-Epicatequina (EC), 2-mercaptoetanol, 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FUdR), ácido 3-4-dihidroxifenil-acético (DHPAA), ácido 4-(2-hidroxietil)piperacina-1-etanosulfónico (HEPES), ácido protocatéquico (PCA), ácido vanílico (VA), colesterol, agar, ampicilina sódica, azida sódica, colágeno tipo I de cola de rata (3 mg/mL), disolución 0.25 % Tripsina-EDTA, estreptomina, extracto de levadura, nistatina, penicilina, RNaseZAP™, suero bovino fetal (FBS) y solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) compuesta por cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio (KCl), cloruro de sodio (NaCl), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), glucosa e hidrogenofosfato de disodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).
- **Thermo Fisher Scientific** (Leiden, Países Bajos): Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), solución azul tripano (0.4 %).
- **VWR Chemicals** (Leuven, Bélgica): Ácido fórmico, dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4), etanol (EtOH), hidrogenofosfato de dipotasio (K_2HPO_4), hidrogenofosfato de disodio dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) y sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).

3.2 Material biológico

Tanto la bacteria usada como fuente de alimento de los nematodos (*Escherichia coli* **OP50**), como todas las cepas de *C. elegans* utilizadas fueron obtenidas del Caenorhabditis Genetic Center (CGC) de la Universidad de Minnesota (Minneapolis, EEUU). Cepas de *C. elegans* empleadas: silvestre **N2**, **CL4176** (dvIs27 [myo-3p::A-Beta (1-42)::let-851 3'UTR) + rol-6(su1006)]), **CL2355** (dvIs50 [pCL45 (snb-1::Abeta 1-42::3' UTR(long) + mtl-2::GFP)], **CL2122** (dvIs15 [(pPD30.38) unc-54(vector) + (pCL26) mtl-2::GFP]), **CL2006** (dvIs2 [pCL12(unc-54/human Abeta peptide 1-42 minigene) + rol-6(su1006)]), **BR5270** (byIs161 [rab-3p::F3(delta)K280 + myo-2p::mCherry]), **BR5271** (byIs162 [rab-3p::F3(delta)K280 I277P I380P + myo-2p::mCherry]).

La línea celular endotelial **hCMEC/D3** fue amablemente cedida por el Dr. Pierre-Olivier Couraud (INSERM U. 567, Université René Descartes, París, Francia). Los experimentos realizados con células se llevaron a cabo en los laboratorios del grupo de investigación en Nutrición y Metabolismo de la Universidad NOVA de Lisboa bajo la supervisión de la Doctora Ana Faria.

3.3 Procedimientos experimentales y estudios con *Caenorhabditis elegans*

Para llevar a cabo las tareas de cultivo y mantenimiento de *C. elegans* y los diferentes ensayos, se trabajó en condiciones de esterilidad bajo la campana de flujo laminar o junto al mechero de alcohol, utilizando materiales estériles o flameados y medios de cultivo autoclavados.

3.3.1 Preparación de placas Petri NGM

Las placas Petri con medio de cultivo de nematodos (Nematode Growth Medium, NGM) se prepararon siguiendo las instrucciones de mantenimiento de *C. elegans* (Stiernagle, 2006). Para la preparación de botellas de 400 mL de NGM se agregaron 1.2 g de NaCl, 6.8 g de agar, 1 g de peptona y 390 mL de H₂O. Tras autoclavar el medio 50 minutos, se enfrió en un baño de agua a 60 °C durante 15 minutos y se enriqueció con 400 µL de CaCl₂ 1 M, 400 µL de colesterol 5 mg/mL (en EtOH), 400 µL de MgSO₄ 1 M, 10 mL de tampón KPO₄ 1 M, 400 µL de ampicilina sódica 50 µg/mL y 700 µL de nistatina al 1 % (en CH₃COONH₄ 7.5 M y EtOH 1:1). Utilizando procedimientos estériles, la solución de NGM con todos los componentes se dispensó en placas de Petri llenándolas 2/3 de su capacidad.

Para preparar las placas con los tratamientos ensayados en cada experimento, se preparó previamente una solución madre concentrada de cada compuesto fenólico utilizando DMSO puro como disolvente. Durante el proceso de enriquecimiento de nutrientes del NGM, se incorporaron al medio 1 µL/mL de la solución madre de cada compuesto o de DMSO (placas control). De esta manera se aseguró que los compuestos fenólicos quedaran distribuidos homogéneamente en el medio de cultivo junto con el resto de los nutrientes, manteniéndose el porcentaje de DMSO en 0.1 % tanto en las placas de tratamiento como en los controles. Las concentraciones finales en las placas de cada compuesto ensayado fueron: EC 50, 100, 150 y 200 µM, Q 50, 100, 150 y 200 µM, PCA 100, 200 y 300 µM, VA 100, 200 y 300 µM, 3-4HPA 100, 200 y 300 µM.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.2 Cultivo de *Escherichia coli* OP50 como fuente de alimento de nematodos

En primer lugar, se realizó una siembra en estría de *Escherichia coli* OP50 resistente a ampicilina sobre placas Petri de 9 cm de diámetro con LB agar como medio de cultivo. Para dicha siembra se partió de un cultivo stock previamente congelado a -80 °C en criotubos de 1.5 mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas y, pasado este tiempo, se inoculó una de las colonias crecidas en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de medio líquido LB, que se incubó de nuevo a 37 °C hasta el día siguiente. A continuación, se prepararon alícuotas de 1 mL del cultivo en tubos Eppendorf que se mantuvieron, al igual que las placas con colonias aisladas, a 4 °C hasta su uso. Estas alícuotas se emplearon en el momento de preparar las placas de tratamiento o control, extendiendo en círculo entre 20 y 100 µL del cultivo (según tamaño de placa y cantidad de nematodos) sobre las placas NGM con un asa de siembra en "L". Tras 24 h de incubación a 25 °C, se formaba un césped bacteriano en el centro de las placas que utilizaban los nematodos como fuente de alimento. Todos los medios utilizados (LB sólido, LB líquido y NGM) se suplementaron con ampicilina sódica (50 µg/mL) para prevenir contaminaciones y asegurar el crecimiento selectivo de la cepa OP50 resistente.

3.3.3 Cultivo y mantenimiento de cepas de *C. elegans*

Para el mantenimiento de una población de *C. elegans*, a partir de placas sobrepobladas se cortaron porciones de agar de aproximadamente 1 cm² que se traspasaron a placas NGM frescas con *E. coli* OP50. Los nematodos provenientes de la porción de agar traspasada se distribuyeron por el resto de la placa y continuaron con el desarrollo de la población.

Las cepas transgénicas CL4176, CL2355 y CL2122 (control de CL2355), se mantuvieron y cultivaron en incubadores a 16 °C, sin embargo, para inducir la expresión y acumulación del péptido Aβ durante los experimentos, las placas se pasaron a incubadores a 25 °C (más detalles en los siguientes párrafos). Por otro lado, la cepa silvestre N2 y las cepas transgénicas CL2006, BR5270 y BR5271 (control de BR5270) productoras de péptido Aβ y p-Tau de manera constitutiva, se mantuvieron y cultivaron en incubadores a 20 °C.

3.3.4 Congelación y descongelación de cepas

C. elegans es un animal pluricelular que se puede congelar y descongelar y mantenerse con vida. De esta manera, la colección de cepas no necesita un mantenimiento continuo. Para realizar el proceso de congelación, se partió de placas de mantenimiento con individuos mezclados en todas las fases del ciclo de vida, pero con alta abundancia de larvas L1 que son las que más resisten a la criopreservación. Tras recoger los nematodos de las placas NGM con 2 mL de tampón M9, se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL, donde se dejaron sedimentar por gravedad. A continuación, se retiró el sobrenadante y se procedió a un lavado añadiendo tampón M9 en dos ocasiones sucesivas, eliminando cada vez el sobrenadante, con el objetivo de reducir al máximo la presencia de bacterias. Después del último lavado, se pasaron 0.5 mL del pellet de nematodos a un vial apto para congelación y se añadieron 0.5 mL de glicerol al 30 %. Los nematodos preparados de esta manera se pueden mantener durante años a -80 °C. Para la descongelación de cepas, se mantuvo un vial a temperatura ambiente hasta observar a la población depositada en el fondo del tubo, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en unos 200 µL de M9 que se sembraron en placas NGM. Finalmente, tras 2-3 días de cultivo, los nematodos que sobrevivieron a la descongelación, se traspasaron individualmente con la pica de platino a placas frescas.

3.3.5 Sincronización de nematodos

El objetivo de la sincronización es obtener una población de nematodos de la misma edad al inicio de cada experimento. Para ello, se partió de placas de mantenimiento con individuos en distintas fases del ciclo de vida, pero con una alta abundancia de adultos hermafroditas con huevos en su interior. En función de las necesidades experimentales y de las características de las cepas, se emplearon dos procedimientos alternativos:

- Selección y traspaso de adultos jóvenes mediante una pica con fibra de platino esterilizada. Aproximadamente 25 hermafroditas se traspasaron de forma individual desde una placa de mantenimiento a cada una de las placas con o sin tratamiento. Después de unas 10 horas, los adultos se retiraron de las placas dejando únicamente los huevos puestos por los nematodos. Este fue el método utilizado mayoritariamente para obtener una población sincronizada antes de cada ensayo.
- Utilización de lejía comercial (3.46 % hipoclorito de sodio, NaClO) e hidróxido sódico (NaOH) en proporción 2:1 (1 mL de lejía + 0.5 mL de NaOH 5 N). Este procedimiento, además de permitir la sincronización de la población, facilita la eliminación de posibles contaminaciones bacterianas o fúngicas. Los nematodos se recogieron con aproximadamente 2 mL de tampón M9 y se transfirieron a tubos Eppendorf. Tras la sedimentación por gravedad, se retiró el sobrenadante y se añadió nuevamente M9. Este proceso se repitió 2-3 veces con el fin de eliminar la mayor cantidad posible de bacterias. En el último lavado, se dejó el pellet de nematodos en un volumen de 250 μ L al que se añadieron 150 μ L de la solución de NaClO:NaOH 2:1. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante 6-7 minutos, hasta observar la completa disgregación de los cuerpos, permaneciendo únicamente los huevos en el tubo. A continuación, los huevos se centrifugaron durante 1 min a 11000 g y 4 °C, se retiró completamente el sobrenadante por vacío y los huevos se resuspendieron y traspasaron a tubos limpios con M9. Posteriormente, se realizaron cinco ciclos adicionales de centrifugación, resuspensión y lavado con M9 para eliminar completamente los restos de la solución de NaClO:NaOH. Finalmente, se estimó el número de huevos en cada tubo, mediante el conteo de una alícuota de 2 μ L, y se sembraron en placas frescas con OP50 (con o sin tratamiento) alrededor de 3500 huevos/placa. Este método se utilizó para el mantenimiento de poblaciones libres de contaminación y en aquellos experimentos que requerían un elevado número de nematodos, lo que hacía inviable el traspaso manual de hermafroditas descrito en el procedimiento anterior.

3.3.6 Ensayo de parálisis

El ensayo de parálisis se realizó según el método de W. Chen et al. (2018). En cada tratamiento, alrededor de 100 nematodos de la cepa CL4176 se cultivaron a 16 °C desde la fase huevo en placas NGM que contenían diferentes concentraciones de EC o Q (50, 100, 150 o 200 μ M) o DMSO (control) y *E. coli* OP50 como alimento. Tras la incubación a 16 °C durante 48 horas, se elevó la temperatura a 25 °C para inducir la expresión del transgén A β en las células musculares. A continuación, se registró el número de nematodos paralizados desde las 24 horas posteriores a la subida de temperatura hasta las 32 horas, en intervalos de 2 horas. Se consideró que los nematodos estaban paralizados cuando no respondían al estímulo mecánico aplicado manualmente con el asa de platino. Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas independientes para cada tratamiento.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.7 Ensayo de longevidad

Nematodos sincronizados desde la fase de huevo se cultivaron en placas de 6 cm de diámetro en presencia o ausencia de los flavonoides o sus metabolitos. Cuando alcanzaron el estado de adulto joven, se transfirieron 80 nematodos por condición, distribuidos en 4 placas de 3.5 cm de diámetro con FUDR a una concentración de 75 μ M para evitar la reproducción y mezcla de generaciones. Cada 2-3 días los nematodos supervivientes se contaron y traspasaron a placas frescas hasta que todos se contabilizaron como muertos. Los individuos se consideraron muertos cuando no respondían a una estimulación mecánica con la pica de platino. Los animales que experimentaron eclosión interna no se incluyeron en el análisis. Se realizaron 3 ensayos independientes (N total de $\approx$ 350 individuos por condición).

3.3.8 Ensayo de quimiotaxis

La respuesta quimiotáctica frente a compuestos volátiles se evaluó tanto en el modelo de A β (cepa CL2355 y su control CL2122) como de p-Tau (cepa BR5270 y su control BR5271). Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo conforme a los protocolos descritos en la literatura para cada modelo. De manera general, los nematodos sincronizados desde la fase de huevo se cultivaron en placas NGM con *E. coli* OP50, preparadas con los flavonoides, sus metabolitos o DMSO como control, hasta que alcanzaron el estado adulto. Se realizaron entre 3 y 5 ensayos independientes en todas las condiciones.

Las cepas transgénicas CL2355 y CL2122 (control negativo) se cultivaron a 16 °C durante 48 horas en placas Petri con EC, Q o DMSO. Transcurrido este tiempo, las placas se sometieron a un aumento de temperatura hasta los 25 °C para inducir la expresión del péptido A β en las neuronas de los nematodos (Dosanjh et al., 2010). Treinta y seis horas más tarde, los nematodos se recogieron y se lavaron 3 veces con tampón M9. Después, entre 60 y 70 individuos se transfirieron al centro de placas NGM de 6 cm de diámetro sin alimento, divididas en 4 cuadrantes (Figura 21 A). En el centro de cuadrantes opuestos se colocaron 4 μ L de benzaldehído (BZ) al 0.5% en EtOH puro (atrayente) o de EtOH (odorante neutro). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y, a continuación, se contabilizó el número de nematodos presentes en cada cuadrante. Finalmente, la respuesta quimiotáctica se expresó como Índice de Quimiotaxis (IQ) mediante la fórmula:

$$IQ = [nBZ - nEtOH] / [nBZ + nEtOH].$$

El ensayo de quimiotaxis con las cepas transgénicas BR5270 y BR5271 (control negativo) se ejecutó en base a los estudios realizados por Fang et al. (2019) y Kauffman et al. (2011). Las cepas se cultivaron a 20 °C durante todo el ensayo, dado que la expresión de p-Tau es constitutiva. Cuando se alcanzó el primer día de adulto, los nematodos se recogieron y se lavaron 3 veces con tampón M9 para eliminar la bacteria OP50. Alrededor de 70 individuos se dispusieron en la parte inferior de placas NGM de 9 cm de diámetro sin alimento. Se depositó 1 μ L de alcohol isoamílico (AI) al 1 % como atrayente (diluido en agua) o de EtOH (compuesto neutro) en dos puntos opuestos y equidistantes del origen (Figura 21 B). Después de 1 hora a temperatura ambiente, se contaron los nematodos presentes en los puntos de origen (O), AI y EtOH. Se determinó el IQ a partir de la fórmula:

$$IQ = [nAI - nEtOH] / [nAI + nEtOH + nO].$$

En todos los casos, se depositó 1 μ L de azida sódica (NaN_3) 1 M para anestesiarse a los nematodos en cada punto en el que se colocó el atrayente o el EtOH. La figura 21 muestra un esquema representativo de la disposición de los puntos con o sin compuesto volátil en las placas.

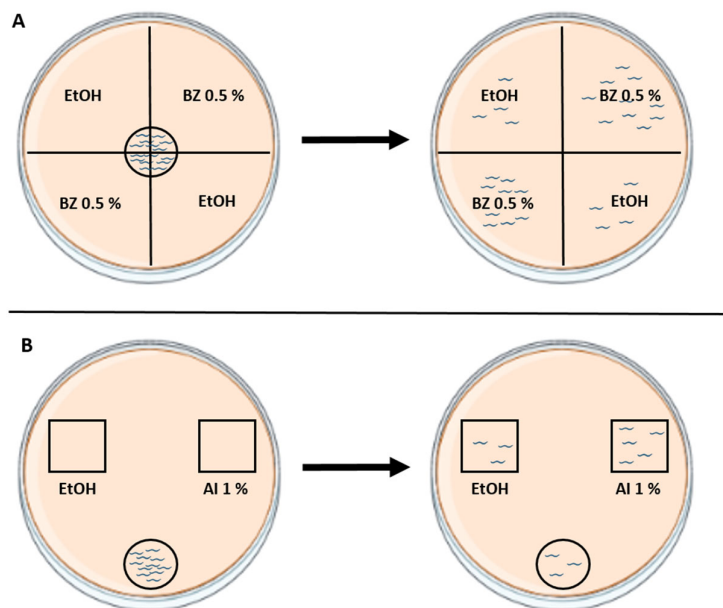


Figura 21: Disposición en las placas Petri sin alimento de los puntos de origen, atrayente y EtOH correspondientes al ensayo de quimiotaxis. **A:** Quimiotaxis realizada con las cepas CL2355 y CL2122 con expresión neuronal del péptido A β . **B:** Quimiotaxis realizada con las cepas BR5270 y BR5271 con expresión pan-neuronal de p-Tau. Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

3.3.9 Ensayo de locomoción

Se cuantificó el número de flexiones corporales de nematodos de la cepa BR5270 (modelo de tauopatía) en adultos jóvenes, de mediana edad y de edad avanzada. El registro de las flexiones se realizó en los días 1, 3, 5, 8 y 11 de adulto, transfiriendo de manera individual 20 nematodos a una placa sin alimento que contenía una gota de tampón M9. Tras un período de adaptación al medio líquido de 30 segundos, se contabilizó de manera manual el número de flexiones corporales durante un intervalo de 30 segundos (Wang et al., 2021). Se realizaron tres ensayos independientes (N total de 60 individuos por condición).

3.3.10 Ensayo de expresión génica en *C. elegans*

El análisis de expresión génica se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR), utilizando sondas de detección EvaGreen® con el sistema Biomark HD (Fluidigm) en una placa de 96x96. Para este fin, los nematodos tratados con EC, Q o DMSO (control) se recogieron entre los días 2-3 de adulto y se lavaron 3 veces con tampón M9. Después, se homogeneizaron en el interior de tubos de rosca que contenían bolas de acero de 2 mm y tampón de lisis, utilizando el homogeneizador FastPrep-24 5G a una velocidad 5.5 m/s durante 10 segundos, en 7 ciclos (20 segundos de pausa entre ciclos). Seguidamente, se aisló el ácido ribonucleico (ARN) total mediante el kit RNeasy Spin Mini (25050071, Qiagen) y se cuantificó la cantidad de ARN mediante espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher). Las muestras de ARN extraído se mantuvieron a -80 °C hasta su uso.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) se generó por transcripción inversa a partir de 0.2 µg de ARN y 4 µL de la SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen) en tres etapas: 25 °C 10 min, 50 °C 10 min y 85 °C 5 min. A continuación, se realizó una preamplificación específica de las muestras, necesaria para el análisis en la plataforma Biomark HD. Para ello, se empleó el sistema Multiplex PCR kit de QIAGEN® y se preparó un pool de todos los cebadores de cada estudio a una concentración final de 500 nM. De esta manera, se amplificaron todas las regiones de interés al mismo tiempo. Para la preamplificación de dianas específicas de ADNc (reacción STA, Specific Target Amplification) se mezclaron 1.25 µL de cada muestra de ADNc con 0.5 µL del pool de cebadores DeltaGene, 0.75 µL de agua libre de nucleasas y 2.5 µL de enzima Multiplex 2X. La mezcla se calentó en una primera etapa a 95 °C durante 15 min y, en la segunda etapa, se realizaron 20 ciclos de amplificación de 95 °C 15 s y 60 °C 4 min. Posteriormente, se realizó un tratamiento con Exonucleasa I para eliminar los cebadores no incorporados (0.2 µL de tampón Exonucleasa I, 0.4 µL Exonucleasa I a 20U/ µL, 1.4 µL de agua libre de DNasas), mediante una digestión a 37 °C 30 min, seguida de una inactivación a 85 °C durante 15 min.

El ADNc preamplificado se utilizó para la RT-qPCR en el sistema BioMark HD (Fluidigm) mezclando 2.25 µL de ADNc, 2.5 µL de 2X SsoFast EvaGreen Supermix con Low ROX (Bio-Rad) y 0.25 µL de 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent (Fluidigm). Los pares de cebadores para la RT-qPCR (100 µM) se diluyeron 1:10 con Tris-EDTA (2.5 µL de volumen total) y se mezclaron con 2.5 µL de 2X Reactivo de Carga de Ensayos (Fluidigm). Cada muestra se pipeteó individualmente por triplicado en el circuito fluídico integrado (IFC) GE 96.96 Dynamic Array™ (Fluidigm). Los datos de expresión génica se analizaron mediante el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando el gen de mantenimiento *act-1* como control interno (Livak & Schmittgen, 2001; Zhang et al., 2012). Se realizaron de cuatro a seis experimentos independientes. Los procesos de generación y preamplificación de ADNc, así como la RT-qPCR en el IFC GE 96.96 Dynamic Array™, se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación de ADN “Nucleus” de la Universidad de Salamanca.

Los oligonucleótidos de los cebadores específicos para el ADNc de cada uno de los genes estudiados se obtuvieron de la bibliografía o se diseñaron mediante el programa OligoAnalyzer™ Tool de Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/calc/analyser>). Las muestras de ADNc se utilizaron para la RT-qPCR con el fin de cuantificar los niveles de ARN mensajero (ARNm) de los genes *act-1* (control interno), *ced-7*, *ced-13*, *daf-16*, *epg-8*, *gst-7*, *hsf-1*, *hsp-70*, *lmp-2*, *pdr-1*, *pink-1*, *rpn-6.1*, *skn-1*, *sut-1*, *sut-2*, *tbce-1*, *vha-5*, *xbp-1* y *ZC239.12*, utilizando las secuencias de oligonucleótidos descritas en la Tabla 4.

Tabla 4: Secuencias de oligonucleótidos utilizados como cebadores en el ensayo de expresión génica en *C. elegans* mediante RT-qPCR. El gen *act-1* se empleó como control interno.

Gen	Forward	Reverse
<i>act-1</i>	CCAGGAATTGCTGATCGTATG	GGAGAGGGAAGCGAGGATAG
<i>ced-7</i>	GAAGTGGCAGATTCCGAAAGA	TCAAGGGAGGACTGAGCTAATA
<i>ced-13</i>	AGCTCCCTGTTTATCACTTCTC	GTCAAACCTCGTCGACATAAC
<i>daf-16</i>	CCAGACGGAAGGCTTAACT	ATTCGCATGAAACGAGAATG
<i>epg-8</i>	GCGGTAAACGCTACACAAAGA	CCATCCGCTGAGATTCCTGG
<i>gst-7</i>	GACAGCTTCCACTCCTTGAA	GCACACTTCCATTGATTCC
<i>hsf-1</i>	GAAATGTTTTGCCGATTTT	CCTTGGGACAGTGAGTCAT
<i>hsp-70</i>	CAAGACTTTGGAGCCGGTTG	GGAGCAGTTGAGGTCCTTCCC

<i>Imp-2</i>	CGCTGCTTTTGAAGCCTTGT	AGTGTCCGCTGTTGAGGATG
<i>pdr-1</i>	AGCCACCGAGCGATTGATTGC	GTGGCATTTTGGGCATCTTCTTG
<i>pink-1</i>	AGCATATCGAATCGCAAATGAGTTAG	TCGACCGTGGCGAGTTACAAG
<i>rpn-6.1</i>	AATATTGGAAAAGCACCTGAAATGT	TTTGATGTGGAAGTGAAGTCATTGT
<i>skn-1</i>	AGTGTGCGGCGTTCCAGATTTC	GTCGACGAATCTTGCGAATCA
<i>sut-1</i>	CGAGCAGTGGAAGGAGAATAAT	CTCGCTCCACTTCTTTCTC
<i>sut-2</i>	CAGGAGCATGCAGAAATCCA	GGCCGGCTTATGGTAGAAATAG
<i>tbce-1</i>	GGTGTCATGCCTATGAGATT	CTGCAGACCTTCGTTCTACTT
<i>vha-5</i>	CTTCATGGAAACGCGACTGT	CGGTAACGAACACCATGTGC
<i>xbp-1</i>	TGGACACCTCGAACAAATCC	CTTGAAACAAGACGCTGCATAAC
<i>ZC239.12</i>	CCAGAAGAATCCCCATACGA	TCCTCCTCCAACCTTTTCCAAA

3.4 Procedimientos experimentales y estudios con líneas celulares

Para la realización de las tareas de crecimiento y mantenimiento de cultivos celulares, se trabajó en condiciones de esterilidad bajo Cabina de Bioseguridad tipo II (BSCII, *Biological Safety Cabinet*), empleando materiales y medios de cultivo estériles de fábrica o autoclavados. Además, el espacio y el material se irradiaron con luz ultravioleta durante 15 minutos antes y después del trabajo en la cabina.

3.4.1 Cultivo y mantenimiento de la línea celular endotelial hCMEC/D3

La línea celular hCMEC/D3 se mantuvo en una atmósfera humidificada (5% CO₂, 95% aire) a 37 °C. Durante la fase de proliferación, las células se cultivaron sobre placas Petri de 6 cm de diámetro en medio EBM-2 suplementado con 2.5 % de FBS, 2.5 µL/mL de VEGF, IGF-1 y EGF del EBM-2 Bullet Kit, FGF básico (1 ng/mL, stock 50 µg/mL en PBS), hidrocortisona (1.4 µM, stock 1 mg/mL en EtOH), HEPES (10 mM, stock 1M en H₂O miliQ), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Tras 4 días de incubación el cultivo alcanzó la confluencia, momento en el que la monocapa celular cubrió por completo la superficie, sin espacios vacíos. En este estado, se procedió a la disociación celular empleando tripsina-EDTA al 0.25 %. Para ello, se eliminó el medio de cultivo de las placas, se lavaron con PBS y se añadió tripsina, que se retiró de inmediato para dejar solo una fina película sobre la monocapa. Transcurridos 2 minutos de incubación, las células se recogieron y diluyeron 1:4 con el medio de cultivo o de congelación (FBS + 5 % DMSO) para su posterior siembra en placas de experimentación o criopreservación.

Para la fase de diferenciación celular en las placas de experimentación (insertos Transwell o placas de 24 pocillos), las células se cultivaron en medio EBM-2 suplementado con FBS, FGF básico, hidrocortisona, HEPES, penicilina y estreptomycin a las mismas concentraciones anteriormente descritas.

En todos los casos, el medio se renovó cada 48-72 horas. Tanto las placas de mantenimiento como las experimentales se recubrieron previamente con colágeno. Para dicho proceso, se aplicó una disolución de colágeno tipo I de cola de rata (50 µg/mL en ácido acético 20 mM) que se incubó durante, al menos, 40 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se retiró la disolución y las placas se lavaron 3 veces con PBS antes de añadir el medio de cultivo fresco.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

La solución salina balanceada de Hanks (HBSS) utilizada en los ensayos de viabilidad celular y transporte, estaba compuesta por NaCl (138 mM), KCl (5.3 mM), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (0.34 mM), KH_2PO_4 (0.44 mM), glucosa (5.56 mM), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (1 mM) y $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1 mM) ajustada a pH 7.4.

3.4.2 Ensayo de viabilidad celular en la línea hCMEC/D3

Se evaluó el efecto de cada compuesto estudiado sobre la viabilidad e integridad de la línea hCMEC/D3 mediante los ensayos MTT y azul tripano. En ambos casos, se emplearon células procedentes de una placa en confluencia, disociadas con tripsina y diluidas 1:4, que fueron sembradas en placas de 24 pocillos, recubiertas con colágeno, que contenían 400 μL de medio EBM-2 de diferenciación. Transcurridos 9-10 días tras la siembra, se eliminó el medio de cultivo y las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C en 300 μL /pocillo de HBSS (con 0.1 % de FBS) junto con los compuestos de interés.

Transcurrido el tiempo de incubación con los compuestos fenólicos, el análisis de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico MTT comenzó retirando el sobrenadante y añadiendo 300 μL /pocillo de HBSS con 0.5 mg/mL de MTT (stock 5 mg/mL en PBS) (Riss et al., 2016). A continuación, la placa se incubó a 37 °C durante 2 horas en oscuridad. Tras el periodo de incubación, se retiró la solución de MTT, las células se solubilizaron en 200 μL de DMSO y posteriormente se realizó una dilución 1:2. Finalmente, se midió la absorbancia en una placa de 96 pocillos a 540-660 nm utilizando un lector de microplacas SpectraMax i3x. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo respecto al control (células no tratadas).

De forma complementaria, la integridad de la membrana plasmática se evaluó mediante el método de exclusión con azul tripano, en el que solo las células muertas o dañadas se tiñen, mientras que el resto de las células viables permanecen incoloras (Strober, 2015). Para ello, en primer lugar, se retiró el HBSS con 0.1 % de FBS y cada compuesto de interés con el que se habían incubado las células durante 3 horas. Las células se lavaron con PBS, se desprendieron con tripsina y se recolectaron con HBSS y la solución azul tripano (0.4 %) en proporción 1:1. Tras ≈ 3 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó el recuento en una cámara de Neubauer bajo microscopio óptico. La viabilidad celular se expresó como el porcentaje de células viables (no teñidas) respecto al total de células contadas.

$$\text{Células viables (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células viables/mL}}{\text{n}^\circ \text{ total de células/mL}} \cdot 100$$

3.4.3 Ensayo de transporte de flavonoides y sus metabolitos a través de hCMEC/D3

Para la realización del ensayo de transporte, se siguió el protocolo establecido por Faria et al., (2014). Las células recogidas de una placa en confluencia y diluidas 1:4 fueron sembradas y cultivadas a 37 °C en insertos Transwell (0.4 μm de tamaño de poro, 12 mm de diámetro) alojados en placas de 12 pocillos. Dichos dispositivos contenían 300 μL /pocillo de medio EBM-2 de diferenciación celular en la parte apical (AP) y 1 mL/pocillo en la parte basolateral (BS). Tras 9-10 días de cultivo, se retiró el medio y se lavaron ambos compartimentos con HBSS (300 μL en el lado AP y 1 mL en el BS). A continuación, se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las células utilizando un voltímetro epitelial provisto de electrodos planares (EVOM). Los experimentos se llevaron a cabo únicamente en monocapas celulares con una TEER > 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Tras la medición, se sustituyó el HBSS del lado AP por 300 μL de la disolución de los compuestos

(Q, EC, ISO, TAM, PCA, VA, DHPAA, 3-4HPA, DHCA o CA) en HBSS suplementado con 0.1 % de FBS, mientras que en el lado BS se añadieron 1 mL de HBSS suplementado únicamente con 0.1 % de FBS. Se monitorizó el transporte transepitelial a 37 °C mediante la recogida de muestras de ambos lados al inicio del experimento (t0), a la hora (t1) y a las 3 horas (t3). El volumen extraído del compartimento BS a t1 se sustituyó por el mismo volumen de medio fresco. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por HPLC.

3.4.4 Análisis y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos mediante HPLC

Las muestras obtenidas de los ensayos de transporte de cada uno de los compuestos estudiados (Q, EC, ISO, TAM, PCA, VA, DHPAA, 3-4HPA, DHCA y CA) se analizaron en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Hewlett–Packard-1200 HPLC-DAD equipado con una bomba binaria y el software HP-ChemStation para el procesamiento de datos. La separación se llevó a cabo en una columna de fase reversa Poroshell 120 EC-C18 (150 mm × 4.6 mm, 2.7 µm) mantenida a 35 °C. Como fase móvil se emplearon ácido fórmico al 0.1 % en agua (eluyente A) y acetonitrilo (ACN) grado HPLC (eluyente B). Se utilizó el siguiente programa de elución con un flujo de 0.5 mL/min: 85 % A durante 5 min, de 85 % a 80 % A durante 5 min, de 80 % a 65 % A durante 10 min, de 65 % a 50 % A durante 10 min, de 50 % a 60 % A durante 2 min, seguido de un periodo isocrático al 60 % A durante 5 min. Finalmente, la proporción de eluyente A se incrementó del 60 % al 85 % en 3 min y la columna se estabilizó en las condiciones iniciales durante otros 5 min. La detección se realizó mediante un detector DAD fijando como longitudes de onda preferentes 280, 330 y 360 nm.

Para determinar la concentración de los compuestos fenólicos en las muestras tomadas de los compartimentos AP y BS de los insertos Transwell, se prepararon rectas de calibrado de todos los compuestos de interés empleando patrones en un rango de concentraciones de 0-100 µM. Las concentraciones en las muestras se calcularon mediante la interpolación de las áreas obtenidas en la ecuación de la recta. Finalmente, la eficacia de transporte de cada compuesto se determinó aplicando la fórmula definida por Sánchez-Martínez et al. (2023):

$$ET (\%) = \frac{C_{BS} / V_{AP}}{C_{AP} / V_{BS}} \cdot 100$$

C_{BS}, C_{AP}, V_{BS} y V_{AP} corresponden a las concentraciones y volúmenes en los compartimentos basolateral y apical.

3.5 Análisis estadísticos

Para el tratamiento de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 9.0.0 (GraphPad Software, Boston, MA, EE.UU.). En los ensayos de parálisis y de longevidad, el *p* valor se determinó mediante la prueba de log-rank (Kaplan-Meier) para evaluar las diferencias en las curvas de supervivencia entre los grupos de nematodos tratados con flavonoides y el grupo control. En los ensayos de vida máxima, quimiotaxis y RT-qPCR, la significación se analizó mediante un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) aplicando las pruebas de Brown-Forsythe y Welch, y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett T3. Para los ensayos de parálisis a 24 y 32 horas y locomoción, se utilizó ANOVA de dos vías seguido de la prueba de comparaciones múltiples Dunnett. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de forma independiente (triplicado biológico). Los valores de *p* < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos (* < 0.05, ** < 0.01 y *** < 0.001).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efectos y mecanismos de neuroprotección de compuestos fenólicos frente a la toxicidad del péptido beta amiloide en *C. elegans***4.1.1 Determinación de la dosis efectiva de EC y Q**

La cepa transgénica de *C. elegans* CL4176 se utilizó para determinar si EC o Q podrían proteger *in vivo* frente a la toxicidad inducida por el péptido A β . Esta cepa presenta un fenotipo que puede ser fácilmente visualizado a lo largo del tiempo, ya que desarrolla una parálisis del cuerpo a medida que se induce la expresión del transgén A β en las células musculares al aumentar la temperatura de 16 a 25 °C (Drake et al., 2003).

En primer lugar, con el objetivo de identificar la concentración óptima para realizar los diferentes ensayos, se llevaron a cabo estudios preliminares cultivando los nematodos en presencia o ausencia (grupo control) de diferentes concentraciones de EC o Q en el medio NGM (50, 100, 150 y 200 μ M). Para ello, se contabilizó el número de nematodos en movimiento (no paralizados) y paralizados a las 24 y a las 32 horas tras la inducción de A β (post incremento de temperatura). No se observaron efectos significativos a las concentraciones de 50 y 100 μ M a ninguno de los dos tiempos de cuantificación, mientras que a la concentración de 150 μ M, el porcentaje de nematodos no paralizados fue significativamente superior a las 32 horas en comparación con el grupo control. Sin embargo, dicho aumento se revirtió a 200 μ M, observándose una disminución significativa a las 24 horas en el grupo tratado con Q (Figura 22).

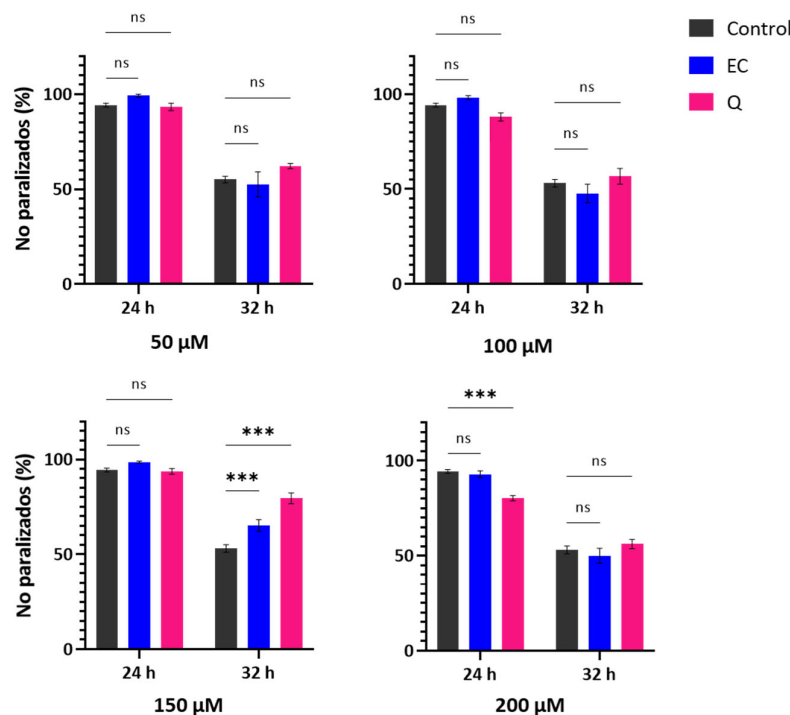


Figura 22: Porcentaje de nematodos no paralizados a las 24 y 32 horas tras la inducción de A β en la cepa CL4176 cultivada en presencia de diferentes concentraciones de EC, Q o DMSO (control) (50, 100, 150 y 200 μ M). Los datos representan la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. *p*-valor determinado por ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett (ns = no significativo, *** *p* < 0.001), *n* $\approx$ 400 nematodos por condición.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para confirmar las observaciones de los ensayos preliminares, el ensayo de parálisis se repitió a las concentraciones de 150 y 200 μM cuantificando, cada dos horas, el porcentaje de nematodos paralizados y no paralizados desde las 24 hasta las 32 horas post incremento de temperatura. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier del grupo control y de los grupos tratados con los diferentes flavonoides (EC o Q) se compararon a ambas concentraciones. Se observó un retraso significativo de la parálisis en los nematodos que habían sido cultivados en presencia de EC o Q a la concentración de 150 μM (log-rank, *** $p < 0.001$). Por el contrario, a la concentración más alta ensayada (200 μM), como se había previsto en los ensayos previos, el porcentaje de nematodos no paralizados fue significativamente inferior al control (log-rank, * $p < 0.05$) (Figura 23).

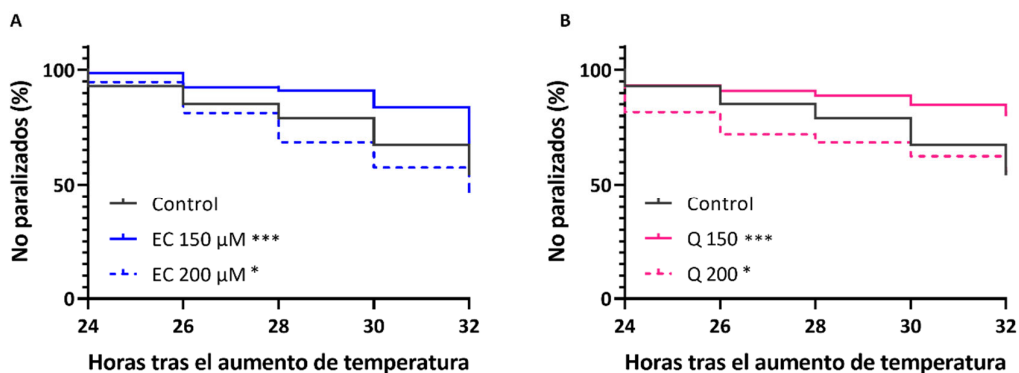


Figura 23: Efecto de diferentes concentraciones de los flavonoides EC y Q sobre el porcentaje de nematodos paralizados en *C. elegans* CL4176 en comparación con el grupo control no tratado. **(A)** EC 150 o 200 μM . **(B)** Q 150 o 200 μM . Los datos representan la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes. Resultados analizados mediante log-rank (Kaplan-Meier), $n \approx 400$ por condición, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Los resultados obtenidos muestran la relación existente entre la concentración presente en el medio NGM y los efectos detectados para ambos compuestos fenólicos. Mientras que a las concentraciones más bajas (50 y 100 μM), se mantuvo la misma ratio de nematodos paralizados que en el grupo control a las 24 y 32 horas post incremento de temperatura, el tratamiento con EC o Q 150 μM , aumentó significativamente el porcentaje de nematodos no paralizados en comparación con el control a las 32 horas (Figura 22). Por otro lado, las curvas Kaplan-Meier, mostraron un efecto posiblemente tóxico a la concentración de 200 μM , en el que se observó una clara reducción del porcentaje de nematodos no paralizados desde las 24 hasta las 32 horas tras la inducción del péptido A β en la cepa CL4176 de *C. elegans* (Figura 23). Estas observaciones sugieren una respuesta hormética a los flavonoides, caracterizada por efectos inapreciables o mínimos a dosis bajas, efectos beneficiosos al aumentar la concentración y adversos a partir de que se supera cierto umbral de dosis. En el presente estudio, únicamente un estrecho rango de concentraciones originó efectos beneficiosos, lo que parece coherente con este patrón bifásico de respuesta. Este tipo de comportamiento ha sido ampliamente descrito en la literatura científica (Butterfield et al., 2023) y concuerda asimismo con resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación en estudios sobre el efecto de compuestos fenólicos en *C. elegans*. Así, por ejemplo, se observó que nematodos de la cepa silvestre N2, cultivados en presencia de diferentes concentraciones de extracto de orujo de uva (*grape pomace extract*, GPE) y sometidos a estrés oxidativo inducido térmicamente, presentaron un aumento significativo de la supervivencia a concentraciones de 100 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de GP, mientras que dicha supervivencia disminuyó, en comparación con el grupo control, cuando se utilizó una

concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de GPE (Ayuda-Durán et al., 2019a). De manera similar, Dueñas et al. (2013) demostraron que la vida media de nematodos N2 tratados con quercetina-3-O-glucósido aumentaba a concentraciones bajas (10 y 25 μM), mientras que se reducía significativamente a la concentración más elevada ensayada (200 μM).

De esta manera, se estableció 150 μM como la dosis de flavonoide efectiva capaz de aliviar la parálisis provocada por expresión del péptido A β en las condiciones ensayadas, eligiéndose como concentración de trabajo para el resto de los ensayos en las cepas de *C. elegans* que simulan la EA.

4.1.2 Efectos de EC y Q sobre la esperanza y calidad de vida en el modelo A β

Se evaluó el impacto de EC y Q 150 μM sobre la longevidad de la cepa CL2006, que expresa constitutivamente el péptido A β_{1-42} humano en las células musculares de la pared corporal (Link, 1995). En este caso, al no ser necesaria la inducción térmica de A β , la cepa se cultivó a 20 °C durante todas las fases del ensayo. Como se observa en la Figura 24 y la Tabla 5, los nematodos sincronizados que crecieron desde la fase huevo en presencia de EC o Q (150 μM) presentaron un aumento significativo de su supervivencia en comparación con el grupo control. En concreto, la vida media se incrementó en un 13.39 % en el grupo tratado con EC y en un 17.03 % en el tratado con Q. Asimismo, se observó una extensión de la vida máxima, definida como la correspondiente al 10 % de los individuos más longevos de cada población, en el grupo de nematodos cultivados con epicatequina (Figura 24B, Tabla 5), mientras que el aumento observado en el grupo tratado con Q no alcanzó significación estadística frente al control. En conjunto, estos datos sugieren que ambos flavonoides podrían atenuar la toxicidad inducida por A β , mejorando la supervivencia global de la cepa CL2006, si bien la epicatequina muestra un efecto más consistente sobre la longevidad máxima, lo que podría indicar diferencias en los mecanismos implicados o en la intensidad de la respuesta biológica inducida por cada compuesto. Estudios realizados por otros autores también describieron un aumento de la vida media de la cepa CL2006 tratada con otros flavonoides, como hesperidina o vitexina (Kumar et al., 2023; Malar et al., 2021).

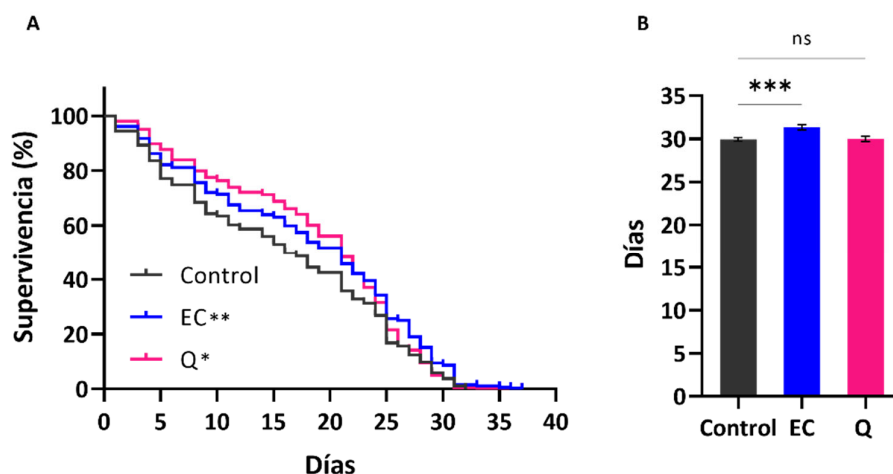


Figura 24: (A) Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) de nematodos CL2006 cultivados en placas con EC o Q 150 μM , o DMSO (grupo control) ($n \approx 350$ por condición). (B) Vida media máxima (10 % de los individuos más longevos de cada población) analizada por ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Dunnett. Los datos representan la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes, ns = no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5: Esperanza de vida de la cepa CL2006 de *C. elegans* cultivada en ausencia o presencia de EC o Q (150 μ M) en el medio de cultivo. Los resultados son expresados como media $\pm$ SEM.

Tratamiento (CL2006 modelo A β)	Vida media (días)	<i>p</i> vs Control (log Rank)	Vida máxima (días)	<i>p</i> vs Control (ANOVA)
Control	15.91 $\pm$ 0.51		29.94 $\pm$ 0.20	
EC	18.04 $\pm$ 0.53	0.001	31.34 $\pm$ 0.30	< 0.001
Q	18.62 $\pm$ 0.47	0.023	30.00 $\pm$ 0.28	0.984

Se evaluó también el efecto neuroprotector de EC y Q mediante un ensayo de quimiotaxis utilizando la cepa CL2355 de *C. elegans*, que expresa el péptido A β ₁₋₄₂ en neuronas tras inducción térmica. En este modelo, la expresión de A β causa un déficit en el comportamiento quimiosensitivo hacia compuestos volátiles, manifestado como una reducción de la capacidad de los nematodos para reconocer odorantes atractivos (Wu et al., 2006). Los nematodos se trataron con EC o Q 150 μ M y, una vez alcanzada la fase adulta, se colocaron en el centro de placas NGM con puntos equidistantes de benzaldehído (BZ), utilizado como odorante atrayente, y EtOH, empleado como olor neutro. El BZ se ha descrito previamente como un potente quimioatrayente para *C. elegans* (Bargmann et al., 1993). Tras una hora de incubación, se cuantificó el número de nematodos que migraron hacia cada estímulo, y los resultados se expresaron mediante el Índice de Quimiotaxis (IQ), donde valores cercanos a 1 indica una fuerte atracción, mientras que valores próximos a 0 reflejan una respuesta neutra.

Tal como se muestra en la Figura 25, el IQ de la cepa CL2355 se redujo en un 63.79 % en comparación con la cepa CL2122 utilizada como control negativo, confirmando la presencia de un deterioro quimiosensorial significativo asociado a la expresión neuronal de A β . Sin embargo, el tratamiento con EC o Q produjo un aumento significativo del IQ en la cepa CL2355 en comparación con el grupo control no tratado. De forma destacable, la respuesta sensorial olfativa de la cepa CL2355 tratada con epicatequina superó incluso el nivel observado en la cepa control negativo (cepa CL2122) (Figura 25). Estas observaciones sugieren que la administración de EC o Q podrían proteger a las neuronas de la toxicidad inducida por la expresión del péptido β -amiloide. Efectos similares sobre la mejora de los defectos quimiotácticos inducidos por A β han sido descritos previamente en la cepa CL2355 tratada con extractos ricos en compuestos fenólicos procedentes de hojas de *Ginkgo biloba* o *Glochidion zeylanicum* (Duangjan et al., 2021; Wu et al., 2006).

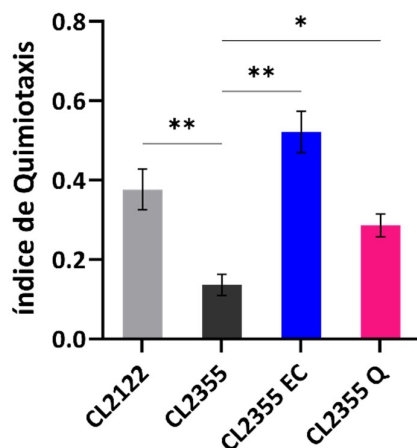


Figura 25: Respuesta quimiotáctica al BZ representada como Índice de Quimiotaxis de la cepa CL2355 tratada y no tratada (control) con EC o Q 150 μ M. La cepa CL2122 se utilizó como control negativo. Los datos representan la media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes analizados por ANOVA de una vía y test de comparación múltiple Dunnett, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n \approx 450$.

En conjunto, el tratamiento con los flavonoides EC o Q a una concentración de 150 μ M retrasó la parálisis inducida por A β y aumentó la longevidad en las cepas de *C. elegans* que expresan el péptido β -amiloide en el tejido muscular (CL4176 y CL2006). Además, ambos compuestos mejoraron de forma significativa la respuesta quimiotáctica hacia el odorante benzaldehído en la cepa CL2355, que expresa A β en neuronas (Figuras 22-25). Estos resultados sugieren que EC y Q ejercen un efecto protector *in vivo* frente a la toxicidad inducida por A β , con especial relevancia en la preservación de la función neuronal. En este sentido, los hallazgos obtenidos refuerzan la hipótesis de que ambos flavonoides pueden modular procesos celulares implicados en la neurotoxicidad asociada a A β , lo que resulta de especial interés en el contexto de la Enfermedad de Alzheimer (Calsolaro & Edison, 2016). Estos resultados son consistentes con estudios previos en los que se demostró una reducción de los niveles de A β en el cerebro de ratones transgénicos APP/PS1 alimentados con una dieta rica en EC, así como una disminución de los déficits de aprendizaje y memoria en ratones transgénicos APPswe/PS1dE9 tratados con Q (Wang et al., 2014; Zeng et al., 2014). No obstante, dado que los efectos observados a nivel funcional y fisiológico no permiten por sí solos esclarecer los mecanismos moleculares subyacentes, se planteó el análisis de la expresión génica de diferentes rutas celulares potencialmente implicadas en la neurotoxicidad asociada a A β .

4.1.3 Análisis de la expresión de genes asociados a la patología A β

Con el fin de avanzar en la comprensión de las bases moleculares implicadas en los efectos observados en las cepas transgénicas de *C. elegans*, se abordó el análisis de la expresión génica de un conjunto de genes representativos de distintas vías de señalización celular relacionadas con los procesos patológicos característicos de la enfermedad de Alzheimer. Para ello, nematodos de la cepa CL4176, cultivados de forma sincronizada en presencia de EC o Q (150 μ M), se sometieron a estrés térmico durante 36 horas para inducir la expresión del péptido A β . Transcurrido este tiempo, se extrajo el ARN y se evaluaron los niveles de expresión génica mediante RT-qPCR. Entre las vías seleccionadas para este análisis se incluyeron aquellas relacionadas con la autofagia, la apoptosis, la respuesta inflamatoria y la modulación del estrés oxidativo, procesos ampliamente implicados en la neurodegeneración y en los efectos atribuidos a diversos compuestos bioactivos (Arias-Sánchez et al., 2023; Godoy et al., 2017; Hampel et al., 2021).

a) *Autofagia*

La autofagia es un proceso de degradación lisosómica que se utiliza para eliminar componentes celulares dañados, orgánulos y agregados proteicos potencialmente tóxicos. Los residuos quedan engullidos en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas y, a continuación, son digeridos por los lisosomas. La alteración de la autofagia desempeña un papel significativo en la EA, ya que impide eliminar las proteínas mal plegadas, lo que favorece la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. La restauración de la autofagia podría mejorar la función cognitiva y evitar la muerte neuronal (Banerjee et al., 2025; Di Meco et al., 2020).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar si EC y Q modulaban esta vía de degradación proteica, se determinó el nivel de expresión de los genes *vha-5*, *epg-8* y *Imp-2*. El gen *vha-5* es ortólogo de una subunidad del dominio V0 asociado a la ATPasa vacuolar translocadora de protones (V-ATPasa) lisosomal. Dicha subunidad está implicada en la regulación del pH ácido del lumen lisosomal y es esencial en el sistema de control de calidad de las proteínas (Sarkar et al., 2022). Por su parte, *epg-8* es ortólogo del gen humano *ATG14*, componente del complejo fosfatidilinositol 3-quinasa clase III (PI3K), esencial en el control del inicio de la formación del autofagosoma (Russell et al., 2014; Zhang & Baehrecke, 2015). Finalmente, *Imp-2* es ortólogo de *LAMP1/2* humano que codifica proteínas de membrana lisosomal (LAMPs) necesarias para la biogénesis y el mantenimiento de la integridad de este orgánulo (Eskelinen, 2006).

En el presente estudio, no se observaron cambios significativos en la expresión de *vha-5*, mientras que los niveles de ARNm de *Imp-2* aumentaron de forma significativa en los nematodos tratados con ambos flavonoides en comparación con el grupo control (Figura 26). Resultados previos (Li et al., 2016) han mostrado que la sobreexpresión de *Imp-2* suprime eficazmente tanto el daño lisosomal como la reducción en la longevidad causados por la pérdida de *scav-3* (regulador de la integridad, motilidad y dinámica de los lisosomas), lo que sugiere que las proteínas LAMP en *C. elegans* podrían desempeñar un papel estructural clave en el mantenimiento de la integridad de los lisosomas. Además, se ha descrito que *Imp-2* participa de forma específica en la autofagia mediada por chaperonas (CMA) en *C. elegans*, un mecanismo especializado que facilita la translocación de proteínas mal plegadas hacia el interior de los lisosomas para su degradación (Eisermann et al., 2017). En este contexto, la sobreexpresión de *Imp-2* observada en los nematodos tratados con EC y Q podría estar favoreciendo la capacidad degradativa lisosomal y, potencialmente, contribuyendo a una menor acumulación de A β , en consonancia con los efectos fenotípicos descritos en el apartado anterior. Aunque los ortólogos humanos de LAMP desempeñan funciones más amplias en la homeostasis lisosomal, los resultados obtenidos apoyan la relevancia de los mecanismos dependientes de LAMP como posibles dianas en la modulación de la proteostasis asociada a la neurodegeneración (Kaushik & Cuervo, 2018).

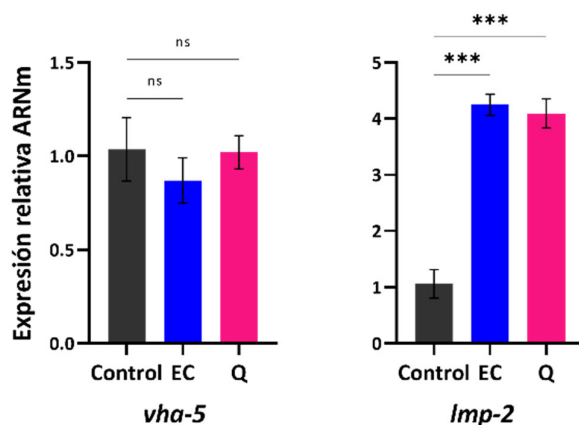


Figura 26: Niveles relativos de expresión de ARNm de los genes *vha-5* y *Imp-2*, relacionados con la autofagia, en la cepa CL4176 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y en presencia de EC o Q (150 μ M). Los análisis se llevaron a cabo mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como gen de referencia (control interno). Los datos están representados como media $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, *** $p < 0.001$.

Por el contrario, se observó un descenso significativo en la expresión del gen *epg-8*, aunque únicamente en los nematodos cultivados en presencia de EC (Figura 27), lo que sugiere que este flavan-3-ol podría estar limitando la acumulación de autofagosomas. Este resultado concuerda con el estudio realizado por Lin et al. (2022), en el que la reducción de la expresión de *epg-8* mediante ARNi se asoció con una menor acumulación de autofagosomas y con una mejora significativa del índice de quimiotaxis en la cepa CL2355. De esta manera, la regulación a la baja de *epg-8* en el grupo tratado con EC podría explicar, al menos en parte, la mejora en la función neuronal observada en el ensayo de quimiotaxis (Figura 25), sugiriendo que la reducción de la acumulación de autofagosomas podría contribuir a atenuar la toxicidad inducida por A β .

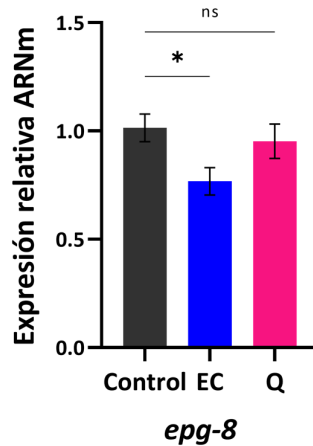


Figura 27: Niveles relativos de expresión de ARNm del gen *epg-8* en la cepa CL4176 de *C. elegans* cultivada con EC, Q o DMSO (control) (150 μ M) en el medio. Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, * $p < 0.05$.

Esta disminución relativa de *epg-8* podría estar relacionada con la pronunciada sobreexpresión de *Imp-2*, observada en los nematodos tratados con EC o Q (Figura 26), que, como ya se ha señalado, es un gen clave en la autofagia mediada por chaperonas (CMA). En la CMA, la degradación de proteínas mal plegadas, incluidos los agregados de A β , ocurre mediante translocación directa a los lisosomas a través de LAMP-2, sin necesidad de formar autofagosomas (Yao & Shen, 2023). Este mecanismo podría explicar tanto la disminución de *epg-8* en EC como la ausencia de cambios significativos en Q, así como que no se hayan encontrado diferencias en la expresión de *vha-5* (Figura 26), cuya función en la V-ATPasa lisosomal proporciona el entorno ácido necesario para la maduración de los autofagolisosomas en la vía clásica dependiente de autofagosomas (Makar et al., 2024).

En conjunto, estos hallazgos sugieren que la activación de la CMA y la sobreexpresión de *Imp-2* podrían ser responsables de la eficiente eliminación de A β en nematodos tratados con ambos flavonoides. Estos resultados están en línea con las observaciones de otros investigadores, quienes demostraron la activación de la autofagia mediada por chaperonas en estudios en los que se utilizaron compuestos fenólicos. Por ejemplo, la flavona apigenina activó la CMA para promover la eliminación de los agregados de α -sinucleína en neuronas dopaminérgicas de ratones modelo de la enfermedad de Parkinson (Y.B. Huang et al., 2025). También, Regitz et al. (2016) determinaron que la autofagia mediada por chaperonas fue activada por el estilbeno resveratrol y que esta vía era necesaria para la reducción de la parálisis inducida por A β en la cepa CL4176 de *C. elegans*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De manera global, estos hallazgos respaldan la hipótesis de que la estimulación de la autofagia mediada por chaperonas podría constituir un mecanismo eficiente para la degradación de proteínas acumuladas y disfuncionales para explicar, al menos en parte, los efectos neuroprotectores de EC y Q en el modelo A β de *C. elegans*.

b) Apoptosis y respuesta inflamatoria

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que implica la autodestrucción de células innecesarias o dañadas en respuesta a señales ambientales o internas. Este proceso desempeña un papel fundamental en el mantenimiento y la preservación de la homeostasis celular. Las células apoptóticas se caracterizan por cambios morfológicos y bioquímicos coordinados por la activación de una familia de proteasas de cisteína denominadas caspasas, consideradas efectoras esenciales de la apoptosis. Sin embargo, en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, se produce una disregulación de este mecanismo, debido al aumento del calcio intracelular y de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca daños en el tejido cerebral y, en consecuencia, las células neuronales sufren una forma de apoptosis independiente de las caspasas (Walia et al., 2021).

La modulación de la apoptosis en el cerebro podría contribuir a prevenir la pérdida neuronal. Por ello, en el presente estudio se analizó la expresión relativa de ARNm de genes implicados en la apoptosis en *C. elegans*. En concreto, se ha estudiado el gen *ced-7*, homólogo de los transportadores ABC humanos (ABCA1 y ABCA7), implicado en el reconocimiento y fagocitosis de células apoptóticas, promoviendo el engullimiento de material celular a través de la membrana de forma dependiente de ATP (De Roeck et al., 2019; Wu & Horvitz, 1998). Por otro lado, se estudió el gen *ZC239.12*, que participa en la respuesta a proteínas mal plegadas y es ortólogo de la proteína 1 inducida por el factor de necrosis tumoral α (TNFAIP1) (Link et al., 2003). Se ha descrito que TNFAIP1 interviene en un amplio rango de procesos celulares, incluidos el movimiento celular y la apoptosis (Kim et al., 2009), y que sus niveles aumentan considerablemente en modelos transgénicos de *C. elegans* de la EA y en el tejido cerebral postmortem de pacientes con EA (Link et al., 2003).

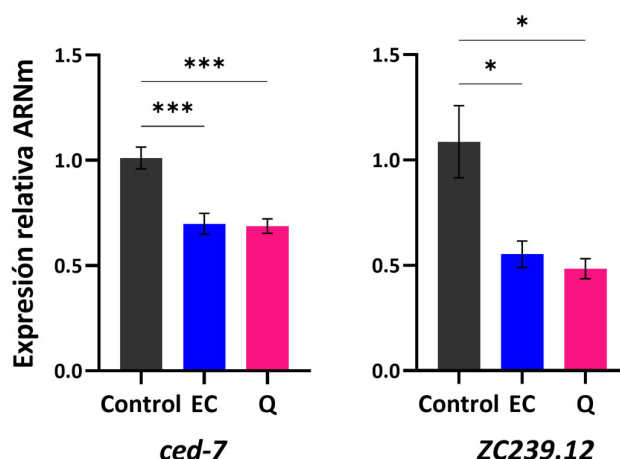


Figura 28: Niveles relativos de expresión de ARNm de los genes *ced-7* y *ZC239.12*, relacionados con la apoptosis y la neuroinflamación, en la cepa CL4176 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y presencia de EC o Q (150 μ M). Análisis realizados mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido del test de comparación múltiple Dunnett, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

En estos análisis se observó una reducción significativa en los niveles de expresión de los genes relacionados con la apoptosis, *ced-7* y *ZC239.12*, en los grupos de nematodos CL4176 cultivados en presencia de EC o Q 150 μ M en comparación con el grupo control (Figura 28), lo que parece indicar un efecto anti-apoptótico de ambos flavonoides.

Durante la progresión de la EA, se ha relacionado una mayor expresión de *ABCA7* (homólogo de *ced-7*) con un deterioro cognitivo avanzado, posiblemente como un intento compensatorio frente a otros procesos patológicos, como la disfunción de la fagocitosis y la acumulación de A β . No obstante, la función exacta de *ABCA7* en los trastornos cognitivos y conductuales sigue siendo solo parcialmente conocida (Zhao et al., 2015). La regulación a la baja de *ced-7* observada en los nematodos tratados con EC o Q podría reflejar una menor necesidad de compensación por estrés celular y es coherente con los efectos neuroprotectores de los flavonoides. Este resultado también concuerda con los efectos positivos observados en los ensayos de quimiotaxis, donde se evidenció una mejora de la función neuronal (Figura 25). De manera similar, en los nematodos cultivados con EC o Q, la disminución de la expresión de *ZC239.12* (homólogo de *TNFAIP1*) podría contribuir tanto a la reducción de la apoptosis como a la atenuación de la respuesta inflamatoria mediada por la microglía. Varios estudios han evidenciado que la sobreexpresión de *TNFAIP1* en neuronas de ratones modelo de la EA (APP/PS1), así como en neuronas corticales primarias de ratón y células Neuro2a (N2a) expuestas a A β ₂₅₋₃₅, contribuye a la degeneración neuronal y a la activación de la microglía (Liu et al., 2016; Xiao et al., 2021). Por ello, la disminución observada en la expresión de *ZC239.12* inducida por EC y Q podría ser relevante para explicar los efectos neuroprotectores de los flavonoides, ya que *TNFAIP1* se considera un biomarcador patológico crucial de la EA.

La reducción significativa en la expresión de genes relacionados con la apoptosis en los nematodos CL4176 tratados con EC o Q es consistente con estudios previos que han explorado las propiedades neuroprotectoras de otros flavonoides. En concreto, la administración de luteolina mejoró significativamente la memoria y disminuyó el deterioro cognitivo en ratones con EA inhibiendo la generación de A β , reparando el daño mitocondrial y reduciendo la apoptosis neuronal (He et al., 2023). Por otro lado, la astragalina (kaempferol 3-O-glucósido) activó la autofagia e inhibió la apoptosis de los astrocitos del hipocampo, mejorando el déficit cognitivo en ratones modelo de EA (Wang et al., 2025). La activación de la autofagia observada en el estudio de Wang et al. (2025) concuerda con nuestros resultados de sobreexpresión del gen *Imp-2*, implicado en la autofagia mediada por chaperonas, en nematodos cultivados con EC o Q (Figura 26).

Por otro lado, como se ha señalado anteriormente, *ced-7* (homólogo de *ABCA1/7*) y *ZC239.12* (homólogo de *TNFAIP1*) están implicados no solo en los procesos de apoptosis, sino también en la respuesta inflamatoria asociada a la activación de la microglía. Tanto *ABCA1* como *ABCA7* se expresan en la microglía (Kim et al., 2006) y *TNFAIP1* se expresa de forma notable en el cerebro y se induce en las células endoteliales tras la exposición al factor de necrosis tumoral α (TNF α) y a la interleucina-6 (IL-6), dos de los principales mediadores proinflamatorios que se liberan durante la activación de la microglía en situaciones de daño neuronal (Liu et al., 2010; Tylutka et al., 2024). Aunque la microglía desempeña un papel protector esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema nervioso central, en la enfermedad de Alzheimer su activación prolongada contribuye al desarrollo de una neuropatología progresiva. En este contexto, la neuroinflamación constituye una de las características patológicas de la

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

enfermedad, impulsada por una respuesta inflamatoria exacerbada frente a la activación crónica de la microglía (Qin et al., 2023). En consonancia con esta hipótesis, el descenso significativo en la expresión de *ced-7* y *ZC239.12* observado en los nematodos CL4176 tratados con EC y Q 150 μ M (Figura 28) podría reflejar una atenuación de las vías asociadas a la activación microglial, lo que sugiere que **los flavonoides podrían contribuir a la reducción de la respuesta inflamatoria asociada a la patología de la EA.**

Además, la expresión relativa de ARNm de *gst-7* también se redujo significativamente en los nematodos cultivados con EC o Q en comparación con el grupo control (Figura 29). El gen *gst-7* de *C. elegans*, perteneciente a la familia de las glutatión S-transferasas (GSTs), codifica una enzima implicada en los mecanismos de defensa antioxidante y desintoxicación celular, contribuyendo al aumento de la resistencia frente al estrés oxidativo (Hartman et al., 2021). Dado que el estrés oxidativo constituye un importante estímulo para la activación de respuestas inflamatorias en el sistema nervioso, la regulación a la baja de *gst-7* podría reflejar una disminución del estado prooxidante y, de forma indirecta, una atenuación de las señales asociadas a procesos inflamatorios. Este gen ha sido descrito como ortólogo funcional de la prostaglandina D sintasa hematopoyética humana (HPGDS) (Alliance of Genome Resources, <https://www.alliancegenome.org/>), que en mamíferos se expresa en la microglía y su nivel aumenta progresivamente durante la activación de estas células en situaciones de daño cerebral, por lo que desempeña un papel relevante en la modulación de la respuesta inflamatoria (Liu et al., 2007).

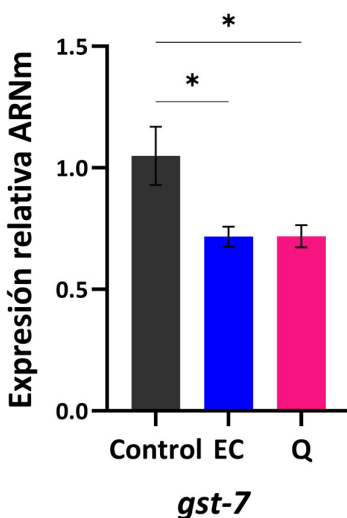


Figura 29: Niveles relativos de expresión de ARNm de *gst-7* en la cepa CL4176 de *C. elegans* cultivada en presencia o ausencia (control) de EC o Q (150 μ M). Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett, * $p < 0.05$.

En este contexto, la posible modulación de la activación microglial sugerida por la regulación a la baja de los genes *ced-7*, *ZC239.12* y *gst-7* observada en la cepa CL4176 de *C. elegans* (expresión de A β en células musculares) cultivada en presencia de EC o Q (Figuras 28-29), podría representar un mecanismo adicional de neuroprotección asociado a los compuestos fenólicos. De hecho, diversos estudios han demostrado que flavonoides administrados a animales modelo de la EA inhiben la activación de la microglía y reducen la liberación de citoquinas proinflamatorias en el cerebro (Hole & Williams, 2020). Asimismo, se ha observado que extractos de polifenoles de semillas de uva ricos en flavan-3-oles, entre ellos epicatequina,

eran capaces de reducir la acumulación de A β , atenuar la activación de la microglía y disminuir la inflamación cerebral en ratones transgénicos APPSwe/PS1dE9) (Wang et al., 2009). Del mismo modo, Sabogal-Guáqueta et al. (2015) observaron que la quercetina reducía la β -amiloidosis extracelular, la tauopatía y la microgliosis en el hipocampo y la amígdala de ratones envejecidos 3xTg-AD.

En conjunto, la identificación de genes implicados en la regulación de la autofagia y de la respuesta inflamatoria de la microglía en respuesta al tratamiento con flavonoides puede contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos que regulan la progresión de la EA y apoyar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la neuroinflamación.

c) Estrés oxidativo

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son subproductos inevitables del metabolismo celular que, en condiciones fisiológicas, participan en procesos de señalización redox y regulación homeostática. Sin embargo, su producción excesiva o una capacidad antioxidante insuficiente conducen al establecimiento de un estado de estrés oxidativo, caracterizado por el daño progresivo de macromoléculas celulares, incluidos lípidos, proteínas y ADN. En el sistema nervioso, las mitocondrias constituyen la principal fuente de ROS, puesto que la mayoría de estos radicales se generan como consecuencia del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones. El aumento sostenido de ROS mitocondriales activa vías de señalización redox que favorecen la expresión de mediadores proinflamatorios, generando una dinámica de potenciación mutua entre estrés oxidativo e inflamación. En el contexto de la EA, este entorno celular pro-oxidante y pro-inflamatorio se ha relacionado con la disfunción de los sistemas de proteostasis, promoviendo tanto la agregación de A β como la hiperfosforilación de la proteína Tau, procesos centrales en la progresión de la enfermedad (Birla et al., 2020; Ionescu-Tucker & Cotman, 2021).

Debido a que el estrés oxidativo es un factor importante en la progresión de la EA, se evaluó si el tratamiento de los nematodos CL4176 con EC o Q podría modular la expresión de genes implicados en la defensa frente a este tipo de estrés. Para ello, se analizaron por RT-qPCR los genes *hsp-70*, *daf-16*, *hsf-1* y *skn-1*. El gen *hsp-70*, ortólogo del gen humano *HSP70* y perteneciente a la familia de las proteínas de choque térmico, está involucrado en el plegamiento de las proteínas y en la activación de vías de señalización asociadas a la respuesta frente a estrés celular (Avila et al., 2016; Campanella et al., 2018). Por su parte, *daf-16* (FoxO), *hsf-1* (HSF1) y *skn-1* (Nrf2) son factores de transcripción regulados por la ruta de señalización de insulina (IIS, *Insulin/IGF-1 Signaling*), que presenta una elevada conservación funcional y evolutiva con la vía del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) en humanos. En *C. elegans*, dicha ruta está implicada en la respuesta a diferentes tipos de estrés, entre ellos, el estrés oxidativo (Altintas et al., 2016). En condiciones que reducen la actividad de la señalización de IIS se induce la translocación de estos factores de transcripción al núcleo, donde regulan la expresión de varios genes de defensa que contribuyen al aumento de la tolerancia celular al estrés (Papp et al., 2012; Singh & Aballay, 2006; Zečić & Braeckman, 2020).

En este estudio, se observó un descenso significativo de la expresión de ARNm del gen *hsp-70* en el grupo de nematodos tratados con EC, en comparación con el control, mientras que no se detectaron cambios en el grupo cultivado con Q (Figura 30). Este patrón diferencial sugiere

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la existencia de mecanismos de acción específicos para cada flavonoide. La regulación a la baja de *hsp-70* inducida por EC podría interpretarse como indicativa de una menor activación de las respuestas celulares frente al estrés oxidativo asociado a A β , más que como una inhibición directa de las vías de defensa, lo que sería compatible con un efecto protector frente a este tipo de daño. Esta observación coincide con lo señalado en estudios previos en ratas con EA (Cheng et al., 2020), en los que la expresión de la proteína HSP70 se redujo significativamente tras la administración de flavonoides de *Scutellaria barbata*, acompañada de una mejora en la función neuronal y en el rendimiento cognitivo.

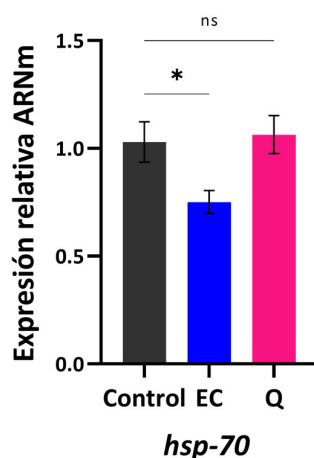


Figura 30: Nivel relativo de expresión de ARNm del gen *hsp-70* en la cepa CL4176 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y presencia de EC o Q (150 μ M). Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple, ns = no significativo, * $p < 0.05$.

Por otro lado, en el presente estudio se observó una reducción significativa en la expresión de *skn-1* tras el tratamiento con ambos flavonoides, mientras que no se detectaron cambios en la expresión génica de *daf-16* ni de *hsf-1* (Figura 31). Estos resultados contrastan con observaciones previas en la cepa silvestre N2, donde el tratamiento con EC o Q incrementó la supervivencia frente al estrés térmico y, en el caso de EC, se asoció con un aumento en la expresión de *hsf-1* y *skn-1*, sin observarse cambios significativos en el grupo tratado con Q. En ambos casos, la respuesta adaptativa al estrés parecía ser independiente de *daf-16* (Ayuda-Durán et al., 2019b, 2019c). Estas diferencias ponen de manifiesto que la activación de las vías clásicas de respuesta al estrés mediadas por *daf-16*, *hsf-1* y *skn-1* depende de manera crítica del contexto fisiopatológico, de modo que los mecanismos implicados en la tolerancia al estrés térmico en nematodos sanos no son necesariamente los mismos que operan frente a la toxicidad inducida por A β en el mutante CL4176. En este sentido, la ausencia de cambios en *daf-16* y *hsf-1* sugiere que los efectos neuroprotectores de EC y Q en esta cepa no dependen primariamente de la activación de la vía IIS. En cambio, la disminución en la expresión del gen *skn-1* en respuesta a los flavonoides (Figura 31) podría interpretarse como un reflejo indirecto de un menor estrés celular, compatible con una menor acumulación de A β . Esta hipótesis resulta coherente con la activación de la autofagia mediada por chaperonas (CMA) sugerida por el notable incremento de la expresión de *Imp-2* (Figura 26), ya que se ha descrito que la CMA cumple un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular a través de múltiples mecanismos, entre ellos, la atenuación del estrés oxidativo mediante la eliminación selectiva de proteínas dañadas o mal plegadas (Kiffin et al., 2004).

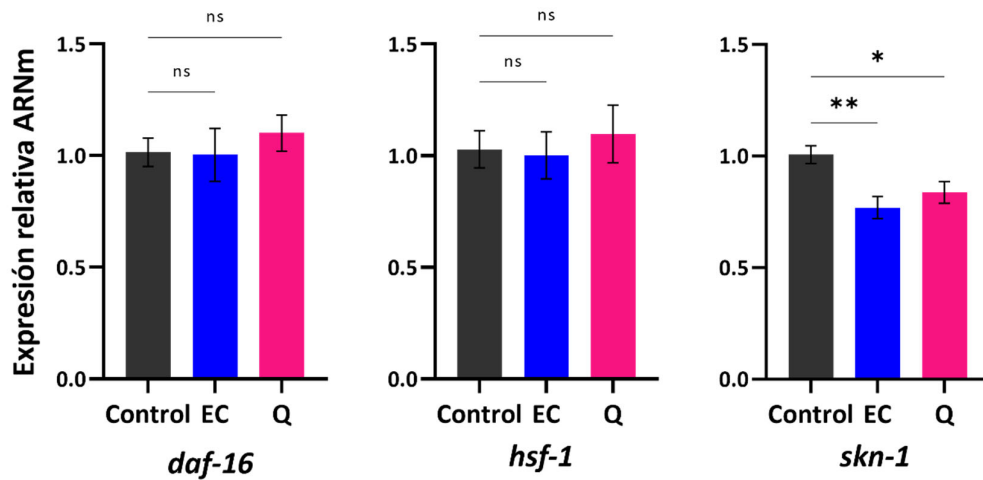


Figura 31: Niveles relativos de expresión de ARNm de los genes *daf-16*, *hsf-1* y *skn-1*, relacionados con la respuesta frente al estrés oxidativo, en la cepa CL4176 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y presencia de EC o Q (150 μ M). Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de ocho experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Puesto que el estrés oxidativo y la inflamación desempeñan un papel clave en la progresión de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, **los resultados obtenidos sugieren que los flavonoides EC y Q podrían ejercer un efecto neuroprotector mediante la modulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés y los mecanismos celulares de control de ROS, contribuyendo así a la atenuación del daño neuronal asociado a procesos oxidativos e inflamatorios.**

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.2 Efectos y mecanismos de neuroprotección de compuestos fenólicos frente a la toxicidad de la proteína Tau hiperfosforilada en *C. elegans*

4.2.1 Efectos de EC y Q sobre la esperanza y calidad de vida en el modelo p-Tau

Para ampliar el alcance de las observaciones realizadas en el modelo de A β (cepa CL4176), se realizaron ensayos en la cepa BR5270 de *C. elegans*, que expresa el fragmento pro-agregante F3 Δ K280 de la proteína Tau humana (Fatouros et al., 2012). Inicialmente, se estudió la influencia sobre la esperanza de vida de BR5270 del tratamiento de los nematodos con EC y Q desde la fase de huevo hasta la edad adulta. Los ensayos se realizaron utilizando una concentración de 150 μ M para ambos compuestos, seleccionada basándose en los resultados obtenidos en el modelo de A β (Figuras 22 y 23).

Como se puede observar en la Figura 32A y Tabla 6, el tratamiento de la cepa BR5270 con EC o Q aumentó la vida media en un 10.60 % y un 10.43 % respectivamente, en comparación con el grupo no tratado (control). Asimismo, ambos flavonoides extendieron significativamente la vida máxima de los nematodos (definida como el 10 % de individuos más longevos de cada población) de 21.50 días en el grupo control (DMSO 0.1 %) a 24.29 días en el caso de EC y 24.50 días en el de Q (Figura 32B). Un aumento en la longevidad de la cepa BR5270 fue también encontrado por Zhang et al. (2022) en ensayos realizados con ginsenósidos (saponósidos triterpénicos) de *Panax ginseng*, planta utilizada en la medicina tradicional china. Sin embargo, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se habían descrito mejoras en la duración de vida tras la administración de compuestos fenólicos en modelos específicos de tauopatía. Por tanto, los resultados del presente estudio sugieren que EC y Q podrían constituir una aproximación novedosa para atenuar los efectos de la acumulación de p-Tau mediante compuestos bioactivos, en línea con los efectos neuroprotectores observados en el modelo de A β previamente descritos.

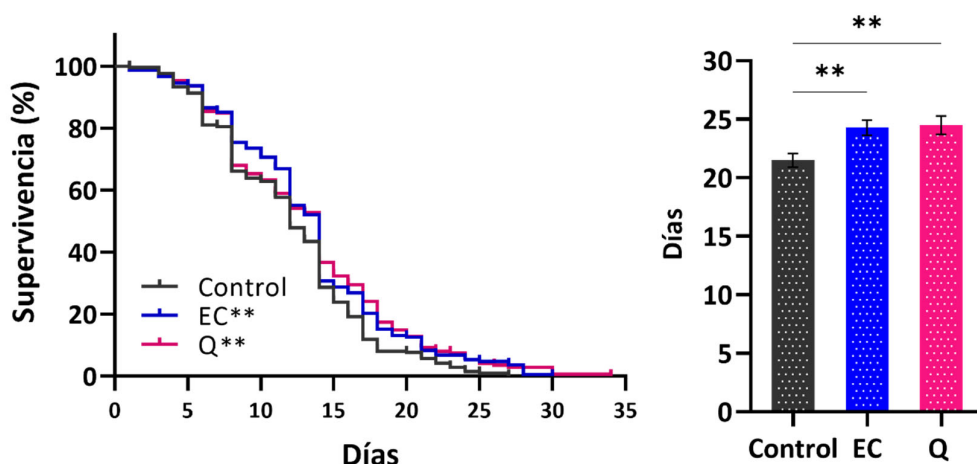


Figura 32: (A) Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de los nematodos BR5270 cultivados en presencia o ausencia (control) de EC o Q 150 μ M analizada mediante la prueba de rangos logarítmicos (log-rank test) (n $\approx$ 350 por condición). (B) Vida media máxima (10 % de los individuos más longevos de cada población) analizada por ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples Dunnett. Los datos representan la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes, **p < 0.01.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6: Influencia de EC y Q sobre la esperanza de vida de *C. elegans* BR5270. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Las diferencias se consideraron significativas a $p < 0.05$.

Tratamiento (BR5270 modelo p-Tau)	Media (días)	p vs Control (log Rank)	Vida máxima (días)	p vs Control (ANOVA)
Control	12.08 $\pm$ 0.35		21.50 $\pm$ 0.58	
EC	13.36 $\pm$ 0.40	0.008	24.29 $\pm$ 0.65	0.005
Q	13.34 $\pm$ 0.43	0.006	24.50 $\pm$ 0.78	0.007

Además de la influencia sobre la longevidad, se evaluó el efecto de EC y Q sobre la función neuronal de los nematodos BR5270 mediante el análisis de la respuesta quimiotáctica hacia compuestos volátiles (alcohol isoamílico, AI; odorante atrayente), utilizando etanol (EtOH) como estímulo neutro. Como control negativo del deterioro funcional asociado a la agregación proteica se utilizó la cepa BR5271, que expresa una forma no agregante de Tau. Como se esperaba, los nematodos BR5270 pro-agregantes mostraron una reducción en el índice de quimiotaxis (aproximadamente un 53 %) en comparación con la cepa anti-agregante (BR5271) (Figura 33), lo que confirma que la acumulación de p-TAU conlleva un deterioro significativo de la función neuronal. Sin embargo, el tratamiento de BR5270 con EC o Q (150 μ M) produjo una mejora significativa del índice de quimiotaxis, del 24.89 % y 27.51 %, respectivamente, en comparación con los individuos no tratados (DMSO 0.1 %, control positivo) (Figura 33). Este resultado parece indicar que ambos flavonoides son capaces de atenuar el deterioro funcional inducido por la agregación de p-Tau, restaurando parcialmente la capacidad de los nematodos para procesar e integrar señales olfativas. Este patrón de mejora funcional es coherente con los efectos previamente observados en el modelo de A β (cepa CL2355), en el que EC y Q también aumentaron de forma significativa la percepción olfativa de los nematodos (Figura 25).

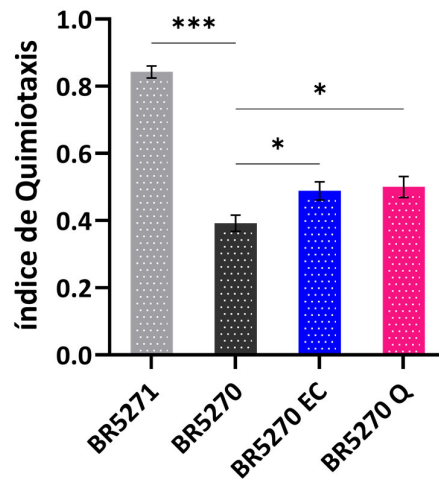


Figura 33: Efecto de EC o Q 150 μ M sobre la respuesta quimiotáctica de los nematodos BR5270 que expresan p-Tau hacia el AI (odorante). Los controles anti-agregante (BR5271) y pro-agregante (BR5270) se cultivaron en presencia de DMSO 0.1 % (vehículo). Índice de Quimiotaxis representado por barras como la media $\pm$ SEM de cinco experimentos independientes analizada por ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n \approx 650$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó también la influencia del tratamiento con EC o Q 150 μ M sobre la capacidad locomotora de la cepa BR5270 mediante el recuento individual del número de flexiones corporales en intervalos de 30 segundos. La Figura 34 muestra los resultados obtenidos en diferentes fases del envejecimiento: jóvenes (día 1 de adulto), mediana edad (días 3 y 5 de adulto) y edad avanzada (días 8 y 11 de adulto). Se puede comprobar que la disminución progresiva de la movilidad asociada al envejecimiento (como se pone de manifiesto en los individuos del grupo control) se vio significativamente atenuada en los nematodos tratados, existiendo una mejora significativa en la locomoción de los nematodos a partir del tercer día de adulto. Este resultado sugiere que la prolongación de la longevidad mediada por los flavonoides también podría estar acompañada por una mejora funcional, contribuyendo no solo a una mayor supervivencia, sino también a una mejor calidad de vida. Estos resultados son coherentes con estudios previos llevados a cabo por otros autores utilizando un modelo de tauopatía similar (cepa BR5706), en los que se ha descrito una mejora significativa de función motora de los nematodos tras el tratamiento con extractos vegetales ricos en compuestos fenólicos, como extracto de caléndula mexicana (*Tagetes erecta*) y extracto de hoja de olivo enriquecido en oleuropeína (Rivas-García et al., 2024; Romero-Márquez et al., 2022).

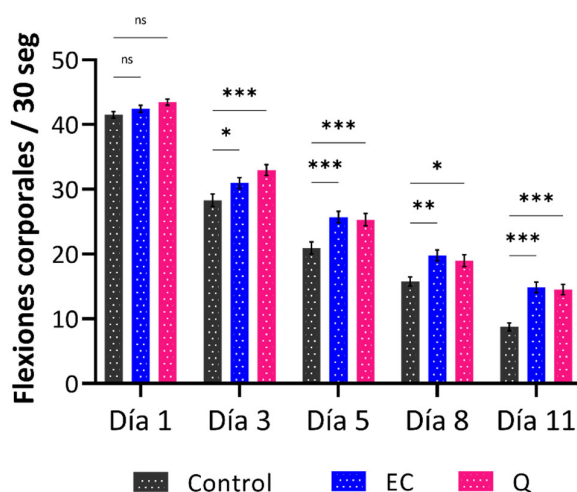


Figura 34: Representación de la media del número de flexiones corporales a diferentes edades de nematodos BR5270 tratados con EC o Q 150 μ M. Datos representados como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes analizados mediante la prueba de ANOVA de dos vías y comparaciones múltiples Dunnett, ns = no significativo, ** p < 0.01 y *** p < 0.001, $n \approx 60$.

En síntesis, los resultados obtenidos apuntan a EC y Q como posibles compuestos bioactivos que podrían mitigar la toxicidad funcional asociada a la acumulación de p-Tau, produciendo una mejora tanto de la longevidad como del rendimiento motor en la cepa BR5270 de *C. elegans*. Estas observaciones están en concordancia con estudios realizados por otros investigadores en modelos murinos de tauopatía, en los que se observó una reducción de los filamentos helicoidales pareados de proteína Tau, utilizados como marcadores patológicos de la EA, en ratones triple transgénicos (3xTg-AD) tratados con quercetina y un descenso en los niveles relativos de proteína p-Tau en el hipocampo de ratones C57BL6 de edad avanzada tratados con epicatequina (Navarrete-Yañez et al., 2020; Sabogal-Guáqueta et al., 2015). No obstante, la evidencia disponible sobre el uso de compuestos fenólicos en modelos experimentales de tauopatía aún son escasos, lo que pone de relieve la necesidad de ampliar la investigación para evaluar su potencial como moléculas protectoras frente al deterioro cognitivo asociado a la acumulación de p-Tau en las neuronas.

4.2.2 Análisis de la expresión de genes asociados a la patología p-Tau

Para comprender mejor los mecanismos moleculares que subyacen a la mejora de la esperanza de vida observada tras el tratamiento con EC y Q en el modelo de tauopatía, se analizó la expresión de un conjunto de genes potencialmente implicados en la modulación de la proteotoxicidad asociada a la acumulación de p-Tau. Con este objetivo, se seleccionaron genes relacionados con procesos clave de mantenimiento de la homeostasis celular, incluyendo la mitofagia, la autofagia, la apoptosis, la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), el estrés oxidativo, así como con la regulación de Tau y la síntesis de tubulina, mecanismos estrechamente asociados a la patogénesis de la EA (Ghavami et al., 2014; Mamun et al., 2020; Miyasaka et al., 2018). Los análisis de expresión génica se realizaron en nematodos de 3 días de edad, dado que en este estadio se producía ya un retraso significativo en la disminución de la movilidad asociada al envejecimiento en los nematodos tratados con ambos flavonoides, por lo que este momento podía ser una ventana temporal adecuada para la identificación de los procesos moleculares vinculados a sus efectos neuroprotectores (Figura 34).

a) *Mitofagia, autofagia y apoptosis*

Como se describió anteriormente, la autofagia desempeña un papel esencial en la degradación y eliminación de componentes celulares dañados, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular. La mitofagia, por su parte, se considera una forma especializada de autofagia encargada de la eliminación selectiva de mitocondrias disfuncionales, lo que contribuye, entre otros efectos, a prevenir la acumulación de ROS. Diversos estudios han señalado que la disfunción de los sistemas de autofagia y la mitofagia se asocian estrechamente con el desarrollo de la EA, al comprometer la capacidad celular para eliminar proteínas disfuncionales como la Tau hiperfosforilada (p-Tau), favoreciendo así su acumulación progresiva (Hou et al., 2021; Liu et al., 2022; Reddy & Oliver, 2019). Además, la acumulación de p-Tau se ha relacionado con una desregulación de las vías de muerte celular programada, incluyendo la apoptosis, así como con la activación de procesos alternativos de muerte celular, como la necroptosis, frecuentemente acompañados de respuestas inflamatorias, lo que contribuye al daño y a la muerte neuronal en la EA (Dong et al., 2022; Walia et al., 2021). Por ello, la modulación de las rutas moleculares implicadas en estos procesos podría ser una estrategia para mitigar los efectos de la tauopatía.

En este estudio se observó que tanto el flavan-3-ol EC como el flavonol Q se asociaron con una modulación de las vías implicadas en los procesos de eliminación de orgánulos dañados. En concreto, se detectó un aumento significativo en los niveles de expresión de genes relacionados con la mitofagia (*pdr-1* y *pink-1*) y la autofagia (*epg-8*), acompañado de una disminución en la expresión de genes vinculados a la respuesta a proteínas mal plegadas (*hsp-70*, *xbp-1* y *rpn-6.1*), mientras que no se observaron cambios significativos en los genes *ced-7* y *ced-13* relacionados con la apoptosis.

Específicamente, se encontró una sobreexpresión de *pink-1* en los nematodos tratados con Q y de *pdr-1* en el grupo tratado con EC (Figura 35), lo que sugiere la activación diferencial de los mecanismos de control mitocondrial en función del flavonoide administrado. Tanto *pink-1* (ortólogo de PINK1 humano) como *pdr-1* (ortólogo de la proteína ligasa ubiquitina Parkin RBR E3 humana) son reguladores centrales de la mitofagia, responsables de promover la eliminación selectiva de mitocondrias dañadas (Yang et al., 2020). La mitofagia mediada por la ubiquitinación

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dependiente de PINK1/Parkin constituye un proceso esencial para la homeostasis mitocondrial, y su deterioro se ha relacionado con la disfunción sináptica y la progresión de la enfermedad de Alzheimer. En condiciones de estrés, PINK1 se autofosforila y se estabiliza en la membrana mitocondrial externa, donde fosforila y activa a Parkin, desencadenando la ubiquitinación de proteínas mitocondriales. Estas señales de ubiquitina fosforilada son reconocidas por los receptores de autofagia, a través de la unión a LC3, facilitando así el secuestro de las mitocondrias dañadas en autofagosomas para su posterior degradación lisosomal (Dong et al., 2023).

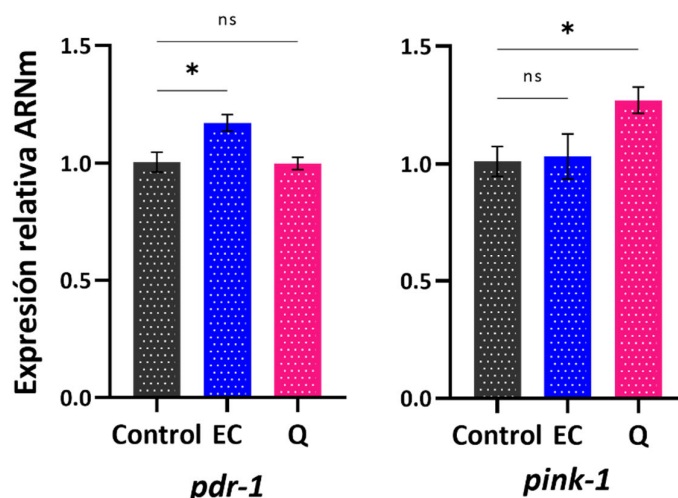


Figura 35: Efectos de EC y Q (150 μ M) en los niveles relativos de ARNm de los genes *pink-1* y *pdr-1* en *C. elegans* BR5270. Los análisis se llevaron a cabo mediante RT-qPCR utilizando *act-1* control interno. Los datos están representados como media $\pm$ SEM de seis experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, * $p < 0.05$.

En este contexto, resulta relevante que estudios previos en modelos de tauopatía, tanto en nematodos como en roedores, hayan identificado la mitofagia como un mecanismo molecular subyacente a los efectos neuroprotectores de determinados flavonoides. Así, Xie et al. (2022) demostraron que el kaempferol, un flavonol presente en alimentos como té, brócoli o col rizada, ejercía un efecto anti-Alzheimer mediado, al menos en parte, por la activación de la mitofagia. Estos resultados refuerzan la idea de que la modulación de esta vía podría contribuir a restaurar los procesos mitofágicos defectuosos que impulsan las patologías asociadas a Tau y la progresión de la EA, por tanto, **el avance en la investigación sobre compuestos bioactivos como inductores de mitofagia, podría tener implicaciones positivas para la salud cerebral.**

En coherencia con lo observado para los genes relacionados con la mitofagia (Figura 35), también se detectó una sobreexpresión del gen *epg-8* (Figura 36) en los nematodos tratados con ambos flavonoides, aunque el incremento fue estadísticamente significativo únicamente en el tratamiento con quercetina ($p < 0.05$). En *C. elegans*, *epg-8* desempeña un papel esencial en la vía de la autofagia, contribuyendo al sistema de control de calidad celular encargado de eliminar proteínas propensas a agregarse (Yang & Zhang, 2011). Como se ha señalado anteriormente en la discusión de los ensayos realizados en la cepa CL4176, *epg-8* es homólogo del gen humano *ATG14*, implicado en la biogénesis de los autofagosomas que engullen

componentes citoplasmáticos dañados. Por el contrario, no se observaron diferencias en la expresión del gen *Imp-2* (Figura 36), relacionado con el proceso de la autofagia mediada por chaperonas (CMA), donde se produce la translocación de proteínas defectuosas directamente al lisosoma para su eliminación sin la formación de autofagosomas (Eisermann et al., 2017; Kaushik & Cuervo, 2018). La ausencia de cambios en la expresión de *Imp-2* entre los nematodos tratados y no tratados parece indicar que, a diferencia de lo que se observó la cepa CL4176 (modelo A β), en el modelo p-Tau es necesaria la formación de los autofagosomas para eliminar las mitocondrias disfuncionales, como podría sugerir el aumento en la expresión de *epg-8*.

Varios estudios han indicado que *ATG14* es esencial en la mitofagia mediada por *PINK1/Parkin*, ya que su pérdida bloquea la activación del complejo PI3K y se producen fallos en la formación del autofagosoma que reclutaría a la mitocondria defectuosa (Burman & Ktistakis, 2010; Nguyen et al., 2023). En estudios en modelos neuronales sometidos a estrés oxidativo inducido por CuSO₄, se observó que el tratamiento con quercetina era capaz de activar rutas de señalización dependientes de PI3K asociadas a la supervivencia celular, reduciendo la producción de ROS y mejorando la viabilidad neuronal (Zubčić et al., 2020). De este modo, la transducción de señales a través del complejo PI3K podría representar una posible diana terapéutica en la protección neuronal, sobre la que podría actuar la quercetina. No obstante, los propios autores señalan que sería necesarios estudios más detallados, ya que este flavonoide podría también actuar como pro-oxidante dependiendo de la dosis y la extensión del daño neuronal existente.

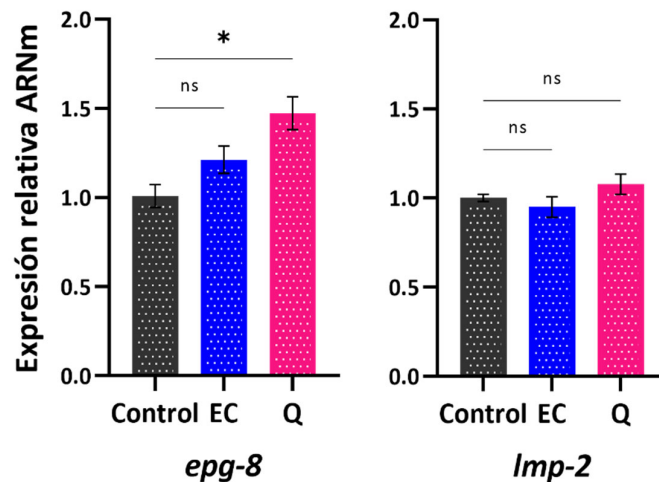


Figura 36: Efectos de EC y Q (150 μ M) en los niveles relativos de ARNm de los genes *epg-8* y *Imp-2* en *C. elegans* BR5270. Los análisis se llevaron a cabo mediante RT-qPCR utilizando *act-1* control interno. Los datos están representados como media $\pm$ SEM de cuatro experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, * $p < 0.05$.

De acuerdo con la literatura y con los resultados obtenidos en esta tesis, el aumento de expresión tanto de *pink-1* como de *epg-8* en los nematodos tratados con Q sugiere el potencial de este flavonol para modular las vías de la autofagia y mitofagia en el modelo de tauopatía. Sin embargo, en el modelo A β CL4176 no se observaron cambios significativos en la expresión de *epg-8* tras el tratamiento con quercetina, mientras que se detectó una reducción significativa tras la exposición a epicatequina (Figura 27). Estas diferencias entre modelos sugieren la utilización de vías degradativas específicas en función de la proteotoxicidad presente. En los

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nematodos expuestos a A β y tratados con flavonoides, la eliminación de proteínas mal plegadas parece realizarse predominantemente mediante rutas de degradación dependientes de chaperonas (gen *Imp-2*) (Figura 26), funcionalmente análogas a la autofagia mediada por chaperonas descrita en mamíferos. En contraste, en presencia de p-Tau se activarían preferentemente la autofagia dependiente de la mitofagia y *epg-8* (Figuras 35-36), constituyendo un mecanismo de defensa adaptativo. En conjunto, estos hallazgos subrayan que la respuesta autofágica frente a la proteotoxicidad no es uniforme, sino que se modula en función del contexto patológico y de las rutas celulares disponibles para preservar la homeostasis.

En definitiva, **la sobreexpresión de *pink-1*, *pdr-1* y *epg-8* observada tras el tratamiento con quercetina o epicatequina en el modelo de *C. elegans* que expresa p-Tau sugiere una estimulación de los procesos de mitofagia y autofagia, lo que podría contribuir a mantener la capacidad funcional de estas vías degradativas.** Esta activación constituiría una de las posibles bases moleculares que subyacen a las mejoras producidas por estos flavonoides en la longevidad, respuesta quimiotáctica de los nematodos y movilidad (Figuras 32-34).

A diferencia de los cambios encontrados en las vías de mitofagia y autofagia, no se detectaron modificaciones significativas en la expresión de los genes relacionados con la apoptosis, *ced-7* y *ced-13*, en los nematodos tratados con EC o Q (Figura 37). El gen *ced-13* ha sido descrito como un promotor de la apoptosis en *C. elegans* (Schumacher et al., 2005), cuya expresión se activa a través de la cascada mediada por *cep-1* (homólogo del gen p53 en mamíferos), especialmente en condiciones de daño en el ADN (Fairlie et al., 2005; Hofmann et al., 2002). Por su parte, *ced-7* codifica un transportador ABC (ATP-binding cassette, ABC) implicado en el reconocimiento y la eliminación de células apoptóticas por el receptor fagocítico *ced-1*, promoviendo la generación de vesículas extracelulares de fosfatidilserina (PS) en la membrana (Mapes et al., 2012). Sin embargo, la evidencia disponible sugiere que la apoptosis no constituye el principal mecanismo de muerte celular en las patologías asociadas a la acumulación de proteína Tau hiperfosforilada, en las que predominan procesos de disfunción sináptica y alteraciones progresivas de la homeostasis neuronal (Allen et al., 2002; Tolkovsky & Spillantini, 2021). De este modo, la ausencia de cambios significativos en la expresión de genes apoptóticos tras el tratamiento con EC o Q en el modelo de tauopatía reflejaría la escasa contribución de esta vía al daño neuronal en este contexto específico. No obstante, diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de los flavonoides como moduladores de la apoptosis en otros escenarios patológicos, incluyendo modelos de enfermedades neurodegenerativas y cáncer, donde estos compuestos pueden intervenir tanto en la activación como en la inhibición de la muerte celular programada (Calderaro et al., 2022; D'Arcy, 2022). De hecho, los resultados obtenidos en la cepa CL4176 de *C. elegans*, discutidos anteriormente, mostraron una disminución significativa de la expresión de *ced-7* en los nematodos tratados con ambos flavonoides (EC o Q 150 μ M) (Figura 28), lo que sugiere que este tipo de compuestos podría ejercer efectos diferenciales sobre la vía apoptótica en función del tipo de proteopatía. En este sentido, Sierksma et al. (2020) mostraron que la respuesta transcripcional asociada a las vías de muerte celular difiere de manera sustancial entre modelos de patología A β y p-Tau, lo que sería coherente con los resultados obtenidos en el presente estudio.

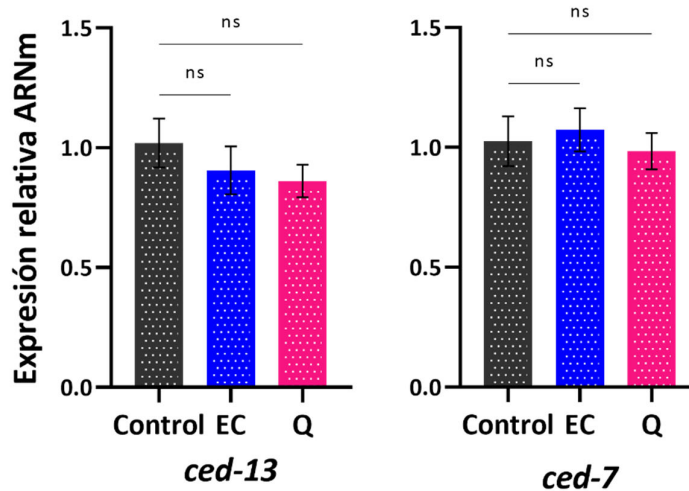


Figura 37: Efectos de EC y Q (150 μ M) en los niveles relativos de ARNm de los genes *ced-13* y *ced-7* en *C. elegans* BR5270. Los análisis se llevaron a cabo mediante RT-qPCR utilizando *act-1* control interno. Los datos están representados como media $\pm$ SEM de cuatro-seis experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo.

b) Respuesta a proteínas mal plegadas y estrés oxidativo

El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo especializado en la regulación de la homeostasis de las proteínas, incluyendo su plegamiento y ensamblaje. Sin embargo, cuando esta homeostasis se ve alterada como consecuencia, por ejemplo, de una autofagia deficiente, una degradación proteasomal ineficaz o un aumento sostenido de especies reactivas del oxígeno (ROS), se produce la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE, activando la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Esta respuesta adaptativa tiene como objetivo restaurar la homeostasis mediante mecanismos que incluyen la reducción de la carga proteica, la inducción de chaperonas y la activación de vías de degradación. Entre sus mediadores centrales se encuentra el factor de transcripción XBP1, cuya activación favorece tanto la capacidad de plegamiento proteico como la eliminación de proteínas aberrantes (Wang & Kaufman, 2016).

En el presente estudio, se observó una disminución significativa de la expresión de los genes asociados a la UPR (*hsp-70*, *xbp-1* y *rpn-6.1*) en los nematodos tratados con EC o Q (Figura 38). Dado que la UPR y la autofagia actúan de forma coordinada en el mantenimiento de la proteostasis (Milisav et al., 2015), la regulación a la baja de *hsp-70*, *xbp-1* y *rpn-6.1* podría interpretarse como un reflejo indirecto de una menor presión proteotóxica, posiblemente asociada a la activación de las vías de mitofagia y autofagia observada en este estudio (Figuras 35 y 36). En este contexto, la reducción de la expresión de genes de la UPR no indicaría una disfunción de esta vía, sino más bien una menor necesidad de su activación debido a una carga reducida de proteínas dañadas o mal plegadas (Hetz & Mollereau, 2014).

Las chaperonas de la familia HSP70 desempeñan un papel central en el sistema de control de calidad de la célula, al identificar proteínas clientes durante su síntesis y facilitar su correcto plegamiento o, en caso necesario, dirigir las hacia rutas de degradación (Lackie et al., 2017). La disminución significativa del nivel relativo de ARNm de *hsp-70* observada en los

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

nematodos tratados con los flavonoides en comparación con el grupo de control, podría, por tanto, ser consistente con una reducción en la formación de agregados de p-Tau (Figura 38). Esta interpretación se ve reforzada por la observación de un efecto similar en el modelo de A β (cepa CL4176), en el que el tratamiento con EC también condujo a una reducción significativa en la expresión de *hsp-70* (Figura 30).

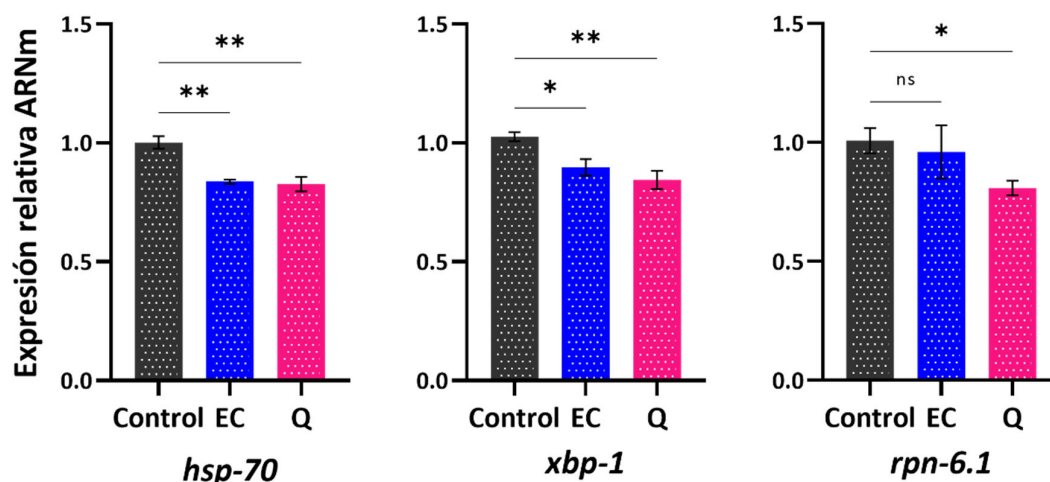


Figura 38: Efectos de EC y Q (150 μ M) en los niveles relativos de ARNm de los genes *hsp-70*, *xbp-1* y *rpn-6.1* en *C. elegans* BR5270. Los análisis se llevaron a cabo mediante RT-qPCR utilizando *act-1* control interno. Los datos están representados como media $\pm$ SEM de seis experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de un análisis de comparación múltiple Dunnett, ** $p < 0.01$.

Un razonamiento similar puede aplicarse a los genes *xbp-1* y *rpn-6.1* (Figura 38). El gen *xbp-1* se ha descrito como uno de los principales factores de transcripción en la activación de la UPR (Waldherr et al., 2019), mientras que *rpn-6.1* es un componente clave en la activación y estabilización del proteasoma en *C. elegans* (Vilchez et al., 2012). Ambos genes han sido identificados como genes diana en *C. elegans* para corregir las deficiencias en la homeostasis proteica característica de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Vilchez et al., 2012; Waldherr et al., 2019). En este sentido, la observación de niveles relativos de ARNm de *hsp-70*, *xbp-1* y *rpn-6.1* más bajos en los grupos de nematodos tratados con flavonoides, podría indicar que EC y Q contribuyen a aliviar la toxicidad asociada a la hiperfosforilación y posterior acumulación de p-Tau, aunque serían necesarios estudios adicionales para confirmar este efecto. De forma coherente con esta interpretación, análisis complementarios mostraron una sobreexpresión de los genes relacionados con la UPR en el modelo de tauopatía BR5270 en comparación con la cepa silvestre N2, lo que sugiere que el tratamiento con EC o Q podría tender a restaurar niveles de expresión más cercanos a condiciones no patológicas (Figura 39).

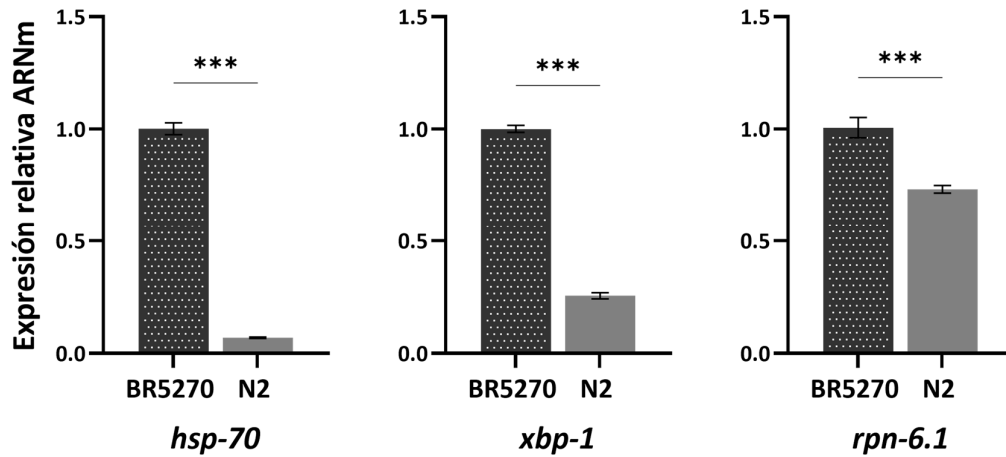


Figura 39: Niveles relativos de ARNm de los genes relacionados con la respuesta a proteínas desplegadas (*hsp-70*, *xbp-1* y *rpn-6.1*) en el modelo de tauopatía BR5270 de *C. elegans* y la cepa silvestre N2. Los análisis se llevaron a cabo mediante RT-qPCR utilizando *act-1* control interno. Los datos están representados como media $\pm$ SEM de seis experimentos independientes analizados mediante la prueba *t* no pareada con corrección de Welch, *** $p < 0.001$.

En relación con el estrés oxidativo, se analizó la expresión de los genes *daf-16*, *hsf-1* y *skn-1*, principales reguladores de la respuesta antioxidante en *C. elegans*. La acumulación de ROS se ha asociado a una alteración de la función normal de Tau, favoreciendo su fosforilación anormal y reduciendo de esta manera su capacidad para unirse a los microtúbulos, lo que conduce a la despolimerización de los mismos y a la interrupción de las señales nerviosas (Bai et al., 2022). De manera similar a lo observado en el modelo A β (cepa CL4176) (Figura 31), en la cepa BR5270 no se observaron cambios significativos en la expresión génica de *daf-16* y *hsf-1*, mientras que sí se detectó una regulación a la baja del gen *skn-1* en los grupos de nematodos tratados con EC o Q en comparación con el grupo no tratado (control) (Figura 40).

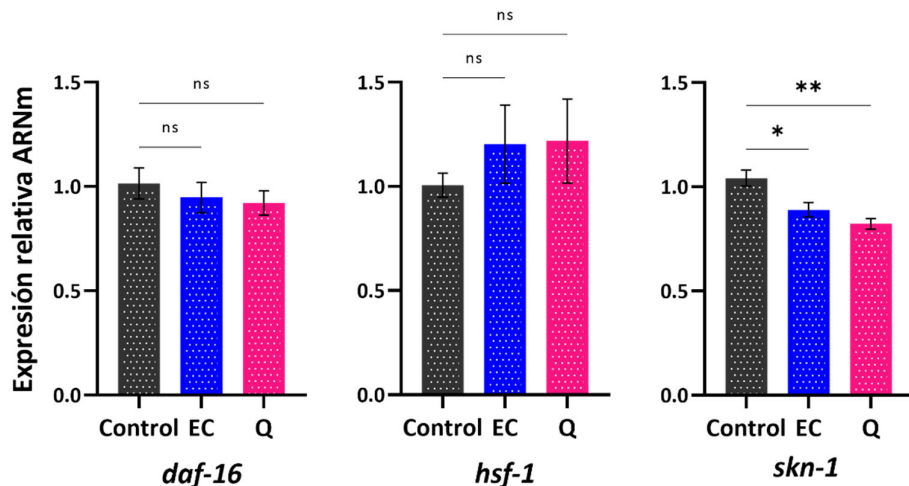


Figura 40: Niveles relativos de expresión de ARNm de los genes *daf-16*, *hsf-1* y *skn-1*, relacionados con la respuesta frente al estrés oxidativo, en la cepa BR5270 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y presencia de EC o Q (150 μ M). Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de seis experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El descenso de la expresión relativa de *skn-1* podría interpretarse como un indicador indirecto de una menor activación de respuestas antioxidantes, compatible con una reducción del estrés oxidativo celular asociado a una menor acumulación de p-Tau en los nematodos tratados con EC o Q, como también sugieren los cambios en la expresión génica de los genes asociados a la UPR (Figura 38). Por otra parte, estos resultados son también coherentes con el incremento en la expresión de los genes relacionados con la mitofagia, ya que se ha descrito que una mitofagia eficiente contribuye a la reducción del estrés oxidativo al limitar la acumulación de p-Tau y mitocondrias disfuncionales y, con ello, la producción excesiva de ROS. En este sentido, Palikatas et al. (2015) revelaron que una mitofagia defectuosa desencadena de manera compensatoria la señalización mitocondrial mediada por SKN-1 provocando, de esta manera, un ciclo de retroalimentación homeostática que coordina la biogénesis y el recambio mitocondrial. Sin embargo, la disociación de estos dos procesos durante el envejecimiento contribuye a la proliferación de mitocondrias dañadas y al deterioro de la función celular. Por tanto, la estimulación de la mitofagia inducida por EC y Q podría reducir la necesidad de esta respuesta adaptativa, explicando la menor expresión observada de *skn-1* en los nematodos tratados.

En resumen, los resultados obtenidos sugieren que **los flavonoides EC y Q podrían modular de forma integrada las vías de proteostasis y defensa frente al estrés oxidativo**, contribuyendo a crear un entorno celular menos propicio para la acumulación de proteínas mal plegadas y el daño oxidativo, dos procesos estrechamente implicados en la progresión de las tauopatías y otras enfermedades neurodegenerativas.

c) Síntesis de tubulina y supresión de Tau

La síntesis de tubulina es un proceso esencial para el ensamblaje adecuado de los microtúbulos que conforman el esqueleto estructural de las neuronas y garantizan el transporte axonal y la estabilidad sináptica. Los microtúbulos están compuestos por heterodímeros de α - y β -tubulina, cuya dinámica de polimerización y despolimerización está finamente regulada. En pacientes con EA se ha descrito una disminución significativa de la capacidad de unión de Tau a la tubulina, asociada a la hiperfosforilación de Tau (Iqbal et al., 2009). En este contexto, la acumulación de Tau hiperfosforilada no solo constituye un marcador patológico, sino que actúa como un factor activo en la desestabilización del citoesqueleto neuronal, interfiriendo en la correcta polimerización de la tubulina y comprometiendo la estabilidad de los microtúbulos al favorecer su desorganización estructural. Estudios recientes han demostrado que la pérdida de función de la chaperona E específica de la tubulina (TBCE) en neuronas de mamíferos induce una reducción de los niveles de tubulina correctamente plegada y una acumulación de Tau hiperfosforilada, lo que sugiere que la alteración de los mecanismos homeostáticos responsables de la biosíntesis y el plegamiento de la tubulina pueden contribuir a la patogénesis asociada a p-Tau (Fujiwara et al., 2020).

En la presente investigación, el grupo de nematodos tratados con EC exhibió un aumento significativo de los niveles de expresión de ARNm de *tcbe-1* (Figura 41), homólogo del cofactor E humano de plegamiento de la tubulina, necesario para la síntesis *de novo* de α -tubulina (Nithianantham et al., 2015). Esta observación concuerda con los resultados de Esser et al. (2018), quienes, en un ensayo doble ciego controlado con placebo, demostraron que la suplementación con EC en humanos aumentaba la expresión de conjuntos de genes implicados en la transcripción y el plegamiento de la tubulina. Además, Miyasaka et al. (2018) demostraron que el silenciamiento de *tbce-1* mediante ARNi intensificaba la disfunción neuronal inducida por p-Tau reduciendo la expresión de α -tubulina en un modelo de tauopatía de *C. elegans*.

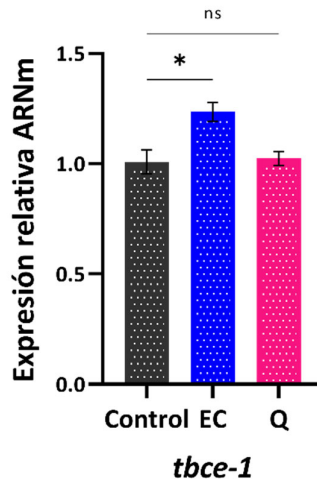


Figura 41: Niveles relativos de expresión de ARNm del gen *tbce-1* en la cepa BR5270 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y presencia de EC o Q (150 μ M). Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de seis experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo, * $p < 0.05$.

Por otra parte, recientemente, se ha descrito una relación funcional entre la integridad de los microtúbulos y la eficiencia de los procesos mitofágicos, sugiriendo que la alteración de la tubulina puede comprometer la eliminación selectiva de mitocondrias disfuncionales. Es decir, más allá de su función estructural, la α -tubulina desempeña un papel crucial en la fisiología neuronal al regular tanto el ensamblaje de los microtúbulos como la distribución intracelular de las mitocondrias (Borbold et al., 2024). En este sentido, el incremento en la expresión de *tbce-1* en los nematodos tratados con EC parece coherente con el aumento observado en la expresión de *pdr-1* (homólogo de Parkin) (Figura 35), descrito como inductor de mitofagia. Aunque estos datos no permiten establecer una relación causal directa, sugieren una posible relación funcional entre la conservación de la dinámica microtubular y la activación de los mecanismos de control de calidad mitocondrial en el contexto de la tauopatía. Desde esta perspectiva, **la estimulación de la expresión de *tbce-1* observada tras el tratamiento con EC podría contribuir a amortiguar el fenotipo patológico del modelo de tauopatía**, no mediante una supresión directa de Tau, sino a través del refuerzo de los mecanismos estructurales y homeostáticos que limitan sus efectos neurotóxicos.

Junto a estos procesos estructurales, se ha descrito la existencia de genes moduladores de la susceptibilidad a la toxicidad de Tau, entre los que destaca MSUT2 en mamíferos. Estudios en modelos murinos han demostrado que la delección de *MSUT2* en ratones transgénicos PS19 reduce la neurodegeneración asociada a la acumulación de p-Tau, mientras que su sobreexpresión en ratones 4RTauTg2652 incrementa la deposición patológica de Tau y promueve una respuesta neuroinflamatoria (Wheeler et al., 2019). En *C. elegans*, los genes *sut-1* y *sut-2* son homólogos funcionales de *MSUT2* asociados a la supresión de Tau. Ambos codifican proteínas de unión a ARN localizadas en motas nucleares necesarias para el desarrollo de la neurodegeneración impulsada por la patología Tau. La pérdida de función de *sut-1* y *sut-2* previene la neurodegeneración mediada por p-Tau y protege frente a la descoordinación motora progresiva característica de estos modelos (Currey et al., 2023; Guthrie et al., 2009; Kraemer & Schellenberg, 2007). Por el contrario, la sobreexpresión de *sut-2* agrava la acumulación de p-

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tau, haciendo que las neuronas de *C. elegans* sean más vulnerables a su toxicidad (Guthrie et al., 2011). En el presente estudio no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de ARNm de *sut-1* y *sut-2* en los nematodos tratados con EC o Q en comparación con el grupo de control (Figura 42). Este resultado sugiere que los flavonoides evaluados no ejercen su efecto neuroprotector a través de la modulación directa de las rutas de supresión transcripcional de Tau. Más bien, los datos vuelven a apoyar que **los beneficios de EC y Q en el modelo de tauopatía se podrían explicar, al menos en parte, por el refuerzo de los sistemas de homeostasis celular, como la mitofagia, la autofagia y la estabilidad del citoesqueleto, en lugar de por una acción directa sobre los mecanismos genéticos de supresión de p-Tau**. Sin embargo, hasta donde sabemos, este trabajo es el primer estudio que investiga la influencia de los flavonoides sobre los genes relacionados con la supresión de p-Tau, por lo que sería interesante ampliar el conocimiento sobre la cascada de supresión de Tau en futuras investigaciones.

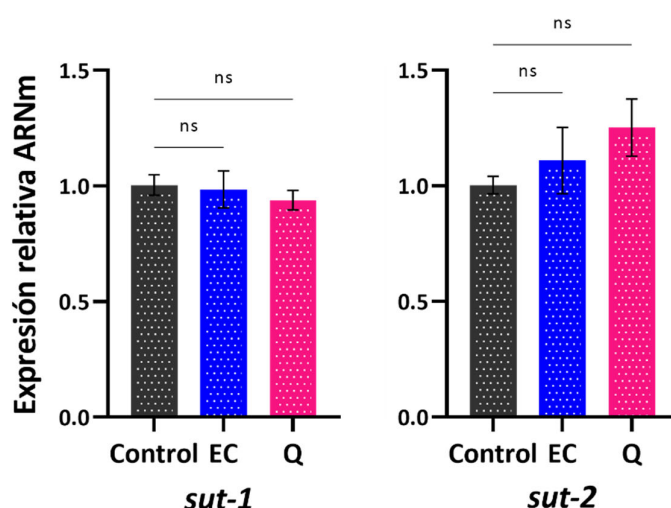


Figura 42: Niveles relativos de expresión de ARNm de los genes *sut-1* y *sut-2* en la cepa BR5270 de *C. elegans* cultivada en ausencia (control) y presencia de EC o Q (150 μ M). Análisis realizado mediante RT-qPCR utilizando *act-1* como control interno. Datos representados como media $\pm$ SEM de cuatro-seis experimentos independientes analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple Dunnett, ns = no significativo.

El conjunto de resultados obtenidos pone de manifiesto que, aunque distintos compuestos fenólicos puedan ejercer efectos neuroprotectores, los mecanismos a través de los que los producen pueden variar según el compuesto, como se ha observado para EC y Q, lo que hace necesario el estudio individual de distintas sustancias bioactivas para concluir sobre los procesos implicados a nivel molecular en cada caso. Esta circunstancia también lleva a considerar la importancia de evaluar efectos en mezclas de compuestos, como las que existen en alimentos o extractos, en los que los diferentes mecanismos a través de los que sus componentes pudieran actuar podrían tener efectos sumatorios, sinérgicos o, incluso, antagónicos, determinados también por las cantidades relativas de compuestos presentes en la mezcla y las posibles interacciones físico-químicas que pudieran establecerse entre los mismos.

4.3 Transporte de flavonoides y sus metabolitos a través de la barrera hematoencefálica

Diferentes investigaciones han puesto de manifiesto la capacidad de los flavonoides de la dieta para ejercer efectos beneficiosos sobre la neuroinflamación asociada a la enfermedad de Alzheimer (Zhang & Yan, 2023). En el presente estudio, los resultados obtenidos en los apartados previos, que muestran mejoras significativas en la esperanza y calidad de vida de nematodos modelo de la EA tratados con epicatequina (EC) o quercetina (Q), refuerzan la hipótesis de que ambos flavonoides podrían contribuir a atenuar la patología inducida por la acumulación del péptido A β y de la proteína p-Tau, dos de los principales marcadores neuropatológicos de la enfermedad. Sin embargo, la traslación de estos efectos a un contexto fisiológico humano requiere considerar de manera crítica la biodisponibilidad de dichos flavonoides y su capacidad real para alcanzar el sistema nervioso central. Diversos autores han detectado, aunque en bajas concentraciones, flavonoides y sus metabolitos en el plasma de voluntarios humanos y de ratas tras la ingesta de alimentos o bebidas ricas en estos compuestos (Del Rio et al., 2010; Mullen et al., 2010; Y. Wang et al., 2025). No obstante, la presencia en circulación sistémica no implica necesariamente su acceso al cerebro, ya que la biodisponibilidad plasmática no es equivalente a la biodisponibilidad cerebral.

La biodisponibilidad oral se puede definir como la capacidad que presenta un compuesto para alcanzar la circulación sistémica tras su ingesta. En el caso de los flavonoides, su baja biodisponibilidad está relacionada con varios factores, como la estructura química, la interacción con la matriz alimentaria y la acción de las enzimas metabólicas intestinales y hepáticas. Por otra parte, los compuestos fenólicos que no son absorbidos en el tracto digestivo superior alcanzan el colon, donde son transformados por la microbiota intestinal, originando metabolitos fenólicos de menor peso molecular, potencialmente más biodisponibles y con capacidad para distribuirse a distintos órganos. Esta interacción con la microbiota no solo modula el perfil metabólico de los flavonoides, sino que también puede inducir cambios en la composición microbiana, favoreciendo el desarrollo de especies con potencial impacto beneficioso sobre la salud (Marín et al., 2015; Naeem et al., 2022). Además, se ha propuesto que algunos de los metabolitos generados por la flora colónica podrían actuar como mediadores de los efectos neuroprotectores atribuidos a los flavonoides de la dieta (Di Lorenzo et al., 2021).

Las concentraciones de flavonoides y sus metabolitos, ya sean de fase II o resultantes de su degradación por la microbiota, habitualmente encontradas en plasma son muy bajas, situándose en el rango nanomolar a la unidad micromolar (Clifford, 2004; Williamson & Clifford, 2017). Los bajos niveles detectados son consecuencia de la pobre absorción intestinal que, en general, presentan los flavonoides y de su rápida metabolización mediante procesos de conjugación y degradación intestinal (Naeem et al., 2022), aunque también podrían estar, en parte, relacionados con limitaciones analíticas, como la sensibilidad de los métodos cromatográficos o posibles pérdidas de los analitos durante la preparación de las muestras (Kaiser et al., 2019). Algunos autores han sugerido que los problemas que plantea la baja biodisponibilidad de los polifenoles podrían ser superados mediante su captación y acumulación selectiva en algunos tejidos, teniendo en cuenta su capacidad para establecer interacciones hidrofóbicas con biomembranas (Laranjinha, 2010).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La BHE es una estructura formada por células endoteliales cerebrales que recubren los vasos sanguíneos y actúa como un sistema altamente selectivo, regulando el paso de moléculas hacia el cerebro y garantizando el suministro de nutrientes esenciales, al tiempo que protege al tejido nervioso frente a alteraciones en las concentraciones de iones, aminoácidos, péptidos y otros elementos (Alahmari, 2021). Algunos estudios preclínicos han aportado evidencias de que ciertos flavonoides, como la quercetina, así como metabolitos fenólicos derivados de su biotransformación, como el catecol-*O*-sulfato, pueden reducir la disfunción de la BHE inducida por el estrés oxidativo en células endoteliales cerebrales (línea HBMEC), preservando la viabilidad celular (Figueira et al., 2017). Estos resultados refuerzan el papel antioxidante de los flavonoides y sus metabolitos a nivel de la BHE, y respaldan su interés como posibles moduladores de la integridad de esta barrera en el contexto de enfermedades neurológicas (Tan et al., 2025). No obstante, persisten muchas incertidumbres acerca de la biodisponibilidad cerebral de los flavonoides, por lo que son necesarios estudios adicionales para corroborar si estos compuestos, o sus metabolitos circulantes, tienen la capacidad de alcanzar el sistema nervioso central (SNC) atravesando la barrera hematoencefálica (BHE).

En el presente estudio se evaluó la capacidad de epicatequina (EC), quercetina (Q), derivados metilados de quercetina (tamarixetina, TAM e isorhamnetina, ISO) y distintos metabolitos fenólicos potencialmente derivados del metabolismo colónico de flavonoides (ácidos protocatéquico (PCA), vanílico (VA), 3,4-dihidroxifenilacético (DHPAA), 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (3-4HPA), dihidrocafeico (DHCA) y cafeico (CA)), para atravesar la barrera hematoencefálica, utilizando como modelo la línea celular hCMEC/D3 (*immortalized human cerebral microvascular endothelial cell line D3*). Esta línea, derivada de endotelio cerebral humano, constituye un modelo ampliamente utilizado en estudios *in vitro* en investigaciones relacionadas con el transporte de sustancias a través de la barrera hematoencefálica, ya que conserva tanto la morfología como las características funcionales de las células endoteliales cerebrales (Weksler et al., 2013).

Como paso previo, se analizó la seguridad de todos los compuestos ensayados sobre la viabilidad celular, ya que concentraciones tóxicas para las células inducirían alteraciones en la integridad y permeabilidad de la membrana endotelial. Los resultados mostraron que ninguno de los compuestos redujo la viabilidad celular a excepción de isorhamnetina (ISO); incluso EC, Q y ácido vanílico (VA) indujeron un aumento significativo de la misma (Figura 43A). Aunque ISO mostró inicialmente el efecto contrario, posiblemente asociado a un desprendimiento de las células de los pocillos, este resultado no se confirmó en el ensayo independiente con azul de tripano.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

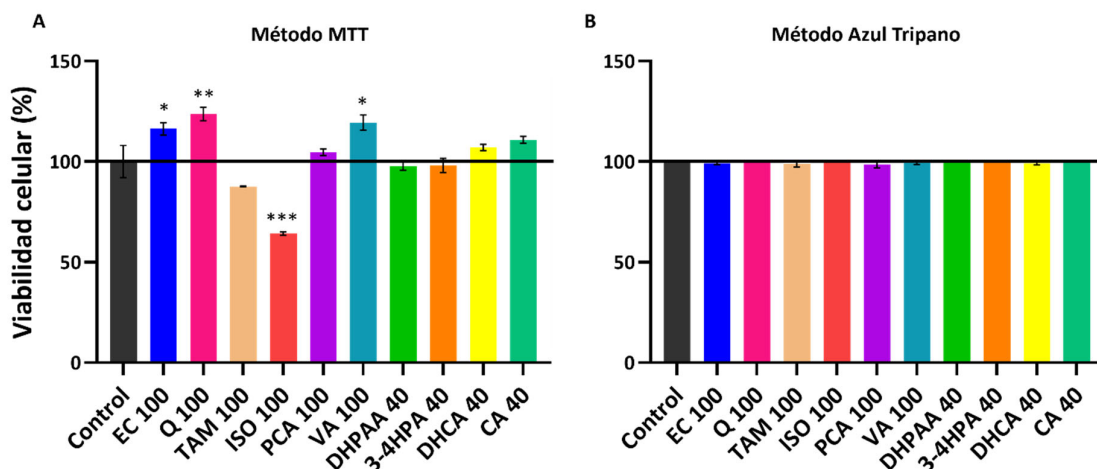


Figura 43: Viabilidad de las células hCMEC/D3 tras la exposición a los diferentes compuestos ensayados (100 o 40 μM). La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (A) y Azul de Tripano (B). Valores expresados como el porcentaje relativo a las células no tratadas (control). Datos representados como media $\pm$ SEM de dos experimentos independientes analizados por ANOVA de una vía y comparaciones múltiples Dunnett (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). EC (epicatequina), Q (quercetina), TAM (tamarixetina), ISO (isorhamnetina), PCA (ácido protocatéquico), VA (ácido vanílico), DHPAA (ácido 3,4-dihidroxifenilacético), 3-4HPA (ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico), DHCA (ácido dihidrocafeico), CA (ácido cafeico).

Para los ensayos de transporte, las células hCMEC/D3 se cultivaron sobre membranas semipermeables (insertos Transwell) durante 9-10 días para asegurar la confluencia celular, verificándose la integridad de la monocapa mediante la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Todos los insertos mostraron una TEER $> 150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (180-400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), valores concordantes con los descritos en otros estudios donde se ha reportado que las monocapas hCMEC/D3 desarrollan valores TEER cercanos a 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ en presencia de hidrocortisona (Qi et al., 2023). El transporte transcelular, expresado en eficacia de transporte (ET), de los flavonoides EC y Q, así como de sus metabolitos más relevantes (TAM, ISO, PCA, VA, DHPAA, 3-4HPA, DHCA y CA), se estudió tras tres horas de incubación de las células con cada compuesto, cuantificándose las concentraciones en los compartimentos apicales (AP) y basolaterales (BS) de los insertos Transwell al inicio del experimento (t_0), a la hora (t_1) y a las 3 horas (t_3). La cuantificación se realizó mediante HPLC utilizando rectas de calibrado (Tabla 7) con concentraciones conocidas de cada patrón (0-100 μM). La ET (%) se determinó aplicando la fórmula: $\text{ET} (\%) = [(\text{Concentración BS} / \text{Volumen AP}) / (\text{Concentración AP} / \text{Volumen BS})] \cdot 100$ (Sánchez-Martínez et al., 2023). La Figura 44 representa un esquema de la disposición de los compartimentos AP y BS de los insertos Transwell y del tiempo de toma de muestras.

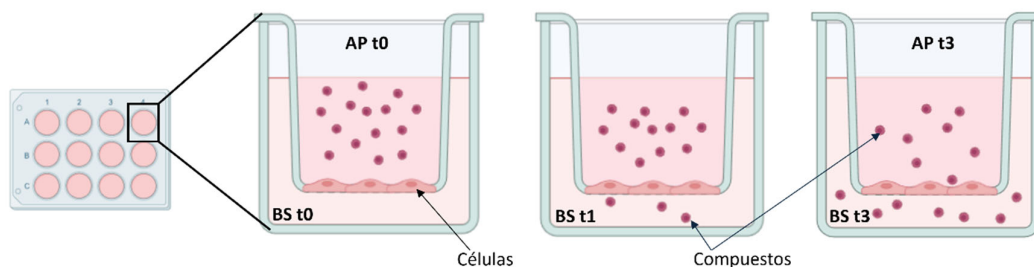


Figura 44: Esquema representativo de la disposición de los compartimentos apical (AP) y basolateral (BS) de los insertos Transwell. Recogida de muestras al inicio del experimento (t_0), a la hora (t_1) y a las 3 horas (t_3). Imagen de elaboración propia con iconos de <https://www.biorender.com/>

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7: Ecuaciones de las rectas de calibrado utilizadas para la determinación de la concentración de las muestras tomadas durante el ensayo de transporte.

Compuesto	Ecuación	R ²
EC	$y = 26.538x + 14.544$	0.9997
Q	$y = 121.59x + 79.699$	0.9989
TAM	$y = 210.9x + 27.909$	0.9994
ISO	$y = 149.14x - 31.55$	0.9995
PCA	$y = 22.039x + 2.3464$	0.9997
VA	$y = 33.403x - 0.6901$	0.9999
DHPAA	$y = 17.452x - 3.8236$	0.9998
3-4HPA	$y = 9.8004x - 5.9758$	0.9987
DHCA	$y = 18.372x - 1.7859$	0.9999
CA	$y = 79.231x + 1.7794$	0.9998

Aunque en una fase preliminar se ensayaron para algunos compuestos (EC, Q, TAM, ISO, PCA y VA) concentraciones de 100 y 40 μ M, la ausencia de diferencias significativas en la ET entre ambas condiciones llevó a seleccionar la concentración de 40 μ M como condición estándar. Esta decisión se apoyó, además, en la mayor relevancia fisiológica de dicha concentración (McKay et al., 2015), teniendo en cuenta que las concentraciones plasmáticas descritas en humanos son altamente variables en función del tipo y cantidad de alimento ingerido, así como de la variabilidad interindividual (Di Lorenzo et al., 2021).

La Tabla 8 muestra las concentraciones iniciales y finales (t0 y t3), expresadas como porcentaje (%), de los compuestos en el compartimento apical (AP) y la Eficacia de Transporte (ET, %) en el compartimento basolateral (BS) de los insertos, y en la Figura 45 se representan los porcentajes de transporte de los compuestos ensayados al compartimento basolateral tras 1 h y 3 h de incubación.

Tabla 8: Porcentaje (%) de las concentraciones determinadas en cada compartimento de los insertos Transwell (AP o BS) a diferentes tiempos del ensayo (t0, t1 o t3). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de cinco experimentos independientes.

Compuesto (40 μ M)	Concentración inicial AP t0 (%)	Concentración final AP t3 (%)	ET (%) BS t1	ET (%) BS t3	AP t3 + BS t3 (%)
EC	100 $\pm$ 15.56	36.72 $\pm$ 0.91	39.22 $\pm$ 1.90	57.03 $\pm$ 0.95	93.74 $\pm$ 1.70
Q	100 $\pm$ 30.75	25.32 $\pm$ 2.11	19.98 $\pm$ 6.35	48.70 $\pm$ 3.18	74.02 $\pm$ 1.56
TAM	100 $\pm$ 0.57	23.25 $\pm$ 3.60	1.69 $\pm$ 0.13	4.01 $\pm$ 0.48	27.26 $\pm$ 3.49
ISO	100 $\pm$ 10.56	31.46 $\pm$ 3.32	4.31 $\pm$ 0.62	7.42 $\pm$ 0.36	38.88 $\pm$ 3.34
PCA	100 $\pm$ 0.42	31.19 $\pm$ 1.65	34.41 $\pm$ 2.42	60.93 $\pm$ 0.50	92.12 $\pm$ 1.84
VA	100 $\pm$ 8.73	34.08 $\pm$ 1.33	36.02 $\pm$ 1.99	62.27 $\pm$ 1.60	96.35 $\pm$ 0.85
DHPAA	100 $\pm$ 0.63	36.36 $\pm$ 1.04	38.45 $\pm$ 3.21	58.13 $\pm$ 1.54	94.49 $\pm$ 1.28
3-4HPA	100 $\pm$ 3.46	36.14 $\pm$ 0.92	42.47 $\pm$ 2.74	62.34 $\pm$ 1.77	98.48 $\pm$ 1.99
DHCA	100 $\pm$ 11.07	35.03 $\pm$ 0.88	32.77 $\pm$ 1.34	51.82 $\pm$ 3.23	86.85 $\pm$ 3.33
CA	100 $\pm$ 14.49	29.67 $\pm$ 2.02	30.62 $\pm$ 1.23	47.18 $\pm$ 2.50	76.85 $\pm$ 4.51

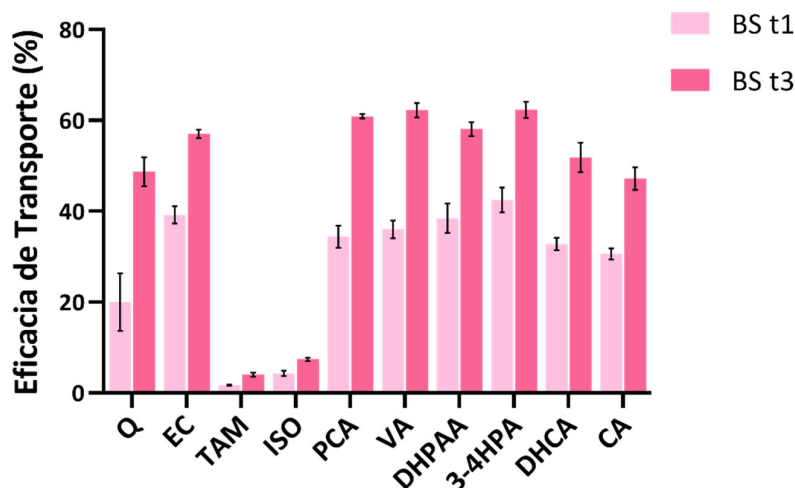


Figura 45: Porcentaje de la concentración de compuestos fenólicos en el lado BS de insertos Transwell a 1 (t1) y 3 (t3) horas post incubación de las células hCMEC/D3 con cada compuesto a la concentración inicial de 40 μ M. Cálculo realizado a partir de la fórmula: $ET (\%) = [(C \text{ BS} / V \text{ AP}) / (C \text{ AP} / V \text{ BS})] \cdot 100$. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM de cinco experimentos independientes.

En las condiciones de ensayo, los flavonoides EC y Q presentaron una ET, tras tres horas de incubación, del $57.03 \% \pm 0.95$ y $48.70 \% \pm 3.18$ (SEM), respectivamente (Tabla 8; Figura 45). El resultado obtenido es coherente, aunque superior, al descrito por Faria et al. (2014), quienes incubaron células hCMEC/D3 en presencia de EC o Q 30 μ M, entre otros compuestos, y encontraron una ET para EC de $23.0 \% \pm 1.0$ (SEM) y de $5.2 \% \pm 1.3$ (SEM) para Q, a las 3 horas. Estas diferencias pueden explicarse, al menos en parte, por el método de cálculo aplicado en dicho estudio, que no tuvo en cuenta la diferencia de volumen entre los compartimentos apical (300 μ L) y basolateral (1 mL) ($ET = [(BS \text{ t}_{1-3}) / (AP \text{ t}_0)] \cdot 100$), lo que conllevaría una subestimación de la ET en una relación cercana a 1:3.

La capacidad de EC para atravesar la BHE también ha sido descrita en modelos murinos *in vivo*. Así, Ferruzzi et al. (2009) analizaron la biodisponibilidad de los principales compuestos fenólicos presentes en un extracto de proantocianidinas de semilla de uva (GSPE, *grape seed proanthocyanidin extract*), incluyendo epicatequina, en ratas Sprague-Dawley. Los autores detectaron concentraciones cerebrales de EC de 576.7 ± 227.7 pg/g de tejido tras la administración repetida de 150 mg/kg de peso corporal de GSPE durante 10 días, lo que indica que compuestos como la epicatequina pueden alcanzar y mantenerse detectables en el tejido cerebral tras una exposición prolongada.

Los metilados de quercetina (TAM e ISO) mostraron una ET considerablemente menor. TAM e ISO presentaron valores de ET del $4.01 \% \pm 0.4$ y $7.42 \% \pm 0.36$, respectivamente, observándose además que una fracción sustancial de los compuestos no se recuperaba ni el compartimento apical ni en el basolateral tras tres horas de incubación (Tabla 8, columna AP t3 + BS t3). Este hecho podría indicar una retención intracelular parcial o una cinética de transporte más lenta, hipótesis que requeriría analizar las membranas de los insertos donde se encontraba adherida la monocapa de células hCMEC/D3.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La ET obtenida para Q, TAM e ISO difiere de los resultados descritos por algunos autores (Faria et al., 2014; Sánchez-Martínez et al., 2022), que han descrito una mayor biodisponibilidad de los metabolitos metilados, atribuyéndola a que la metilación protege a los flavonoides de la dieta de una rápida degradación metabólica, favoreciendo así la ratio de absorción y su entrada en las células (Wen et al., 2017). Sin embargo, otras publicaciones han descrito resultados concordantes con los observados en este trabajo. Por ejemplo, en el estudio realizado por Schulz et al. (2005) se observó que quercetina mostraba un nivel de absorción más elevado que isorhamnetina al comparar los picos máximos de concentración plasmática en voluntarios varones a los que se había administrado 612 mg de extracto seco de hipérico. Después de una dosis, las concentraciones máximas ($C_{\text{máx}}$) determinadas fueron 43.8 ng/mL a las 5.5 horas para Q y 9.0 ng/mL a las 6.4 horas para ISO. De la misma manera, Chen et al. (2010) compararon parámetros farmacocinéticos de Q e ISO tras administración en ratas de un extracto sólido de *Ginkgo biloba* y encontraron que la $C_{\text{máx}}$ para Q fue de 419.02 ng/mL a las 0.63 horas y de 291.57 ng/mL a las 6.16 horas para ISO. Estas evidencias, en las que la quercetina alcanza concentraciones plasmáticas máximas más elevadas y en tiempos más tempranos que la isorhamnetina, sugieren que los metabolitos metilados podrían presentar un perfil de absorción más tardío. En este contexto, no puede descartarse que una mayor permeabilidad de TAM e ISO a través de la BHE se manifieste en tiempos superiores a las tres horas analizadas en este estudio. De hecho, está bien establecido que los diferentes tipos de flavonoides presentan diferentes grados de biodisponibilidad según su estructura química y el mecanismo utilizado para promover la absorción (Burak et al., 2017; Liu et al., 2025).

Un resultado particularmente relevante fue la elevada permeabilidad observada para los metabolitos fenólicos de bajo peso molecular. PCA, VA, DHPAA, 3-4HPA, DHCA y CA atravesaron la monocapa de células hCMEC/D3 de manera eficiente, mostrando valores de ET iguales o superiores al 50 % tras 3 horas de incubación (Tabla 8, Figura 45). Estas observaciones están en línea con los resultados obtenidos por Sánchez-Martínez et al. (2022), quienes evaluaron la permeabilidad de compuestos bioactivos presentes en diferentes extractos vegetales mediante el método PAMPA-BHE (ensayo de permeabilidad con membrana artificial paralela para la barrera hematoencefálica). En dicho estudio, ácidos fenólicos como PCA, VA y CA mostraron un alto potencial para atravesar la BHE, apoyando la idea de que los compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentan una elevada capacidad de difusión pasiva. De forma concordante, se ha descrito que los metabolitos microbianos derivados de isoflavonas, otra subclase de flavonoides, presentan mayor permeabilidad a través de modelos artificiales de barrera intestinal y hematoencefálica en comparación con sus compuestos originales, lo que refuerza la hipótesis de que la biotransformación microbiana puede incrementar, en algunos casos, el potencial de biodisponibilidad cerebral de los polifenoles (Johnson et al., 2019).

El ácido protocatéquico (PCA) constituye uno de los principales metabolitos microbianos derivados del metabolismo colónico de los flavonoides, y se ha descrito que sus concentraciones en plasma pueden superar las cantidades del mismo cuando se ingiere de forma directa, debido al intenso catabolismo de la microbiota intestinal (McKay et al., 2015). Además, este ácido fenólico se ha asociado con beneficios sobre la salud cognitiva (Domínguez-López et al., 2024). En este estudio, el PCA mostró una elevada ET alcanzando un 60.93 ± 0.50 (SEM) tras 3 horas de incubación en el sistema celular (Tabla 8, Figura 45). Este resultado es coherente con investigaciones *in vivo* en las que se detectó PCA en cerebro de ratas a las 4 horas de la administración intragástrica de un extracto de raíz de *Salvia miltiorrhiza* (Zhang et al., 2011), confirmando su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

De manera similar, otros metabolitos fenólicos de bajo peso molecular evaluados en este estudio, como VA, DHCA y CA, mostraron a las 3 h valores elevados de ET ($62.27 \% \pm 1.60$, $51.82 \% \pm 3.23$ y $47.18 \% \pm 2.50$, respectivamente). Estos resultados concuerdan con evidencias previas que describen una amplia distribución tisular de VA y CA, incluyendo el cerebro, en ratas Wistar tras la ingesta de extractos de compuestos fenólicos de aceite de oliva (Serra et al., 2012). Por su parte, estudios realizados *in vitro* clasifican el DHCA como un metabolito con capacidad media para atravesar la BHE (Lardeau & Poquet, 2013). En un estudio realizado en voluntarios humanos sanos que consumían una dieta occidental típica, Grabska-Kobylecka et al. (2020) detectaron la presencia en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) de los ácidos cafeico, homovanílico y 3-hidroxifenilacético en análisis realizados tras ayuno de 15 h, lo que constituye una evidencia directa del paso de ciertos compuestos fenólicos a través de la BHE en humanos. Sumado a ello, estudios *in silico* utilizando el modelo QikProp 2009 predijeron como “probable” la posibilidad de que metabolitos de compuestos fenólicos de bajo peso molecular como PCA, VA y CA, atravesen la BHE (Carecho et al., 2021).

La eficacia de transporte observada en el presente estudio para DHPAA y 3-4HPA fue del $58.13 \% \pm 1.54$ y $62.34 \% \pm 1.77$ respectivamente (Tabla 8, Figura 45), indicando también una buena permeabilidad de estos metabolitos fenólicos de bajo peso molecular a través de la barrera hematoencefálica en este modelo *in vitro*. El DHPAA tiene un interés particular, ya que, además de ser un metabolito derivado de la degradación colónica de compuestos fenólicos ingeridos con la dieta, también constituye un producto del metabolismo enzimático de la dopamina, un neurotransmisor clave en el sistema nervioso central, y se encuentra de forma fisiológica en el líquido cefalorraquídeo humano (Lofft et al., 2022). Se ha descrito que enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson se asocian con bajas concentraciones de DHPAA en el LCR (Goldstein et al., 2024). Aunque estos datos no permiten establecer una relación causal, la elevada capacidad de DHPAA para atravesar la barrera hematoencefálica observada en este estudio sugiere que los metabolitos microbianos derivados de polifenoles podrían contribuir a modular su disponibilidad a nivel cerebral. Por su parte, el 3-4HPA ha demostrado capacidad antioxidante en ensayos *in vitro* y ha sido descrito además como uno de los metabolitos principales generados tras 12-24 h de fermentación colónica *in vitro* de flavonoides en presencia de microbiota (Cárdenas-Castro et al., 2022; Chen et al., 2020).

En conjunto, los resultados obtenidos y las evidencias obtenidas por otros autores ponen de manifiesto la capacidad de Q, EC y derivados fenólicos de bajo peso molecular resultantes de su metabolismo colónico para atravesar la BHE, lo que permite suponer que puedan desempeñar un papel relevante en los efectos neuroprotectores atribuidos a los polifenoles. Por otra parte, la presencia de enzimas de fase I y II en el tejido cerebral sugiere que ciertos compuestos fenólicos y/o sus metabolitos podrían sufrir transformaciones metabólicas adicionales a nivel cerebral, modulando su bioactividad y, consecuentemente, sus efectos neuroprotectores (Carecho et al., 2021), que podrían verse aumentados o disminuidos. De forma complementaria, los compuestos y metabolitos fenólicos derivados de la dieta contribuyen al mantenimiento de la homeostasis intestinal mediante la modulación del equilibrio del microbioma (Gentile et al., 2023; Zhou et al., 2024), reforzando la interconexión entre metabolismo intestinal y salud cerebral. En este contexto, el potencial de la microbiota intestinal para transformar flavonoides en ácidos fenólicos, como PCA, VA y 3-4HPA (Lin et al., 2016), junto con la demostrada capacidad de estos compuestos para alcanzar el SNC, refuerza el interés por analizar su impacto funcional en la neurodegeneración. Con este objetivo, se plantearon una serie de ensayos adicionales para evaluar los efectos de estos metabolitos en el modelo p-Tau de *C. elegans*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4 Efectos neuroprotectores de metabolitos de flavonoides *in vivo*

Tal y como se ha discutido en el epígrafe anterior, determinados ácidos fenólicos derivados del metabolismo de los flavonoides presentan una capacidad significativa para atravesar la barrera hematoencefálica en modelos *in vitro*. Sin embargo, los estudios que evalúan el potencial de estos metabolitos fenólicos para actuar a nivel de la BHE en el ámbito de la neurodegeneración, aunque prometedores, son todavía escasos (Marques et al., 2024). Por ello, en el presente trabajo se seleccionaron los metabolitos PCA, VA y 3-4HPA, cuya ET fue cercana al 60 % en el modelo hCMEC/D3, para explorar su potencial neuroprotector *in vivo* utilizando la cepa BR5270 de *C. elegans*, que expresan el fragmento pro-agregante de la proteína Tau humana.

En primer lugar, los nematodos se cultivaron de manera sincronizada en presencia o ausencia de PCA, VA o 3-4HPA, incorporados al medio a diferentes concentraciones (100, 200 o 300 μ M). Una vez alcanzado el estadio adulto, los nematodos se sometieron al ensayo de quimiotaxis con el fin de evaluar su capacidad cognitiva, midiendo la respuesta olfativa hacia el alcohol isoamílico (AI), descrito como atrayente para *C. elegans* (Bargmann et al., 1993). La cepa BR5271, que expresa una forma anti-agregante de p-Tau, se utilizó como control negativo. Como se muestra en la Figura 46, el índice de quimiotaxis de los nematodos pro-agregantes BR5270 no tratados se redujo en un 35 % en comparación con el control negativo (BR5271), confirmando el deterioro cognitivo asociado a la agregación de p-Tau ($p < 0.001$). Por el contrario, el tratamiento con PCA o VA 300 μ M, así como con 3-4HPA a 200 μ M, produjo una mejora significativa de la respuesta quimiotáctica del 26.8 %, 23.2 % y 17.9 %, respectivamente, en comparación con los nematodos BR5270 no tratados.

Estos resultados parecen indicar que los ácidos fenólicos PCA, VA y 3-4HPA, metabolitos resultantes de la degradación de flavonoides por la flora colónica, podrían contribuir a la mejora de las alteraciones funcionales asociadas a la acumulación de p-Tau en la cepa BR5270 de *C. elegans*. Estos efectos son coherentes, a nivel fenotípico, con los observados previamente tras el tratamiento con los flavonoides EC y Q, si bien no permiten concluir sobre una equivalencia mecanística directa entre ambos tipos de compuestos (Figuras 32-34).

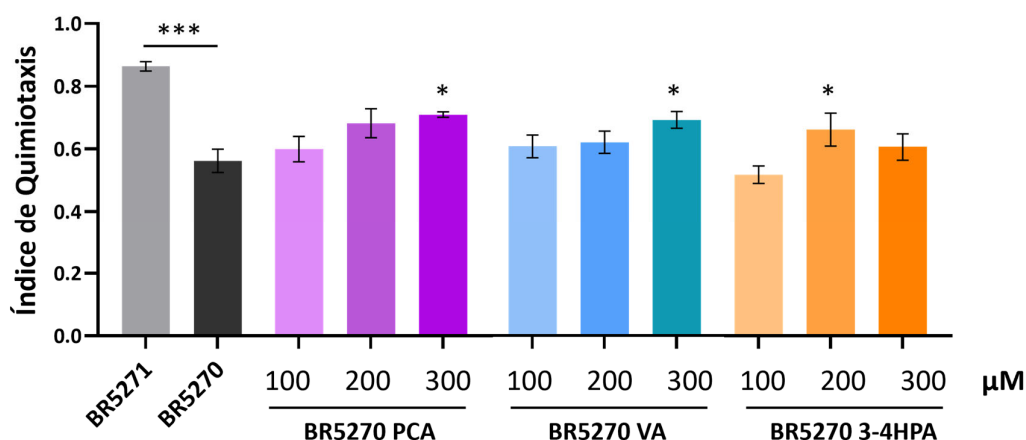


Figura 46: Efecto de PCA, VA o 3-4HPA a diferentes concentraciones (100, 200 y 300) sobre la respuesta quimiotáctica de los nematodos BR5270 que expresan p-Tau hacia el AI (odorante). Los controles anti-agregante (BR5271) y pro-agregante (BR5270) se cultivaron en presencia de DMSO 0.1 % (vehículo). Índice de Quimiotaxis representado por barras como la media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes analizada por ANOVA de una vía y la prueba de comparaciones múltiples Dunnett, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, $n \approx 300$.

A partir de los resultados anteriores, se seleccionó PCA a la concentración de 300 μM para llevar a cabo el ensayo de longevidad, donde se evaluó el efecto de dicho compuesto sobre la esperanza de vida de la cepa BR5270 (Figura 47). Se puede comprobar que los nematodos cultivados en presencia de PCA 300 μM mostraron un incremento del 9.1 % en la vida media en comparación con el grupo control (Control 8.69 ± 0.32 vs PCA 300 μM 9.48 ± 0.33).

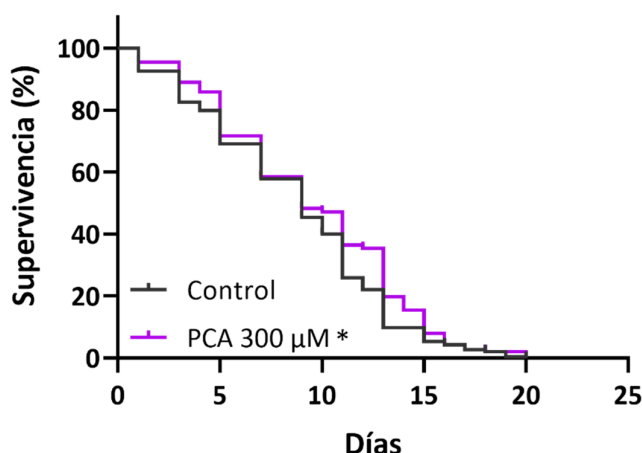


Figura 47: Curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de los nematodos BR5270 cultivados en presencia o ausencia (control) de PCA 300 μM analizada mediante la prueba de rangos logarítmicos (log-rank test) ($n \approx 200$ por condición). Los datos representan la media $\pm$ SEM de dos experimentos independientes, * $p < 0.05$.

Diversos estudios han puesto de manifiesto el potencial bioactivo de los ácidos fenólicos en distintos contextos experimentales. Así, se ha documentado un aumento de la esperanza de vida en la cepa silvestre N2 de *C. elegans* tras el tratamiento con PCA, VA, 3-4HPA, DHCA o CA a concentraciones comparables a las empleadas en este trabajo (Gutierrez-Zetina et al., 2021; Kim et al., 2014; Li et al., 2024; Osorio-Paz et al., 2023), así como en modelos específicos de envejecimiento, como la cepa PX627 cultivada con PCA 100 μM o VA 250 μM (Dilberger et al., 2021). Asimismo, PCA y VA han mostrado efectos neuroprotectores en estudios en modelos murinos de enfermedad de Alzheimer basados en la acumulación de β -amiloide. Por ejemplo, el tratamiento con PCA durante 4 semanas redujo significativamente el número de depósitos del péptido β -amiloide en el hipocampo del modelo A β PP/PS1 (Song et al., 2014), mientras que la administración de VA durante 20 días a ratas Sprague-Dawley previno el deterioro del aprendizaje y la memoria causados por escopolamina (SCOP) (G.Y. Choi et al., 2024). Sin embargo, hasta la fecha, se dispone de pocos estudios que hayan abordado el efecto de PCA, VA o 3,4-HPA en modelos *in vivo* específicos de tauopatía, por lo que este trabajo contribuye, aunque de forma preliminar, a ampliar el conocimiento en este ámbito.

En conclusión, los resultados obtenidos en los ensayos realizados con PCA, VA y 3-4HPA en la presente tesis doctoral, aportan nuevas evidencias que apoyan el interés de los metabolitos fenólicos derivados de la microbiota intestinal como potenciales moduladores de procesos neurodegenerativos asociados a la patología Tau. Aunque sería necesario estudiar más ampliamente su potencial como moléculas protectoras frente a las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, considerando su biodisponibilidad, su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y los efectos funcionales observados en *C. elegans*, cobra especial interés profundizar en el estudio de estos compuestos como mediadores de los efectos neuroprotectores atribuidos a los flavonoides de la dieta.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5 Discusión general

La enfermedad de Alzheimer es el tipo de demencia más común a nivel mundial, y se prevé que su prevalencia siga aumentando (Nichols et al., 2022). La acumulación del péptido β -amiloide fuera de las neuronas y la agregación anormal de la proteína Tau hiperfosforilada dentro de las neuronas, se consideran dos de las características principales que se producen en la patogénesis de la EA (Abyadeh et al., 2024). En este estudio, se evaluó el efecto protector de los flavonoides epicatequina y quercetina contra la patogénesis de A β y de p-Tau, así como los mecanismos moleculares que podrían estar implicados, utilizando cepas transgénicas de *C. elegans* que expresan el péptido A β o la proteína p-Tau (CL4176, CL2355, CL2006 y BR5270). Además, también se exploró la capacidad de EC, Q y algunos de los metabolitos microbianos de flavonoides más comunes, para atravesar la barrera hematoencefálica utilizando la línea celular hCMEC/D3. Por último, se iniciaron experimentos con la cepa BR5270 de *C. elegans*, que expresa de p-Tau, con el objetivo de estudiar los posibles efectos neuroprotectores de los metabolitos fenólicos frente a la patología asociada a p-Tau.

De acuerdo con la literatura, la expresión de genes relacionados con la autofagia, la función mitocondrial, los procesos apoptóticos, las vías de respuesta inflamatoria o de respuesta a estrés, pueden estar involucrados en la EA (Ajoalabady et al., 2022; Goel et al., 2022). La modulación de estas dianas mediante el tratamiento con flavonoides podría ser una estrategia terapéutica para las proteinopatías (Esmaeili et al., 2022). En esta tesis doctoral, se ha puesto de manifiesto el potencial bioactivo de los flavonoides EC y Q, cuya administración a cepas transgénicas de *C. elegans*, modelos de la EA, mejoró la esperanza y calidad de vida de los individuos (Figuras 23-25 y 32-34).

Respecto a la modulación de la expresión génica, se ha observado que tanto en la cepa CL4176, que expresa A β , como en la cepa BR5270, que expresa p-Tau, aumentó significativamente la expresión relativa de ARNm de genes relacionados con la autofagia en los nematodos tratados con Q o EC (Figuras 26, 35 y 36). Sin embargo, se encontraron diferencias en el tipo de autofagia activado en cada modelo. Mientras que frente a la toxicidad inducida por A β parece predominar la degradación vía autofagia mediada por chaperonas (sobreexpresión del gen *Imp-2*), la eliminación de p-Tau podría producirse por los mecanismos vinculados a la mitofagia y formación de autofagosomas (sobreexpresión de *pink-1*, *pdr-1* y *epg-8*). Dado que la autofagia es un proceso de degradación de elementos celulares dañados que permite mantener el correcto funcionamiento de las células, teniendo en cuenta que su alteración puede desencadenar trastornos neurodegenerativos (Aman et al., 2021), la estimulación y mantenimiento adecuado de este proceso por parte de los flavonoides podrían contribuir a la salud cerebral y representar una estrategia para facilitar la eliminación de proteínas acumuladas y disfuncionales.

Por el contrario, el nivel relativo de ARNm de genes relacionados con la respuesta a diferentes tipos de estrés, como *hsp-70* y *skn-1*, fue regulado a la baja en los grupos de nematodos A β y p-Tau tratados con EC o Q (Figuras 30, 31, 38 y 40). Esto podría indicar que este tipo de respuesta no era necesario, posiblemente por existir un menor estrés celular debido a la menor acumulación de A β y de agregados de p-Tau, al estimular los flavonoides los procesos de eliminación de estos elementos dañados. Esta explicación estaría en línea con estudios que han descrito a HSP70 como una proteína relacionada con el mantenimiento de la homeostasis neuronal por su capacidad para inhibir la agregación de A β y Tau (Lackie et al., 2017). También se ha reportado el aumento de su expresión en presencia de oligómeros A β (Valle-Medina et al.,

2025). Está bien establecido que la inflamación, el estrés oxidativo y estrés del retículo endoplasmático promueven los procesos neurodegenerativos que conducen a la EA (Liang et al., 2019; Roda et al., 2022). De este modo, el potencial de EC y Q para mitigar el estrés y actuar como compuestos antioxidantes, podría constituir una estrategia eficaz para atenuar la neurodegeneración y proteger frente al daño neuronal.

Por otra parte, se encontraron resultados diferentes en la expresión del gen *ced-7* entre las dos cepas A β y p-Tau utilizadas. Este gen, homólogo de los transportadores ABC humanos implicado en el proceso de apoptosis mediante el cual se autodestruyen células dañadas o innecesarias (Sharma et al., 2021), fue regulado a la baja en el grupo de nematodos tratados con EC o Q de la cepa CL4176 (modelo A β) (Figura 28), mientras que no hubo diferencias significativas en su expresión entre los grupos de nematodos de la cepa BR5270 (modelo p-Tau) cultivados en presencia o ausencia de los flavonoides (Figura 37). Por un lado, se ha reportado que la activación de la apoptosis en modelos de patología A β y p-Tau puede expresarse de manera variable (D'Arcy, 2022; Sierksma et al., 2020). Por otro, al igual que ya se ha sugerido para el caso de los genes de respuesta al estrés, la activación de la autofagia en los grupos de nematodos tratados con flavonoides observada en los ensayos de expresión génica con ambos modelos (Figuras 26, 35 y 36), podría estar favoreciendo la eliminación de proteínas agregadas y otros componentes celulares disfuncionales, lo que a su vez reduciría el daño neuronal y disminuiría la necesidad de activar el proceso de apoptosis para eliminar la célula completa. Estos resultados están en concordancia con otras investigaciones en las que también se observó una estimulación de la autofagia y una inhibición de la apoptosis en ratones modelo de la EA tratados con flavonoides (He et al., 2023; S. Wang et al., 2025).

Por último, la expresión del ARNm del gen *tbce-1*, necesario para la síntesis de la α -tubulina que compone los microtúbulos de la neurona, solo se estudió en la cepa que expresa p-Tau (BR5270), ya que la síntesis de tubulina está directamente relacionada con la proteína Tau, que en condiciones normales ensambla los microtúbulos. Sin embargo, cuando se hiperfosforila y se agrega formando agregados p-Tau, como ocurre en la EA, se desestabilizan los microtúbulos y se impide una correcta polimerización de la tubulina (Cyske et al., 2023). En particular, en nuestro estudio, el grupo de nematodos BR5270 tratados con EC mostró un aumento en la expresión de los niveles de *tbce-1* (Figura 41). De este modo, el potencial de algunos compuestos fenólicos para aumentar la síntesis de tubulina podría favorecer la reparación y la estabilidad de los microtúbulos, lo que ralentizaría el desarrollo de la neurodegeneración.

Los efectos diferenciales en los perfiles de expresión de ARNm entre EC y Q pueden atribuirse a las diferencias en su estructura química, por lo que es probable que cada compuesto fenólico interactúe con dianas moleculares específicas. Además, la estructura química también determina cómo se absorben y qué metabolitos activos se forman (Hu et al., 2025). Resultados similares fueron reportados por Xie et al. (2022), quienes observaron que el flavonol kaempferol y el estilbenoide rapontigenina (presentes en plantas como brócoli y uvas) eran capaces de aumentar de forma diferencial los niveles de ARNm de genes relacionados con la mitofagia/autofagia en la cepa P301L de *C. elegans* (otro modelo de p-Tau). En este contexto, la presente tesis doctoral podría servir de base para futuras investigaciones destinadas a mejorar la comprensión de los sitios activos de los compuestos fenólicos y su posible impacto en la salud mediante el uso de herramientas virtuales para predecir las interacciones más estables entre el compuesto y el receptor.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Es necesario tener en cuenta que *C. elegans* presenta ciertas limitaciones que deben considerarse al intentar extrapolar los resultados a los humanos. Así, a diferencia de los mamíferos, *C. elegans* carece de características anatómicas como sistema circulatorio, barrera hematoencefálica, metabolismo hepático, filtración renal de la sangre o metilación del ADN. Estos elementos pueden ser cruciales para las vías de señalización específicas de los tejidos o para los efectos epigenéticos (Kaletta & Hengartner, 2006). Además, en el presente estudio se emplean cepas de *C. elegans* que expresan el péptido A β (CL4176, CL2355 y CL2006) o que expresan la proteína p-Tau (BR5270), los dos marcadores principales de la EA de forma independiente según el modelo. Sin embargo, se conoce que, en la EA humana, tanto las formas oligoméricas de A β como la p-Tau, actúan sinérgicamente para inducir disfunción sináptica (Zhang, 2023). Por lo tanto, para futuras investigaciones sería interesante el uso de un mutante doble de *C. elegans* (que co-exprese A β y p-Tau) para explorar más a fondo los efectos y mecanismos moleculares de los flavonoides para proteger contra la neurotoxicidad.

Otra limitación del estudio es que, aunque la dosis administrada de forma homogénea en el medio NGM se controla con cierta precisión, determinar la concentración exacta del compuesto que incorporan los nematodos sigue siendo un reto. Estudios previos realizados en el grupo de investigación confirmaron la incorporación y biotransformación de flavonoides en nematodos de la cepa silvestre N2 cultivados con quercetina-3-*O*-glucósido o quercetina, demostrando una correlación positiva entre las concentraciones en el medio y los niveles de metabolitos totales en los animales determinados mediante análisis HPLC-DAD-ESI/MS, lo que indica una captación y efectos dependientes de la concentración (Dueñas et al., 2013).

No obstante, mientras que para modelizar un proceso específico pueden ser necesarios organismos más complejos, *C. elegans* proporciona un vínculo entre los estudios *in vitro* y los experimentos con mamíferos, algo que resulta esencial para el cribado preliminar y la caracterización de dianas de los efectos neuroprotectores de los compuestos bioactivos. Además, *C. elegans* se emplea como un valioso organismo modelo capaz de reproducir ciertos aspectos de las enfermedades humanas. Esto facilita la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el contexto de los trastornos neurodegenerativos. Por ejemplo, en el presente estudio se ha observado la estimulación de los procesos de autofagia y mitofagia como una de las posibles dianas moleculares tras tratar a cepas transgénicas de *C. elegans* con expresión de A β (CL4176) o p-Tau (BR5270) con EC o Q (Figuras 26, 35 y 36). Adicionalmente, *C. elegans* ofrece un bajo coste y una investigación más rápida antes de invertir en modelos más caros que necesiten de validación por comités de ética (Mudd & Liceaga, 2022).

Tras observar los efectos neuroprotectores de los flavonoides EC y Q, así como sus posibles mecanismos de acción en las cepas transgénicas de *C. elegans* que modelan los dos marcadores principales de la EA (A β o p-Tau), el siguiente objetivo fue analizar su capacidad y la de sus metabolitos para atravesar la barrera hematoencefálica utilizando la línea celular endotelial hCMEC/D3. Aunque *C. elegans* es un modelo altamente utilizado para estudiar neurodegeneración, como se ha indicado, carece de BHE, por tanto, son necesarios estudios complementarios que consideren la capacidad de los compuestos ensayados con el nematodo *C. elegans* para atravesar esta barrera. Además, a pesar de las evidencias que apuntan a los flavonoides como moléculas neuroprotectoras por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, suelen presentar una baja biodisponibilidad, ya que se absorben de forma limitada en el intestino y son extensamente biotransformados por enzimas de fase I y fase II.

Aproximadamente el 90 % de los flavonoides ingeridos pasan al colon, donde pueden ser degradados por la microbiota, generando ácidos fenólicos de menor peso molecular que podrían ejercer efectos locales y también pasar a la circulación sanguínea y ser distribuidos a diferentes tejidos, entre ellos, el cerebro. Estudios recientes han confirmado que las actividades biológicas de los compuestos fenólicos podrían estar, al menos en parte, mediadas por los metabolitos producidos por la flora colónica (Hu et al., 2025; Kwon et al., 2023).

En el presente estudio, se analizó la permeabilidad a través de la línea hCMEC/D3, utilizada como modelo de BHE, de epicatequina, quercetina y sus derivados metilados, tamarixetina e isorhamnetina, así como de distintos ácidos fenólicos que podrían resultar del metabolismo microbiano de flavonoides (ácidos protocatéquico, vanílico, dihidroxifenilacético, 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, cafeico y dihidrocafeico). Estos compuestos mostraron una eficacia de transporte (ET), a las tres horas de incubación de las células en su presencia, entre el 48 y el 63 % a excepción de los metilados de Q (TAM e ISO) en la que se observó una ET menor (inferior al 8 %) (Tabla 8, Figura 45).

La baja biodisponibilidad oral de los flavonoides se ha asociado a una pobre absorción intestinal y la rápida conjugación de sus grupos hidroxilo libres por glucuronidación y sulfatación; por su parte, la metilación se utiliza para bloquear grupos hidroxilo libres y evitar así su conjugación como vía principal de biotransformación, mejorando así la estabilidad metabólica y la permeabilidad de los flavonoides en comparación con el compuesto original no metilados (Naeem et al., 2022). Sin embargo, la baja ET detectada en nuestro estudio para los metilados TAM e ISO difiere de esa premisa y también de lo reportado por otros autores (Faria et al., 2014). Esto podría ser debido a que el tiempo de recogida de muestras de la zona basolateral de los pocillos (tres horas) no fuese suficiente para que ambos compuestos cruzaran las monocapas hCMEC/D3, sino que se quedaran dentro de las células. De hecho, el resultado de sumar la concentración cuantificada en el lado apical y el lado basolateral a las 3 horas para esos flavonoides metilados fue inferior al 40 %. En el extremo opuesto, los ácidos PCA, VA y 3-4HPA mostraron una ET superior al 60 %, siendo los más permeables de los compuestos ensayados (Tabla 8, Figura 45). Ciertamente, el grado de permeabilidad de cada compuesto puede ser variable, por lo que serían necesarios más estudios para contrastar los resultados (Liu et al., 2025).

Las observaciones realizadas apoyan la noción de que la microbiota intestinal podría actuar como mediador clave en los efectos beneficiosos de una dieta rica en flavonoides, incluida la neuroprotección, generando metabolitos bioactivos, como los ácidos fenólicos. Por ello, los efectos biológicos de los metabolitos fenólicos derivados de la interacción con la microbiota deberían estudiarse más ampliamente. Como contribución preliminar a ese conocimiento, en esta tesis doctoral se estudió el efecto de los metabolitos que presentaron mayor ET (PCA, VA y 3-4HPA) en la cepa BR5270 de *C. elegans* (modelo p-Tau). Se observaron mejoras en la capacidad olfatoria, determinada mediante índice de quimiotaxis, de los nematodos tratados con PCA o VA 300 μ M y con 3-4HPA a 200 μ M (Figura 46). Además, también se observó un aumento en la vida media de los nematodos tratados con PCA 300 μ M (Figura 47). Estos resultados son prometedores y constituyen un punto de partida para futuras investigaciones que contribuyan al conocimiento de los efectos neuroprotectores de los metabolitos fenólicos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Finalmente, se debe tener en consideración las limitaciones del uso de modelos *in vitro* para estudiar la capacidad de los compuestos fenólicos para atravesar la BHE. Se necesitan más estudios para desarrollar sistemas que simulen esta barrera en condiciones patológicas como las que se dan en la EA y estudiar, además del transporte de compuestos bioactivos, los efectos protectores sobre las células endoteliales en condiciones de daño por A β o p-Tau (Alahmari, 2021). Por otro lado, los datos de concentración fenólica en cerebro y líquido cefalorraquídeo humanos son limitados por la naturaleza altamente invasiva del muestreo del SNC, por lo que la mayoría de las evidencias provienen de modelos *in vitro* o animales. La necesidad de datos humanos sigue siendo significativa, ya que ninguna otra herramienta puede replicar plenamente los conocimientos obtenidos a partir de ellos (Rendeiro et al., 2015). Sin embargo, aunque aún estamos lejos de definir las concentraciones de compuestos bioactivos efectivas en humanos, los resultados discutidos en la presente tesis doctoral contribuyen a la evidencia en la que se considera a los compuestos fenólicos como moléculas que podrían proteger frente a los trastornos neurodegenerativos.

V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con epicatequina o quercetina de cepas transgénicas de *Caenorhabditis elegans* modelo de la Enfermedad de Alzheimer condujo a un aumento en la supervivencia, preservación de la función neuronal y retraso en la disminución progresiva de la movilidad de los nematodos. Estos resultados sugieren un posible efecto neuroprotector de ambos flavonoides frente a la toxicidad inducida por la acumulación de péptido β -amiloide o de proteína Tau hiperfosforilada, los dos marcadores principales de la EA.
2. Epicatequina y quercetina, independientemente de la cepa modelo ensayada, activaron la expresión de genes relacionados con mecanismos celulares clave como la autofagia, fundamental en la eliminación de componentes celulares dañados o proteínas mal plegadas. La estimulación de dichos mecanismos podría contribuir al mantenimiento de la homeostasis proteica y a la reducción del estrés proteotóxico asociados a la acumulación de A β y p-Tau.
3. Se encontraron diferencias en el tipo de autofagia activado en cada modelo. Mientras que frente a la toxicidad inducida por A β parece predominar la degradación mediada por chaperonas, la eliminación de p-Tau podría producirse por mecanismos vinculados a mitofagia y formación de autofagosomas. Adicionalmente, EC mostró su potencial como compuesto modulador de la síntesis de tubulina, lo que podría favorecer la estabilidad de los microtúbulos y ralentizar el desarrollo de la neurodegeneración.
4. Las diferencias observadas en los perfiles de expresión génica entre EC y Q sugieren que distintos compuestos fenólicos pueden actuar sobre dianas moleculares diferentes dentro de una misma ruta metabólica.
5. Epicatequina, quercetina y ácidos fenólicos resultantes del metabolismo microbiano de flavonoides mostraron capacidad para atravesar células de la línea hCMEC/D3, utilizada como modelo de barrera hematoencefálica, sugiriendo el potencial de estos compuestos para alcanzar el sistema nervioso central.
6. La mejora de las alteraciones neuronales y el aumento de la longevidad observados en nematodos del modelo p-Tau tratados con ácidos fenólicos refuerza el papel de metabolitos producidos por la microbiota intestinal como mediadores en los efectos neuroprotectores de los flavonoides.
7. Los resultados de esta tesis doctoral, considerados en su conjunto, respaldan el potencial neuroprotector de los compuestos fenólicos frente al deterioro cognitivo y aportan nuevas claves para la comprensión de sus mecanismos moleculares.

V. CONCLUSIONS

1. Treatment of transgenic *Caenorhabditis elegans* strains, a model of Alzheimer's disease, with epicatechin or quercetin led to increased survival, preservation of neuronal function, and a delay in the progressive decline in nematode mobility. These results suggest a possible neuroprotective effect of both flavonoids against the toxicity induced by the accumulation of β -amyloid peptide or hyperphosphorylated Tau protein, the two main hallmarks of Alzheimer's disease.
2. Epicatechin and quercetin, regardless of the *C. elegans* model, upregulated the expression of genes related to key cellular mechanisms such as autophagy, which is essential for the elimination of damaged cellular components or misfolded proteins. Stimulation of these mechanisms could contribute to the maintenance of protein homeostasis and the reduction of proteotoxic stress associated with the accumulation of A β and p-Tau.
3. Differences were found in the type of autophagy activated in each model. While chaperone-mediated autophagy appears to be the predominant mechanism of degradation against A β -induced toxicity, p-Tau elimination occurs through mechanisms linked to mitophagy and autophagosome formation. Additionally, EC showed potential as a modulator of tubulin synthesis, which could promote microtubule stability and slow the progression of neurodegeneration.
4. The observed differences in gene expression profiles between EC and Q suggest that distinct phenolic compounds can act on different molecular targets within the same metabolic pathway.
5. Epicatechin, quercetin, and phenolic acids resulting from the microbial metabolism of flavonoids showed the ability to cross hCMEC/D3 cell line, used as a model of the blood-brain barrier, suggesting the potential of these compounds to reach the central nervous system.
6. The improvement in neuronal alterations and the increased longevity observed in p-Tau model nematodes treated with phenolic acids reinforces the role of metabolites produced by the gut microbiota as mediators in the neuroprotective effects of flavonoids.
7. As a whole, the results of this doctoral thesis support the neuroprotective potential of phenolic compounds against cognitive decline and provide new insights into their molecular mechanisms.

VI. REFERENCIAS

VI. REFERENCIAS

- Abyadeh, M., Gupta, Vivek, Paulo, J.A., Mahmoudabad, A.G., Shadfar, S., Mirshahvaladi, S., Gupta, Veer, Nguyen, C.T.O., Finkelstein, D.I., You, Y., Haynes, P.A., Salekdeh, G.H., Graham, S.L., Mirzaei, M. (2024). Amyloid-beta and tau protein beyond Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 19(6), 1262-1276. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.386406>
- Aguzzoli, C.S., Anstey, K.J., Atri, A., Barbarino, P., Benoist, C., Brijnath, B., Bruno, M.A., Cose, L., Darge, D., Dean, W., Epenge, E., Ettenes, P., Farin, F., Farina, N., Fletcher, J.R., Godoy, C., Hassan, E., Ive, N., Kim, S., et al. (2024). World Alzheimer Report 2024: *Global changes in attitudes to dementia*. *Alzheimer's Disease International*.
- Ahringer, J., Gasser, S.M. (2018). Repressive Chromatin in *Caenorhabditis elegans*: Establishment, Composition, and Function. *Genetics*, 208(2), 491. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300386>
- Ajoolabady, A., Lindholm, D., Ren, J., Pratico, D. (2022). ER stress and UPR in Alzheimer's disease: mechanisms, pathogenesis, treatments. *Cell Death & Disease*, 13(8), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05153-5>
- Alahmari, A. (2021). Blood-Brain Barrier Overview: Structural and Functional Correlation. *Neural Plasticity*, 6564585. <https://doi.org/10.1155/2021/6564585>
- Alami, M., Boumezough, K., Zerif, E., Zoubdane, N., Khalil, A., Bunt, T., Laurent, B., Witkowski, J. M., Ramassamy, C., Boulbaroud, S., Fulop, T., Berrougui, H. (2024). *In vitro* assessment of the neuroprotective effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols against tau phosphorylation, neuroinflammation, and oxidative stress. *Nutrients*, 16(21), 3667. <https://doi.org/10.3390/nu16213667/s1>
- Allen, B., Ingram, E., Takao, M., Smith, M.J., Jakes, R., Virdee, K., Yoshida, H., Holzer, M., Craxton, M., ... Goedert, M. (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S Tau protein. *Journal of Neuroscience*, 22(21), 9340–9351. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-21-09340.2002>
- Altintas, O., Park, S., Lee, S.J.V. (2016). The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity of model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports*, 49(2), 81. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2016.49.2.261>
- Altun, Z.F., Hall, D.H. (2009). Hermaphrodite Handbook - Introduction to *C. elegans* anatomy. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1>
- Alzheimer's association report (2024). 2024 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 20(5), 3708-3821. <https://doi.org/10.1002/alz.13809>
- Alzheimer's association report (2025). 2025 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 21(4), e70235. <https://doi.org/10.1002/alz.70235>
- Aman, Y., Schmauck-Medina, T., Hansen, M., Morimoto, R.I., Simon, A.K., Bjedov, I., Palikaras, K., Simonsen, A., Johansen, T., Tavernarakis, N., Rubinsztein, D.C., Partridge, L., Kroemer, G., Labbadia, J., Fang, E.F. (2021). Autophagy in healthy aging and disease. *Nature Aging*, 1(8), 634-650. <https://doi.org/10.1038/s43587-021-00098-4>
- Amiri, B., Yazdani Tabrizi, M., Naziri, M., Moradi, F., Arzaghi, M., Archin, I., Behaein, F., Bagheri Pour, A., Ghannadikhosh, P., Imanparvar, S., Akhtari Kohneshahri, A., Sanaye Abbasi, A., Zerangian, N., Alijanzadeh, D., Ghayyem, H., Azizinezhad, A., Ahmadpour Youshanlui, M., Poudineh, M. (2024). Neuroprotective effects of flavonoids: endoplasmic reticulum as the target. *Frontiers in Neuroscience*, 18, 1348151. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1348151/full>
- Anh Phan, D.T., Tran, H.T., Le, H.P., Khuong, T.H., Ha, H.T., Nguyen, D.T., Nguyen, G.T., Le, M. Van, Ly, T.H. (2024). Exploring the therapeutic potential of *Camellia longii* Orel & Luu leaf extracts for memory loss in Alzheimer's disease: Novel findings and functional food applications. *ACS Omega*, 9(27), 29651. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02980>
- Arias-Sánchez, R.A., Torner, L., Fenton Navarro, B. (2023). Polyphenols and neurodegenerative diseases: Potential effects and mechanisms of neuroprotection. *Molecules*, 28(14), 5415. <https://doi.org/10.3390/molecules28145415>
- Asadi, Y., Moundounga, R.K., Chakroborty, A., Pokokiri, A., Wang, H. (2025). FOXOs and their roles in acute and chronic neurological disorders. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 12, 1538472. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2025.1538472>
- Asl, S.S., Bergen, H., Ashtari, N., Amiri, S., tos, M.J., Mehdizadeh, M. (2019). Pelargonidin exhibits restoring effects against amyloid β -induced deficits in the hippocampus of male rats. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, 33(1), 135. <https://doi.org/10.34171/mjiri.33.135>
- Avery, L., Shtonda, B.B. (2003). Food transport in the *C. elegans* pharynx. *The Journal of Experimental Biology*, 206(14), 2441-2457. <https://doi.org/10.1242/jeb.00433>

- Avila, D.S., Benedetto, A., Au, C., Bornhorst, J., Aschner, M. (2016). Involvement of heat shock proteins on Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 17(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0097-2>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Gil-Sánchez, I., Victoria Moreno-Arribas, M., Bartolomé, B., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2019a). Antioxidant characterization and biological effects of grape pomace extracts supplementation in *Caenorhabditis elegans*. *Foods*, 8(2), 75. <https://doi.org/10.3390/foods8020075>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a model organism to evaluate the antioxidant effects of phytochemicals. *Molecules*, 25, 3194. <https://doi.org/10.3390/molecules25143194>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Miranda-Vizuete, A., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2019b). Epicatechin modulates stress-resistance in *C. Elegans* via insulin/IGF-1 signaling pathway. *PLoS ONE*, 14(1), e0199483. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199483>
- Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., Miranda-Vizuete, A., Sánchez-Hernández, E., Romero, M.R., Dueñas, M., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2019c). Exploring target genes involved in the effect of quercetin on the response to oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants*, 8(12), 585. <https://doi.org/10.3390/antiox8120585>
- Azlan, U.K., Khairul Annuar, N.A., Mediani, A., Aizat, W.M., Damanhuri, H.A., Tong, X., Yanagisawa, D., Tooyama, I., Wan Ngah, W.Z., Jantan, I., Hamezah, H.S. (2023). An insight into the neuroprotective and anti-neuroinflammatory effects and mechanisms of *Moringa oleifera*. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1035220. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1035220>
- Baas, P.W., Rao, A.N., Matamoros, A.J., Leo, L. (2016). Stability properties of neuronal microtubules. *Cytoskeleton*, 73(9), 442-460. <https://doi.org/10.1002/cm.21286>
- Bacaj, T., Shaham, S. (2007). Temporal control of cell-specific transgene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 176(4), 2651. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074369>
- Baev, A.Y., Vinokurov, A.Y., Novikova, I.N., Dremine, V.V., Potapova, E.V., Abramov, A.Y. (2022). Interaction of mitochondrial calcium and ROS in neurodegeneration. *Cells*, 11(4), 706. <https://doi.org/10.3390/cells11040706>
- Bai, R., Guo, J., Ye, X.Y., Xie, Y., Xie, T. (2022). Oxidative stress: The core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 77, 101619. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101619>
- Baier, A., Szyszka, R. (2020). Compounds from natural sources as protein kinase inhibitors. *Biomolecules*, 10(11), 1546. <https://doi.org/10.3390/biom10111546>
- Baker, J.D., Uhrich, R.L., Strovass, T.J., Saxton, A.D., Kraemer, B.C. (2021). AlphaScreen identifies MSUT2 inhibitors for tauopathy-targeting therapeutic discovery. *SLAS Discovery*, 26(3), 400-409. <https://doi.org/10.1177/2472555220958387>
- Baky, M.H., Elshahed, M., Wessjohann, L., Farag, M.A. (2022). Interactions between dietary flavonoids and the gut microbiome: a comprehensive review. *British Journal of Nutrition*, 128(4), 577-591. <https://doi.org/10.1017/s0007114521003627>
- Ballatore, C., Brunden, K.R., Hurn, D.M., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. Y., Smith, A.B. (2012). Microtubule stabilizing agents as potential treatment for Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(21), 8979-8996. <https://doi.org/10.1021/jm301079z>
- Banerjee, A., Thekkekkara, D., Manjula, S.N., Nair, S.P., Lalitha, M.S. (2025). Correlation of autophagy and Alzheimer's disease with special emphasis on the role of phosphodiesterase-4. *3 Biotech*, 15(5), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s13205-025-04306-5>
- Barage, S.H., Sonawane, K.D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Bargmann, C.I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. *Wormbook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>
- Bargmann, C.I., Hartwig, E., Robert Horvitz, H. (1993). Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell*, 74(3), 515-527. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80053-h](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80053-h)
- Barrière, A., Félix, M.A. (2014). Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.115.2>

- Bedse, G., Di Domenico, F., Serviddio, G., Cassano, T. (2015). Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: Current knowledge. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 204. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00204>
- Bellezza, I., Grottelli, S., Mierla, A.L., Cacciatore, I., Fornasari, E., Roscini, L., Cardinali, G., Minelli, A. (2014). Neuroinflammation and endoplasmic reticulum stress are coregulated by cyclo(His-Pro) to prevent LPS neurotoxicity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 51(1), 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.023>
- Berner, N., Reutter, K.R., Wolf, D.H. (2018). Protein quality control of the endoplasmic reticulum and ubiquitin-proteasome-triggered degradation of aberrant proteins: Yeast pioneers the path. *Annual Review Biochemistry*, 87, 751-782. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012749>
- Birla, H., Minocha, T., Kumar, G., Misra, A., Singh, S.K. (2020). Role of oxidative stress and metal Toxicity in the progression of Alzheimer's disease. *Current Neuropharmacology*, 18(7), 552-562. <https://doi.org/10.2174/1570159x18666200122122512>
- Bishop, N.A., Lu, T., Yankner, B.A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464, 529-535. <https://doi.org/10.1038/nature08983>
- Boche, D., Gordon, M.N. (2022). Diversity of transcriptomic microglial phenotypes in aging and Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 18(2), 360-376. <https://doi.org/10.1002/alz.12389>
- Borboldis, F., Kteniadaki, M., Palikaras, K. (2024). MEC-12/alpha tubulin regulates mitochondrial distribution and mitophagy during oxidative stress in *C. elegans*. *MicroPublication Biology*. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.001232>
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186, 343-355. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I)
- Brandes, M.S., Gray, N.E. (2020). NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *ASN Neuro*, 12(1), 1759091419899782. <https://doi.org/10.1177/1759091419899782>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Brickman, A.M., Yeung, L.K., Alschuler, D.M., Ottaviani, J.I., Kuhnle, G.G.C., Sloan, R.P., Luttmann-Gibson, H., Copeland, T., Schroeter, H., Sesso, H.D., Manson, J.A.E., Wall, M., Small, S.A. (2023). Dietary flavanols restore hippocampal-dependent memory in older adults with lower diet quality and lower habitual flavanol consumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(23), e2216932120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2216932120>
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142, 13659. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
- Burak, C., Brüll, V., Langguth, P., Zimmermann, B.F., Stoffel-Wagner, B., Sausen, U., Stehle, P., Wolfram, S., Egert, S. (2017). Higher plasma quercetin levels following oral administration of an onion skin extract compared with pure quercetin dihydrate in humans. *European Journal of Nutrition*, 56(1), 343-353. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1084-x>
- Burman, C., Ktistakis, N.T. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Letters*, 584(7), 1302-1312. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.011>
- Butterfield, D.A., Boyd-Kimball, D., Reed, T.T. (2023). Cellular stress response (hormesis) in response to Bioactive nutraceuticals with relevance to Alzheimer disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, 38(7-9), 643-669. <https://doi.org/10.1089/ars.2022.0214>
- Cai, Q., Tammineni, P. (2016). Alterations in mitochondrial quality control in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 24. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00024>
- Calderaro, A., Patanè, G.T., Tellone, E., Barreca, D., Ficarra, S., Misiti, F., Laganà, G. (2022). The neuroprotective potentiality of flavonoids on Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14835. <https://doi.org/10.3390/ijms232314835>
- Callens, M., Loncke, J., Bultynck, G. (2022). Dysregulated Ca²⁺ homeostasis as a central theme in neurodegeneration: Lessons from Alzheimer's Disease and Wolfram Syndrome. *Cells*, 11(12), 1963. <https://doi.org/10.3390/cells11121963>
- Calsolaro, V., Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's and Dementia*, 12(6), 719-732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>

- Campanella, C., Pace, A., Bavisotto, C.C., Marzullo, P., Gammazza, A.M., Buscemi, S., Piccionello, A.P. (2018). Heat shock proteins in Alzheimer's Disease: Role and targeting. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2603. <https://doi.org/10.3390/ijms19092603>
- Cárdenas-Castro, A.P., Rochín-Medina, J.J., Ramírez, K., Tovar, J., Sáyo-Ayerdi, S.G. (2022). *In vitro* intestinal bioaccessibility and colonic biotransformation of polyphenols from mini bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 77(1), 77-82. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00948-5>
- Carecho, R., Carregosa, D., dos Santos, C.N. (2021). Low molecular weight (poly)phenol metabolites across the Blood-Brain Barrier: The underexplored journey. *Brain Plasticity*, 6(2), 193. <https://doi.org/10.3233/bpl-200099>
- Carrera, I., Corzo, L., Martínez-Iglesias, O., Naidoo, V., Cacabelos, R. (2025). Preventive role of cocoa-enriched extract against neuroinflammation in mice. *Neurology International*, 17(4), 47. <https://doi.org/10.3390/neurolint17040047>
- Cassidy, A., Minihane, A.M. (2017). The role of metabolism (and the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(1), 10-22. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.136051>
- Cavalcante, G.C., Schaan, A.P., Cabral, G.F., Santana-da-Silva, M.N., Pinto, P., Vidal, A.F., Ribeiro-dos-Santos, Â. (2019). A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4133. <https://doi.org/10.3390/ijms20174133>
- Chalfie, M., Yuan, T., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chen, C., Zheng, Y., Wu, T., Wu, C., Cheng, X. (2016). Oral administration of grape seed polyphenol extract restores memory deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats. *Behavioural Pharmacology*, 28(2-3), 207-213. <https://doi.org/10.1097/fbp.0000000000000276>
- Chen, G., Su, Y., Chen, S., Lin, T., Lin, X. (2025). Polyphenols and Alzheimer's disease: A review on molecular and therapeutic insights with *in silico* support. *Food Science and Nutrition*, 13(9), e70496. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70496>
- Chen, G.F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y.R., Jiang, Y., Melcher, K., Xu, H.E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205-1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, J., Deng, X., Liu, N., Li, M., Liu, B., Fu, Q., Qu, R., Ma, S. (2016). Quercetin attenuates tau hyperphosphorylation and improves cognitive disorder via suppression of ER stress in a manner dependent on AMPK pathway. *Journal of Functional Foods*, 22, 463-476. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.036>
- Chen, L., Teng, H., Xie, Z., Cao, H., Cheang, W.S., Skalicka-Woniak, K., Georgiev, M.I., Xiao, J. (2018). Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure-activity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(4), 513-527. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1196334>
- Chen, W., Lin, H. R., Wei, C. M., Luo, X. H., Sun, M. L., Yang, Z. Z., Chen, X. Y., & Wang, H. B. (2018). Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *Cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A β -induced toxicity. *Biogerontology*, 19, 47-65. <https://doi.org/10.1007/s10522-017-9738-0>
- Chen, W., Zhu, X., Lu, Q., Zhang, L., Wang, X., Liu, R. (2020). C-ring cleavage metabolites of catechin and epicatechin enhanced antioxidant activities through intestinal microbiota. *Food Research International*, 135, 109271. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109271>
- Chen, Z.P., Sun, J., Chen, H.X., Xiao, Y.Y., Liu, D., Chen, J., Cai, H., Cai, B.C. (2010). Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of *Ginkgo biloba* extracts, *Ginkgo biloba* extract phospholipid complexes and *Ginkgo biloba* extract solid dispersions in rats. *Fitoterapia*, 81(8), 1045-1052. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.028>
- Cheng, C.F., Cheng, E., Ku, H.C. (2025). Roles of endoplasmic reticulum stress and activating transcription factors in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Tzu Chi Medical Journal*, 37(1), 10-16. https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_51_24
- Cheng, J.-J., Guo, Q., Wu, X.-G., MA, S., Gao, Y., Ya-Zhen, S. (2020). *Scutellaria barbata* flavonoids improve the composited A β -induced abnormal changes in glial cells of the brains of rats. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 25(1), 64-76. <https://doi.org/10.2174/1386207323666201209092358>
- Cheng, T., Wang, W., Li, Q., Han, X., Xing, J., Qi, C., Lan, X., Wan, J., Potts, A., Guan, F., Wang, J. (2015). Cerebroprotection of flavanol (-)-epicatechin after traumatic brain injury via Nrf2-dependent and -independent pathways. *Free Radical Biology & Medicine*, 92, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.027>

- Chi, H., Chang, H. Y., Sang, T.K. (2018). Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3082. <https://doi.org/10.3390/ijms19103082>
- Chisholm, A.D., Hardin, J. (2005). Epidermal morphogenesis. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.35.1>
- Choi, E.H., Kim, M.H., Park, S.J. (2024). Targeting mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species for neurodegenerative disease treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14), 7952. <https://doi.org/10.3390/ijms25147952>
- Choi, G.Y., Lee, I.S., Moon, E., Choi, H., Je, A.R., Park, J.H., Kweon, H.S. (2024). Ameliorative effect of vanillic acid against scopolamine-induced learning and memory impairment in rat via attenuation of oxidative stress and dysfunctional synaptic plasticity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 177, 117000. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117000>
- Chong, F.P., Ng, K.Y., Koh, R.Y., Chye, S.M. (2018). Tau proteins and tauopathies in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(5), 965-980. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0574-1>
- Clark, D.O., Xu, H., Tangney, C.C., Lin, A.W., Risacher, S.L., Saykin, A.J., Considine, R.V., Garringer, H.J., Moser, L., Carter, A., Miller, C.M., Sprague, B., Callahan, C.M., Unverzagt, F.W. (2025). Feasibility of lifestyle interventions for cognition in adults with low education. *Alzheimer's and Dementia*, 21(5), e70232. <https://doi.org/10.1002/alz.70232>
- Clifford, M.N. (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, 70(12), 1103-1114. <https://doi.org/10.1055/s-2004-835835>
- Cobley, J.N., Fiorello, M.L., Bailey, D.M. (2018). 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biology*, 15, 490-503. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.008>
- Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R.M., Kelly, J.W., & Dillin, A. (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*, 313(5793), 1604-1610. <https://doi.org/10.1126/science.1124646>
- Colizzi, C. (2019). The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 5, 184-196. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.09.002>
- Colonna, M., Butovsky, O. (2017). Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35, 441-468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- Corsi, A.K., Wightman, B., Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK299460/>
- Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M.V. (2017). An integrated view of the effects of wine polyphenols and their relevant metabolites on gut and host health. *Molecules*, 22(1), 99. <https://doi.org/10.3390/molecules22010099>
- Cummings, R.D., Esko, J.D. (2009). Nematoda. *Essentials of Glycobiology*. Chapter 23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk1930/>
- Currey, H.N., Kraemer, B.C., & Liachko, N.F. (2023). *sut-2* loss of function mutants protect against tau-driven shortened lifespan and hyperactive pharyngeal pumping in a *C. elegans* model of tau toxicity. *MicroPublication Biology*. <https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000844>
- Cyske, Z., Gaffke, L., Pierzynowska, K., Węgrzyn, G. (2023). Tubulin cytoskeleton in neurodegenerative diseases-not only primary tubulinopathies. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 43(5), 1867-1884. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01304-6>
- D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*, 17(3), 611-625. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9568-y>
- D'Arcy, M.S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- D'Arcy, M.S. (2022). A review of biologically active flavonoids as inducers of autophagy and apoptosis in neoplastic cells and as cytoprotective agents in non-neoplastic cells. *Cell Biology International*, 46(8), 1179-1195. <https://doi.org/10.1002/cbin.11813>
- D'Errico, P., Ziegler-Waldkirch, S., Aires, V., Hoffmann, P., Mezö, C., Erny, D., Monasor, L.S., Liebscher, S., Ravi, V.M., Joseph, K., Schnell, O., Kierdorf, K., Staszewski, O., Tahirovic, S., Prinz, M., Meyer-Luehmann, M. (2022). Microglia contribute to the propagation of A β into unaffected brain tissue. *Nature Neuroscience*, 25, 20-25. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00951-0>

- Dai, Y., Wang, Y., Kang, Q., Wu, Y., Liu, Y., Su, Y., Wang, X., Xiu, M., He, J. (2024). The protective effect and bioactive compounds of *Astragalus membranaceus* against neurodegenerative disorders via alleviating oxidative stress in *Drosophila*. *FASEB Journal*, 38(13), e23727. <https://doi.org/10.1096/fj.202400390r>
- Daily, J.W., Kang, S., Park, S. (2021). Protection against Alzheimer's disease by luteolin: Role of brain glucose regulation, anti-inflammatory activity, and the gut microbiota-liver-brain axis. *BioFactors*, 47(2), 218-231. <https://doi.org/10.1002/biof.1703>
- Dani, M., Wood, M., Mizoguchi, R., Fan, Z., Walker, Z., Morgan, R., Hinz, R., Biju, M., Kuruvilla, T., Brooks, D.J., Edison, P. (2018). Microglial activation correlates *in vivo* with both tau and amyloid in Alzheimer's disease. *Brain*, 141(9), 2740-2754. <https://doi.org/10.1093/brain/awy188>
- Dash, U.C., Bhol, N.K., Swain, S.K., Samal, R.R., Nayak, P.K., Raina, V., Panda, S.K., Kerry, R.G., Duttaroy, A.K., Jena, A.B. (2024). Oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of neurological disorders: Mechanisms and implications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 15(1), 15-34. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.10.004>
- Datta, S., Ghosh, S., Bishayee, A., Sinha, D. (2022). Flexion of Nrf2 by tea phytochemicals: A review on the chemopreventive and chemotherapeutic implications. *Pharmacological Research*, 182, 106319. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106319>
- Davies, D.S., Ma, J., Jegathees, T., Goldsbury, C. (2017). Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 27(6), 795-808. <https://doi.org/10.1111/bpa.12456>
- Day, A.J., Gee, J.M., DuPont, M.S., Johnson, I.T., Williamson, G. (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*, 65(7), 1199-1206. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00039-x)
- De la Monte, S.M. (2017). Insulin resistance and neurodegeneration: Progress towards the development of new therapeutics for Alzheimer's disease. *Drugs*, 77(1), 47-65. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0674-0>
- De la Rosa, A., Olaso-Gonzalez, G., Arc-Chagnaud, C., Millan, F., Salvador-Pascual, A., García-Lucerga, C., Blasco-Lafarga, C., Garcia-Dominguez, E., Carretero, A., Correas, A.G., Viña, J., Gomez-Cabrera, M.C. (2020). Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Sport and Health Science*, 9(5), 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.01.004>
- De Roeck, A., Van Broeckhoven, C., Sleegers, K. (2019). The role of ABCA7 in Alzheimer's disease: evidence from genomics, transcriptomics and methylomics. *Acta Neuropathologica*, 138(2), 201-220. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01994-1>
- Del Rio, D., Calani, L., Cordero, C., Salvatore, S., Pellegrini, N., Brighenti, F. (2010). Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition*, 26(11-12), 1110-1116. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.09.021>
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14), 1818-1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Dewanjee, S., Chakraborty, P., Bhattacharya, H., Chacko, L., Singh, B., Chaudhary, A., Javvaji, K., Pradhan, S.R., Vallamkondu, J., Dey, A., Kalra, R.S., Jha, N.K., Jha, S.K., Reddy, P.H., Kandimalla, R. (2022). Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 193, 134-157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.032>
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., Restani, P. (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 273. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>
- Di Meco, A., Curtis, M.E., Lauretti, E., Praticò, D. (2020). Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease: Mechanistic insights and new therapeutic opportunities. *Biological Psychiatry*, 87(9), 797-807. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2019.05.008>
- Di Meo, S., Reed, T.T., Venditti, P., Victor, V.M. (2016). Role of ROS and RNS Sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1245049. <https://doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Dias, D., Socodato, R. (2025). Beyond amyloid and tau: The critical role of microglia in Alzheimer's disease therapeutics. *Biomedicine*, 13(2), 279. <https://doi.org/10.3390/biomedicine13020279>
- Dias, M.C., Pinto, D.C.G.A., Silva, A.M.S., Giovinazzo, G., Gerardi, C., Mosca, L. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Dikic, I., Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349-364. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>

- Dilberger, B., Weppeler, S., Eckert, G.P. (2021). Phenolic acid metabolites of polyphenols act as inducers for hormesis in *C. elegans*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 198, 111518. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111518>
- Domínguez-López, I., Galkina, P., Parilli-Moser, I., Arancibia-Riveros, C., Martínez-González, M.Á., Salas-Salvadó, J., Corella, D., Malcampo, M., Martínez, J.A., Tojal-Sierra, L., Wärnberg, J., Vioque, J., ... Lamuela-Raventós, R.M. (2024). Microbial phenolic metabolites are associated with improved cognitive health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 68(2), 2300183. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300183>
- Dong, Y., Yu, H., Li, X., Bian, K., Zheng, Y., Dai, M., Feng, X., Sun, Y., He, Y., Yu, B., Zhang, H., Wu, J., Yu, X., Wu, H., Kong, W. (2022). Hyperphosphorylated tau mediates neuronal death by inducing necroptosis and inflammation in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 19(1), 205. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02567-y>
- Dong, Y., Zhuang, X.X., Wang, Y.T., Tan, J., Feng, D., Li, M., Zhong, Q., Song, Z., Shen, H.M., Fang, E.F., Lu, J.H. (2023). Chemical mitophagy modulators: Drug development strategies and novel regulatory mechanisms. *Pharmacological Research*, 194, 106835. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106835>
- Dosanji, L.E., Brown, M.K., Rao, G., Link, C.D., Luo, Y. (2010). Behavioral phenotyping of a transgenic *Caenorhabditis elegans* expressing neuronal amyloid- β . *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(2), 681-690. <https://doi.org/10.3233/jad-2010-1267>
- Dourlen, P., Kilinc, D., Malmarche, N., Chapuis, J., Lambert, J.C. (2019). The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathologica*, 138(2), 221-236. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02004-0>
- Drachman, D.A. (2014). The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 10(3), 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.11.003>
- Drake, J., Link, C.D., Butterfield, D.A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid β -peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 415-420. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00225-7](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00225-7)
- Dresselhaus, E.C., Meffert, M.K. (2019). Cellular specificity of NF- κ B function in the nervous system. *Frontiers in Immunology*, 10, 1043. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01043>
- Du, Z., Li, M., Ren, J., Qu, X. (2021). Current strategies for modulating A β aggregation with multifunctional agents. *Accounts of Chemical Research*, 54(9), 2172-2184. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00055>
- Duangjan, C., Rangsinth, P., Zhang, S., Gu, X., Wink, M., Tencomnao, T. (2021). Neuroprotective effects of *Glochidion zeylanicum* leaf extract against H₂O₂/glutamate-induced toxicity in cultured neuronal cells and A β -induced toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biology*, 10(8), 800. <https://doi.org/10.3390/biology10080800>
- Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 443-449. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.04.007>
- Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B. (2015). A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed Research International*, 2015, 850902. <https://doi.org/10.1155/2015/850902>
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Gómez-Orte, E., Cabello, J., Santos-Buelga, C. (2013). Deglycosylation is a key step in biotransformation and lifespan effects of quercetin-3-O-glucoside in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmacological Research*, 76, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.07.001>
- Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology*, 232(1), 103-111. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1363-y>
- Edwards, G.A., Gamez, N., Escobedo, G., Calderon, O., Moreno-Gonzalez, I. (2019). Modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 146. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00146>
- Eisermann, D.J., Wenzel, U., Fitzenberger, E. (2017). Inhibition of chaperone-mediated autophagy prevents glucotoxicity in the *Caenorhabditis elegans mev-1* mutant by activation of the proteasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(1), 171-175. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.043>
- Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 44(6), 817-829. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90004-8)
- Ellouze, I., Sheffler, J., Nagpal, R., Arjmandi, B. (2023). Dietary patterns and Alzheimer's Disease: An updated review linking nutrition to neuroscience. *Nutrients*, 15(14), 3204. <https://doi.org/10.3390/nu15143204>

- Emmons, S.W. (2005). Male development. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.33.1>
- Eskelinen, E.L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5-6), 495-502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005>
- Esmaili, Y., Yarjanli, Z., Pakniya, F., Bidram, E., Łos, M. J., Eshraghi, M., Klionsky, D.J., Ghavami, S., Zarrabi, A. (2022). Targeting autophagy, oxidative stress, and ER stress for neurodegenerative disease treatment. *Journal of Controlled Release*, 345, 147-175. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.001>
- Esser, D., Geleijnse, J. M., Matualatupauw, J.C., Dower, J.I., Kromhout, D., Hollman, P.C.H., Afman, L.A. (2018). Pure flavonoid epicatechin and whole genome gene expression profiles in circulating immune cells in adults with elevated blood pressure: A randomised double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS ONE*, 13(4), e0194229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194229>
- Ezzo, M., Etienne-Manneville, S. (2025). Microtubule-Targeting Agents: Advances in tubulin binding and small molecule therapy for gliomas and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(15), 7652. <https://doi.org/10.3390/ijms26157652>
- Fairlie, W.D., Perugini, M.A., Kvensakul, M., Chen, L., Huang, D.C.S., Colman, P.M. (2005). CED-4 forms a 2:2 heterotetrameric complex with CED-9 until specifically displaced by EGL-1 or CED-13. *Cell Death & Differentiation*, 13(3), 426-434. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401762>
- Fang, E.F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B.A., Kerr, J.S., Yang, B., Lautrup, S., Mahdi Hasan-Olive, M., Caponio, D., Dan, X., Rocktäschel, P., Croteau, D.L., Akbari, M., Greig, N.H., Fladby, T., Nilsen, H., Zameel Cader, M., Mattson, M.P., Tavernarakis, N., Bohr, V.A. (2019). Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 22, 401-4012. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>
- Faria, A., Meireles, M., Fernandes, I., Santos-Buelga, C., González-Manzano, S., Dueñas, M., De Freitas, V., Mateus, N., Calhau, C. (2014). Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chemistry*, 149, 190-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.095>
- Fatouros, C., Pir, G.J., Biernat, J., Padmanabhan Koushika, S., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Schmidt, E., Baumeister, R. (2012). Inhibition of tau aggregation in a novel *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy mitigates proteotoxicity. *Human Molecular Genetics*, 21(16), 3587-3603 <https://doi.org/10.1093/hmg/dds190>
- Femminella, G.D., Dani, M., Wood, M., Fan, Z., Calsolaro, V., Atkinson, R., Edginton, T., Hinz, R., Brooks, D.J., Edison, P. (2019). Microglial activation in early Alzheimer trajectory is associated with higher gray matter volume. *Neurology*, 92(12), e1331. <https://doi.org/10.1212/wnl.00000000000007133>
- Fernández, A.M., Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 13, 225-239. <https://doi.org/10.1038/nrn3209>
- Ferrari, C., Sorbi, S. (2021). The complexity of Alzheimer's disease: An evolving puzzle. *Physiological Reviews*, 101(3), 1047-1081. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2020>
- Ferruzzi, M.G., Lobo, J.K., Janle, E.M., Cooper, B., Simon, J.E., Wu, Q.L., Welch, C., Ho, L., Weaver, C., Pasinetti, G.M. (2009). Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: Implications for treatment in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 18(1), 113-124. <https://doi.org/10.3233/jad-2009-1135>
- Figueira, I., García, G., Pimpão, R.C., Terrasso, A.P., Costa, I., Almeida, A.F., Tavares, L., Pais, T.F., Pinto, P., Ventura, M.R., Filipe, A., McDougall, G.J., Stewart, D., Kim, K.S., Palmela, I., Brites, D., Brito, M.A., Brito, C., Santos, C.N. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Scientific Reports*, 7, 11456. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11512-6>
- Firdous, S.M., Khan, S.A., Maity, A. (2024). Oxidative stress-mediated neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 397, 8189-8209. <https://doi.org/10.1007/s00210-024-03188-3>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fleming, A., Bourdenx, M., Fujimaki, M., Karabiyik, C., Krause, G.J., Lopez, A., Martín-Segura, A., Puri, C., Scrivo, A., Skidmore, J., Son, S.M., Stamatakou, E., Wrobel, L., Zhu, Y., Cuervo, A.M., Rubinsztein, D.C. (2022). The different autophagy degradation pathways and neurodegeneration. *Neuron*, 110(6), 935-966. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.01.017>
- Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., Oteiza, P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 435-445. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.006>

- Fujiwara, H., Watanabe, S., Iwata, M., Ueda, S., Nobuhara, M., Wada-Kakuda, S., Misonou, H., Miyasaka, T. (2020). Inhibition of microtubule assembly competent tubulin synthesis leads to accumulation of phosphorylated tau in neuronal cell bodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 521(3), 779-785. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.10.191>
- Funamoto, S., Tagami, S., Okochi, M., Morishima-Kawashima, M. (2020). Successive cleavage of β -amyloid precursor protein by γ -secretase. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 105, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.002>
- Fung, T.C., Olson, C.A., Hsiao, E.Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, 20, 145-155. <https://doi.org/10.1038/nn.4476>
- Galindo, P., Rodríguez-Gómez, I., González-Manzano, S., Dueñas, M., Jiménez, R., Menéndez, C., Vargas, F., Tamargo, J., Santos-Buelga, C., Pérez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2012). Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via veconjugation. *PLoS ONE*, 7(3), e32673. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032673>
- Ganguly, U., Kaur, U., Chakrabarti, S.S., Sharma, P., Agrawal, B.K., Saso, L., Chakrabarti, S. (2021). Oxidative stress, neuroinflammation, and NADPH oxidase: Implications in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 7086512. <https://doi.org/10.1155/2021/7086512>
- Gao, C., Jiang, J., Tan, Y., Chen, S. (2023). Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 1-37. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01588-0>
- Gao, F., Zhang, Y., Hou, X., Tao, Z., Ren, H., Wang, G. (2020). Dependence of PINK1 accumulation on mitochondrial redox system. *Aging Cell*, 19(9), e13211. <https://doi.org/10.1111/ace1.13211>
- Gay, N.H., Phopin, K., Suwanjang, W., Songtawee, N., Ruankham, W., Wongchitrat, P., Prachayasittikul, S., Prachayasittikul, V. (2018). Neuroprotective effects of phenolic and carboxylic acids on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochemical Research*, 43, 619-636. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2463-x>
- Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., Johnson, I.T. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *The Journal of Nutrition*, 130(11), 2765-2771. <https://doi.org/10.1093/jn/130.11.2765>
- Gengyo-Ando, K., Kamiya, Y., Yamakawa, A., Kodaira, K.-ichi, Nishiwaki, K., Miwa, J., Hori, I., Hosono, R. (1993). The *C. elegans unc-18* gene encodes a protein expressed in motor neurons. *Neuron*, 11(4), 703-711. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90080-b](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90080-b)
- Gentile, M.T., Camerino, I., Ciarmiello, L., Woodrow, P., Muscariello, L., De Chiara, I., Pacifico, S. (2023). Neuro-Nutraceutical polyphenols: How far are we? *Antioxidants*, 12(3), 539. <https://doi.org/10.3390/antiox12030539>
- Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J.R., Mehrpour, M., Christofferson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.R., Kashani, H.H., Hashemi, M., Owji, A.A., Los, M.J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24-49. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>
- Godos, J., Micek, A., Mena, P., Del Rio, D., Galvano, F., Castellano, S., Grosso, G. (2024). Dietary (Poly)phenols and cognitive decline: A systematic review and meta-analysis of observational Studies. *Molecular Nutrition and Food Research*, 68(1), 2300472. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300472>
- Godoy, J.A., Lindsay, C.B., Quintanilla, R.A., Carvajal, F.J., Cerpa, W., Inestrosa, N.C. (2017). Quercetin exerts differential neuroprotective effects against H₂O₂ and A β aggregates in hippocampal neurons: the role of mitochondria. *Molecular Neurobiology*, 54, 7116-7128. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0203-x>
- Goedert, M., Baur, C.P., Ahinger, J., Jakes, R., Hasegawa, M., Spillantini, M.G., Smith, M.J., Hill, F. (1996). PTL-1, a microtubule-associated protein with tau-like repeats from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Science*, 109(11), 2661-2672. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.11.2661>
- Goel, P., Chakrabarti, S., Goel, K., Bhutani, K., Chopra, T., Bali, S. (2022). Neuronal cell death mechanisms in Alzheimer's disease: An insight. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 937133. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.937133>
- Goetzl, E.J., Boxer, A., Schwartz, J.B., Abner, E.L., Petersen, R.C., Miller, B.L., Kapogiannis, D. (2015). Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease. *Neurology*, 85(1), 40-47. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001702>
- Goldstein, D.S., Sullivan, P., Holmes, C. (2024). Cerebrospinal fluid concentration gradients of catechols in synucleinopathies. *Journal of Neurochemistry*, 168(9), 2926-2934. <https://doi.org/10.1111/jnc.16168>

- Gómez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., Thiele, D.J. (2018). Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 4-19. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73>
- Gong, J., Harris, K., Lipnicki, D.M., Castro-Costa, E., Lima-Costa, M.F., Diniz, B.S., Xiao, S., Lipton, R.B., Katz, M.J., Wang, C., Preux, P.M., Guerchet, M., Gbessemehlan, A., Ritchie, K., Ancelin, M.L., ... Woodward, M. (2023). Sex differences in dementia risk and risk factors: Individual-participant data analysis using 21 cohorts across six continents from the COSMIC consortium. *Alzheimer's & Dementia*, 19(8), 3365-3378. <https://doi.org/10.1002/alz.12962>
- González, A., Geywitz, S., Maccioni, R.B. (2025). Alzheimer's disease: Where do we stand now and what are the strategic interventions? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 19, 1655342. <https://doi.org/10.3389/fncel.2025.1655342>
- González-Sarrias, A., Tomás-Barberán, F.A., García-Villalba, R. (2020). Structural diversity of polyphenols and distribution in foods. *Dietary polyphenols: Metabolism and Health Effects*, 1-29. <https://doi.org/10.1002/9781119563754.ch1>
- Grabska-Kobylecka, I., Kaczmarek-Bak, J., Figlus, M., Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Glabinski, A., Nowak, D. (2020). The presence of caffeic acid in cerebrospinal fluid: Evidence that dietary polyphenols can cross the Blood-Brain Barrier in humans. *Nutrients*, 12(5), 1531. <https://doi.org/10.3390/nu12051531>
- Gratuze, M., Leyns, C.E.G., Holtzman, D.M. (2018). New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 13, 66. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0298-9>
- Griner, S.L., Seidler, P., Bowler, J., Murray, K.A., Yang, T.P., Sahay, S., Sawaya, M.R., Cascio, D., Rodriguez, J.A., Philipp, S., Sosna, J., Glabe, C.G., Gonen, T., Eisenberg, D.S. (2019). Structure-based inhibitors of amyloid beta core suggest a common interface with tau. *ELife*, 8, e46924. <https://doi.org/10.7554/elife.46924>
- Gu, Y., Honig, L.S., Schupf, N., Lee, J.H., Luchsinger, J.A., Stern, Y., Scarmeas, N. (2015). Mediterranean diet and leukocyte telomere length in a multi-ethnic elderly population. *Age*, 37, 24. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9758-0>
- Guan, P.P., Cao, L.L., Wang, P. (2021). Elevating the levels of calcium ions exacerbate Alzheimer's disease via inducing the production and aggregation of β -Amyloid protein and phosphorylated tau. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5900. <https://doi.org/10.3390/ijms22115900>
- Guerrero-Muñoz, M.J., Gerson, J., Castillo-Carranza, D.L. (2015). Tau oligomers: The toxic player at synapses in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 464. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00464>
- Guo, X., Yue, R., Cui, Z., Wang, S., Jia, T., Li, W., Zhang, W., Shan, L., Li, C. (2025). Advances of therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Journal of Neurology*, 272, 705. <https://doi.org/10.1007/s00415-025-13456-8>
- Guthrie, C.R., Greenup, L., Leverenz, J.B., Kraemer, B.C. (2011). MSUT2 is a determinant of susceptibility to tau neurotoxicity. *Human Molecular Genetics*, 20(10), 1989-1999. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr079>
- Guthrie, C.R., Schellenberg, G.D., Kraemer, B.C. (2009). SUT-2 potentiates tau-induced neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Human Molecular Genetics*, 18(10), 1825-1838. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp099>
- Gutierrez-Zetina, S.M., González-Manzano, S., Ayuda-Durán, B., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2021). Caffeic and Dihydrocaffeic acids promote longevity and increase stress resistance in *Caenorhabditis elegans* by modulating expression of stress-related genes. *Molecules*, 26(6), 1517. <https://doi.org/10.3390/molecules26061517>
- Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S.H., Villemagne, V.L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., Masters, C.L., Cho, M., Lannfelt, L., Cummings, J.L., Vergallo, A. (2021). The Amyloid- β pathway in Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 26, 5481-5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>
- Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A., Kaufman, R.J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature Cell Biology*, 15, 481-490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>
- Hansen, M., Rubinshtein, D.C., Walker, D.W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 579-593. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Hardy, J. A., Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hartman, J.H., Widmayer, S.J., Bergemann, C.M., King, D.E., Morton, K.S., Romersi, R.F., Jameson, L.E., Leung, M.C.K., Andersen, E.C., Taubert, S., Meyer, J.N. (2021). Xenobiotic metabolism and transport in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 24(2), 51-94. <https://doi.org/10.1080/10937404.2021.1884921>

- He, Z., Guo, J.L., McBride, J.D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., Zhang, B., Gathagan, R.J., Yue, C., Dengler, C., Stieber, A., Nitla, M., Coulter, D.A., Abel, T., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.Y. (2017). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature Medicine*, 24, 29-38. <https://doi.org/10.1038/nm.4443>
- He, Z., Li, X., Wang, Z., Cao, Y., Han, S., Li, N., Cai, J., Cheng, S., Liu, Q. (2023). Protective effects of luteolin against amyloid beta-induced oxidative stress and mitochondrial impairments through peroxisome proliferator-activated receptor γ -dependent mechanism in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 66, 102848. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102848>
- Herrera, M.L., Champarini, L.G., Oliveros, A.L., Bellini, M.J., Hereñú, C.B. (2024). Potentialities of IGF-1 for regulating oxidative stress in neuroinflammation and neurodegeneration: theoretical review. *Open Exploration*, 4, 442-458. <https://doi.org/10.37349/ent.2024.00093>
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18, 794-799. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>
- Hetz, C., Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 15, 233-249. <https://doi.org/10.1038/nrn3689>
- Hobert, O. (2010). Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.12.2>
- Hobert, O. (2013). The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.161.1>
- Hofmann, E.R., Milstein, S., Boulton, S.J., Ye, M., Hofmann, J.J., Stergiou, L., Gartner, A., Vidal, M., Hengartner, M.O. (2002). *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Current Biology*, 12(22), 1908-1918. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01262-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01262-9)
- Hole, K.L., Staniaszek, L.E., Menon Balan, G., Mason, J.M., Brown, J.T., Williams, R.J. (2021). Oral (-)-Epicatechin inhibits progressive tau pathology in rTg4510 mice independent of direct actions at GSK3 β . *Frontiers in Neuroscience*, 15, 697319. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.697319>
- Hole, K.L., Williams, R.J. (2020). Flavonoids as an intervention for Alzheimer's disease: Progress and hurdles towards defining a mechanism of action. *Brain Plasticity*, 6(2), 167-192. <https://doi.org/10.3233/bpl-200098>
- Horvitz, H.R., Sulston, J.E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 96(2), 435-454. <https://doi.org/10.1093/genetics/96.2.435>
- Hou, X., Watzlawik, J.O., Cook, C., Liu, C.C., Kang, S.S., Lin, W.L., DeTure, M., Heckman, M.G., Diehl, N.N., Al-Shaikh, F.S.H., ... Springer, W. (2021). Mitophagy alterations in Alzheimer's disease are associated with granulovacuolar degeneration and early tau pathology. *Alzheimer's and Dementia*, 17(3), 417-430. <https://doi.org/10.1002/alz.12198>
- Hu, L., Luo, Y., Yang, J., Cheng, C. (2025). Botanical flavonoids: Efficacy, absorption, metabolism and advanced pharmaceutical technology for improving bioavailability. *Molecules*, 30(5), 1184. <https://doi.org/10.3390/molecules30051184>
- Huang, J.C., Pan, X.K., Li, S.C., Zeng, W.H., Zhong, Y.J., Pan, H.Y., Zhuang, Y.L. (2025). Polyphenol extracts from rambutan peel promote longevity via the attenuation of the Toll/Imd pathway. *Food & Function*, 16(7), 2793-2807. <https://doi.org/10.1039/d4fo06353h>
- Huang, Y. B., Tian, L.L., Zhu, Z.W., Zhou, K.G., Lai, X., Peng, Y.Z., Wu, Z., Tong, W.F., Wang, H., Wang, X.J., Guan, Q., Jin, L.J., Feng, Y., Weng, W.Y., Zhang, J.X. (2025). Apigenin enhances Nrf2-induced chaperone-mediated autophagy and mitigates α -synuclein pathology: Implications for Parkinson's disease therapy. *Phytomedicine*, 141, 156652. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2025.156652>
- Huang, Y., Happonen, K.E., Burrola, P.G., O'Connor, C., Hah, N., Huang, L., Nimmerjahn, A., Lemke, G. (2021). Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nature Immunology*, 22, 586-594. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00913-5>
- Hubbard, E.J.A., Greenstein, D. (2005). Introduction to the germ line. *Wormbook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.18.1>
- Ionescu-Tucker, A., Cotman, C.W. (2021). Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 107, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014>
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C. X., del Alonso, A.C., Grundke-Iqbal, I. (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, 118, 53-69. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0486-3>

- Jackson, R.J., Rudinskiy, N., Herrmann, A.G., Croft, S., Kim, J.S.M., Petrova, V., Ramos-Rodriguez, J.J., Pitstick, R., Wegmann, S., Garcia-Alloza, M., Carlson, G.A., Hyman, B.T., Spire-Jones, T.L. (2016). Human tau increases amyloid β plaque size but not amyloid β -mediated synapse loss in a novel mouse model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 44(12), 3056-3066. <https://doi.org/10.1111/ejn.13442>
- Jacquemyn, J., Cascalho, A., Goodchild, R.E. (2017). The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO Reports*, 18, 1905-1921. <https://doi.org/10.15252/embr.201643426>
- Jamshidi, S., Sofiabadi, M., Eslami, M. (2024). Apigenin attenuates serum concentrations of TNF- α , interleukin 1b and interleukin 6 in lipopolysaccharide-stimulated rats. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 14(4), 415-421. <https://doi.org/10.22038/ajp.2023.23365>
- Jan, R., Chaudhry, G.E.S. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205-218. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.024>
- Jay, T.R., Von Saucken, V.E., Landreth, G.E. (2017). TREM2 in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration*, 12, 56. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0197-5>
- Johnson, S.L., Kirk, R.D., Dasilva, N.A., Ma, H., Seeram, N.P., Bertin, M.J. (2019). Polyphenol microbial metabolites exhibit gut and Blood-Brain Barrier permeability and protect murine microglia against LPS-induced inflammation. *Metabolites*, 9(4), 78. <https://doi.org/10.3390/metabo9040078>
- Jomova, K., Alomar, S.Y., Valko, R., Liska, J., Nepovimova, E., Kuca, K., Valko, M. (2025). Flavonoids and their role in oxidative stress, inflammation, and human diseases. *Chemico-Biological Interactions*, 413, 111489. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2025.111489>
- Joseph, S.V., Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B.M. (2016). Fruit polyphenols: A review of anti-inflammatory effects in humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 419-444. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.767221>
- Joshi, P., Perni, M., Limbocker, R., Mannini, B., Casford, S., Chia, S., Habchi, J., Labbadia, J., Dobson, C.M., Vendruscolo, M. (2021). Two human metabolites rescue a *C. elegans* model of Alzheimer's disease via a cytosolic unfolded protein response. *Communications Biology*, 4, 843. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02218-7>
- Kadavath, H., Hofele, R.V., Biernat, J., Kumar, S., Tepper, K., Urlaub, H., Mandelkow, E., Zweckstetter, M. (2015). Tau stabilizes microtubules by binding at the interface between tubulin heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(24), 7501-7506. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504081112>
- Kaiser, M., Lacheta, B., Passon, M., Schieber, A. (2019). An innovative Approach to the preparation of plasma samples for UHPLC-MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(23), 6665-6671. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01782>
- Kaletta, T., Hengartner, M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 387-399. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kalt, W., Cassidy, A., Howard, L.R., Krikorian, R., Stull, A.J., Tremblay, F., Zamora-Ros, R. (2020). Recent research on the health benefits of blueberries and their anthocyanins. *Advances in Nutrition*, 11(2), 224-236. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz065>
- Kang, K., Bai, J., Zhong, S., Zhang, R., Zhang, X., Xu, Y., Zhao, M., Zhao, C., Zhou, Z. (2022). Down-regulation of Insulin Like Growth Factor 1 involved in Alzheimer's disease via MAPK, Ras, and FoxO signaling pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 8169981. <https://doi.org/10.1155/2022/8169981>
- Kang, Y., Lee, J.H., Seo, Y.H., Jang, J.H., Jeong, C.H., Lee, S., Jeong, G.S., Park, B. (2019). Epicatechin prevents methamphetamine-induced neuronal cell death via inhibition of ER stress. *Biomolecules & Therapeutics*, 27(2), 145-151. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.092>
- Karran, E., De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*, 139, 237-252. <https://doi.org/10.1111/jnc.13632>
- Karvandi, M.S., Sheikhzadeh Hesari, F., Aref, A.R., Mahdavi, M. (2023). The neuroprotective effects of targeting key factors of neuronal cell death in neurodegenerative diseases: The role of ER stress, oxidative stress, and neuroinflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1105247. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1105247>
- Katz, M. (2022). Genetic methods for cellular manipulation in *C. elegans*. *Methods in Molecular Biology*, 2468, 51-72. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2181-3_4
- Kauffman, A., Parsons, L., Stein, G., Wills, A., Kaletsky, R., Murphy, C. (2011). *C. elegans* positive butanone learning, short-term, and long-term associative memory assays. *Journal of Visualized Experiments*, 49, e2490. <https://doi.org/10.3791/2490>

- Kaushik, S., Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 365-381. <https://doi.org/10.1038/S41580-018-0001-6>
- Kerr, J.S., Adriaanse, B.A., Greig, N.H., Mattson, M.P., Cader, M. Z., Bohr, V. A., Fang, E.F. (2017). Mitophagy and Alzheimer's Disease: *Cellular and Molecular Mechanisms*. *Trends in Neurosciences*, 40(3), 151-166. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2017.01.002>
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., Cuervo, A.M. (2004). Activation of Chaperone-mediated Autophagy during oxidative stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), 4829-4840. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0477>
- Kim, D.M., Chung, K.S., Choi, S.J., Jung, Y.J., Park, S.K., Han, G.H., Ha, J.S., Song, K. Bin, Choi, N.S., Kim, H.M., Won, M., Seo, Y.S. (2009). RhoB induces apoptosis via direct interaction with TNFAIP1 in HeLa cells. *International Journal of Cancer*, 125(11), 2520-2527. <https://doi.org/10.1002/ijc.24617>
- Kim, S., Kim, D.K., Jeong, S., Lee, J. (2022). The common cellular events in the neurodegenerative diseases and the associated role of endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5894. <https://doi.org/10.3390/ijms23115894>
- Kim, W.S., Guillemin, G.J., Glaros, E.N., Lim, C.K., Garner, B. (2006). Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *NeuroReport*, 17(9), 891-896. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000221833.41340.cd>
- Kim, Y.S., Seo, H.W., Lee, M.H., Kim, D.K., Jeon, H., Cha, D.S. (2014). Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Pharmacal Research*, 37, 245-252. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0183-6>
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277(5328), 942-946. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.942>
- Kisler, K., Nelson, A.R., Montagne, A., Zlokovic, B.V. (2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18, 419-434. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>
- Kondadi, A.K., Wang, S., Montagner, S., Kladt, N., Korwitz, A., Martinelli, P., Herholz, D., Baker, M.J., Schauss, A.C., Langer, T., Rugarli, E.I. (2014). Loss of the m-AAA protease subunit AFG3L2 causes mitochondrial transport defects and tau hyperphosphorylation. *EMBO Journal*, 33, 1011-1026. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387009>
- Korecka, M., Shaw, L.M. (2021). Mass spectrometry-based methods for robust measurement of Alzheimer's disease biomarkers in biological fluids. *Journal of Neurochemistry*, 159(2), 211-233. <https://doi.org/10.1111/jnc.15465>
- Koss, D.J., Jones, G., Cranston, A., Gardner, H., Kanaan, N.M., Platt, B. (2016). Soluble pre-fibrillar tau and β -amyloid species emerge in early human Alzheimer's disease and track disease progression and cognitive decline. *Acta Neuropathologica*, 132, 875-895. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1632-3>
- Kou, J.j., Shi, J.z., He, Y.y., Hao, J.j., Zhang, H.y., Luo, D.m., Song, J.k., Yan, Y., Xie, X.m., Du, G.h., Pang, X.b. (2021). Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 43, 840-849. <https://doi.org/10.1038/s41401-021-00702-8>
- Kraemer, B.C., Schellenberg, G.D. (2007). SUT-1 enables tau-induced neurotoxicity in *C. elegans*. *Human Molecular Genetics*, 16(16), 1959-1971. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm143>
- Kraemer, B.C., Zhang, B., Leverenz, J.B., Thomas, J.H., Trojanowski, J.Q., Schellenberg, G.D. (2003). Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9980-9985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533448100>
- Krikorian, R., Skelton, M.R., Summer, S.S., Shidler, M.D., Sullivan, P.G. (2022). Blueberry supplementation in midlife for dementia risk reduction. *Nutrients*, 14(8), 1619. <https://doi.org/10.3390/nu14081619>
- Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A., Day, A.J., Donovan, J.L., Manach, C., Williamson, G. (2004). How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.15>
- Ksiazek-Reding, H., Liu, W.K., Yen, S.H. (1992). Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Research*, 597(2), 209-219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91476-u](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91476-u)
- Kumar, S., Akhila, P.V., Suchiang, K. (2023). Hesperidin ameliorates Amyloid- β toxicity and enhances oxidative stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* through *acr-16* mediated activation of the autophagy pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 209, 366-380. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.408>

- Kwon, C., Ediriweera, M.K., Kim Cho, S. (2023). Interplay between phytochemicals and the colonic microbiota. *Nutrients*, 15(8), 1989. <https://doi.org/10.3390/nu15081989>
- L'Hernault, S.W. (2006). Spermatogenesis. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.85.1>
- Lackie, R.E., Maciejewski, A., Ostapchenko, V.G., Marques-Lopes, J., Choy, W.Y., Duennwald, M.L., Prado, V.F., Prado, M.A.M. (2017). The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 254. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00254>
- Lai, C.H., Chou, C.Y., Ch'ang, L.Y., Liu, C.S., Lin, W.C. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Research*, 10(5), 703-713. <https://doi.org/10.1101/gr.10.5.703>
- Laranjinha, J. (2010). Translation of chemical properties of polyphenols into biological activity with impact on human health. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 2, Chapter 11, 269-282. <https://doi.org/10.1002/9781444323375.ch11>
- Lardeau, A., Poquet, L. (2013). Phenolic acid metabolites derived from coffee consumption are unlikely to cross the blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 76, 134-138. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.12.016>
- Lee, J., Torosyan, N., Silverman, D.H. (2017). Examining the impact of grape consumption on brain metabolism and cognitive function in patients with mild decline in cognition: A double-blinded placebo controlled pilot study. *Experimental Gerontology*, 87, 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2016.10.004>
- Lee, J.H., Moon, J.H., Kim, S.W., Jeong, J.K., Nazim, U.M. D., Lee, Y.J., Seol, J.W., Park, S.Y. (2015). EGCG-mediated autophagy flux has a neuroprotection effect via a class III histone deacetylase in primary neuron cells. *Oncotarget*, 6, 9701-9717. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3832>
- Lee, S.B., Choi, E.H., Jeong, K.H., Kim, K.S., Shim, S.M., Kim, G.H. (2020). Effect of catechins and high-temperature-processed green tea extract on scavenging reactive oxygen species and preventing A β 1-42 fibrils' formation in brain microvascular endothelium. *Nutritional Neuroscience*, 23(5), 363-373. <https://doi.org/10.1080/1028415x.2018.1507618>
- Lemmer, I.L., Willemsen, N., Hilal, N., Bartelt, A. (2021). A guide to understanding endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Molecular Metabolism*, 47, 101169. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101169>
- Leng, F., Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17, 157-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Lewitt, M.S., Boyd, G.W. (2019). The role of Insulin-Like Growth Factors and Insulin-Like Growth Factor-Binding proteins in the nervous system. *Biochemistry Insights*, 12, 1-18. <https://doi.org/10.1177/1178626419842176>
- Li, B., Dong, L., Meng, W., Xiong, S.Y., Wu, G.S., Ma, W.Z., Luo, H.R. (2024). Phloretic acid requires the insulin/IGF-1 pathway and autophagy to enhance stress resistance and extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1384227. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1384227>
- Li, C., Powell, K., Giliberto, L., LeDoux, C., d'Abramo, C., Sciubba, D., Al Abed, Y. (2025). Non-electrophilic activation of NRF2 in neurological disorders: Therapeutic promise of non-pharmacological strategies. *Antioxidants*, 14(9), 1047. <https://doi.org/10.3390/antiox14091047>
- Li, H., Xiao, C., Wang, F., Guo, X., Zhou, Z., Jiang, Y. (2023). Blueberry-mulberry extract alleviates cognitive impairment, regulates gut metabolites, and inhibits inflammation in aged mice. *Foods*, 12(4), 860. <https://doi.org/10.3390/foods12040860>
- Li, H., Yu, X., Li, C., Ma, L., Zhao, Z., Guan, S., Wang, L. (2021). Caffeic acid protects against A β toxicity and prolongs lifespan in *Caenorhabditis elegans* models. *Food & Function*, 12(3), 1219-1231. <https://doi.org/10.1039/d0fo02784g>
- Li, H., Zheng, T., Lian, F., Xu, T., Yin, W., Jiang, Y. (2022). Anthocyanin-rich blueberry extracts and anthocyanin metabolite protocatechuic acid promote autophagy-lysosomal pathway and alleviate neurons damage in *in vivo* and *in vitro* models of Alzheimer's disease. *Nutrition*, 93, 111473. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111473>
- Li, P., Ma, K., Wu, H. Y., Wu, Y.P., Li, B.X. (2018). Isoflavones induce BEX2-dependent autophagy to prevent ATR-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(5), 1866-1879. <https://doi.org/10.1159/000484075>
- Li, R., Zhou, Y., Zhang, S., Li, J., Zheng, Y., Fan, X. (2022). The natural (poly)phenols as modulators of microglia polarization via TLR4/NF- κ B pathway exert anti-inflammatory activity in ischemic stroke. *European Journal of Pharmacology*, 914, 174660. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174660>

- Li, X., Wang, X., Wang, K., Yang, X., Liu, X., Chen, J., Li, J., Wang, J., Guo, Q., Wang, H. (2023). Black rice anthocyanin extract enhances the antioxidant capacity in PC12 cells and improves the lifespan by activating IIS pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 265, 109533. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109533>
- Li, Y., Chen, B., Zou, W., Wang, X., Wu, Y., Zhao, D., Sun, Y., Liu, Y., Chen, L., Miao, L., Yang, C., Wang, X. (2016). The lysosomal membrane protein SCAV-3 maintains lysosome integrity and adult longevity. *The Journal of Cell Biology*, 215(2), 167-185. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602090>
- Liang, T., Xue, F., Hang, W., Wen, B., Zhang, Q., Chen, J., Jie, H., Liu, X., Chen, J., Tian, Q. (2019). Neuron-specific apolipoprotein E4 (1-272) fragment induces tau hyperphosphorylation and axonopathy via triggering endoplasmic reticulum stress. *Journal of Alzheimer's Disease*, 71(2), 597-611. <https://doi.org/10.3233/jad-190419>
- Liddel, S.A., Barres, B.A. (2017). Reactive astrocytes: Production, function, and therapeutic potential. *Immunity*, 46(6), 957-967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Münch, A.E., Chung, W.S., ... Barres, B.A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541, 481-487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liégeois, S., Benedetto, A., Michaux, G., Belliard, G., Labouesse, M. (2007). Genes required for osmoregulation and apical secretion in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 175(2), 709-724. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066035>
- Lin, H., Gao, Y., Zhang, C., Ma, B., Wu, M., Cui, X., Wang, H. (2022). Autophagy regulation influences β -Amyloid toxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 885145. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.885145>
- Lin, W., Wang, W., Yang, H., Wang, D., Ling, W. (2016). Influence of intestinal microbiota on the catabolism of flavonoids in mice. *Journal of Food Science*, 81(12), 3026-3034. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13544>
- Lin, Y., Lin, C., Cao, Y., Chen, Y. (2023). *Caenorhabditis elegans* as an *in vivo* model for the identification of natural antioxidants with anti-aging actions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115594. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115594>
- Link, C.D. (1995). Expression of human β -amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9368-9372. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9368>
- Link, C.D. (2006). *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 41(10), 1007-1013. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.059>
- Link, C.D., Taft, A., Kapulkin, V., Duke, K., Kim, S., Fei, Q., Wood, D.E., Sahagan, B.G. (2003). Gene expression analysis in a transgenic *Caenorhabditis elegans* Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging*, 24(3), 397-413. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00224-5](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00224-5)
- Lippolis, T., Cofano, M., Caponio, G.R., De Nunzio, V., Notarnicola, M. (2023). Bioaccessibility and bioavailability of diet polyphenols and their Modulation of gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3813. <https://doi.org/10.3390/ijms24043813>
- Liu, J.Y.H., Sun, M.Y.Y., Sommerville, N., Ngan, M.P., Ponomarev, E.D., Lin, G., Rudd, J.A. (2020). Soy flavonoids prevent cognitive deficits induced by intra-gastrointestinal administration of beta-amyloid. *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111396. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111396>
- Liu, K., Luo, M., Wei, S. (2019). The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 6713194. <https://doi.org/10.1155/2019/6713194>
- Liu, L., Barber, E., Kellow, N.J., Williamson, G. (2025). Improving quercetin bioavailability: A systematic review and meta-analysis of human intervention studies. *Food Chemistry*, 477, 143630. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143630>
- Liu, M., Eguchi, N., Yamasaki, Y., Urade, Y., Hattori, N., Urabe, T. (2007). Focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice induces hematopoietic prostaglandin D synthase in microglia and macrophages. *Neuroscience*, 145(2), 520-529. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.018>
- Liu, M., Sun, Z., Zhou, A., Li, H., Yang, L., Zhou, C., Liu, R., Hu, X., Zhou, J., Xiang, S., Zhang, J. (2010). Functional characterization of the promoter region of human TNFAIP1 gene. *Molecular Biology Reports*, 37, 1699-1705. <https://doi.org/10.1007/s11033-009-9588-1>

- Liu, N., Yu, Z., Xun, Y., Li, M., Peng, X., Xiao, Y., Hu, X., Sun, Y., Yang, M., Gan, S., Yuan, S., Wang, X., Xiang, S., Zhang, J. (2016). TNFAIP1 contributes to the neurotoxicity induced by A β 25-35 in Neuro2a cells. *BMC Neuroscience*, 17, 51. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0286-3>
- Liu, P., Cui, L., Liu, B., Liu, W., Hayashi, T., Mizuno, K., Hattori, S., Ushiki-Kaku, Y., Onodera, S., Ikejima, T. (2020). Silibinin ameliorates STZ-induced impairment of memory and learning by up-regulating insulin signaling pathway and attenuating apoptosis. *Physiology & Behavior*, 213, 112689. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112689>
- Liu, W., Feng, Y., Yu, S., Fan, Z., Li, X., Li, J., Yin, H. (2021). The flavonoid biosynthesis network in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12824. <https://doi.org/10.3390/ijms222312824>
- Liu, X., Ye, M., Ma, L. (2022). The emerging role of autophagy and mitophagy in tauopathies: From pathogenesis to translational implications in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14, 1022821. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1022821>
- Liu, X., Zheng, F., Li, S., Wang, Z., Wang, X., Wen, L., He, Y. (2021). Malvidin and its derivatives exhibit antioxidant properties by inhibiting MAPK signaling pathways to reduce endoplasmic reticulum stress in ARPE-19 cells. *Food & Function*, 12(16), 7198-7213. <https://doi.org/10.1039/d1fo01345a>
- Liu, Y., Yu, J. T., Wang, H.F., Han, P.R., Tan, C.C., Wang, C., Meng, X.F., Risacher, S.L., Saykin, A.J., Tan, L. (2014). APOE genotype and neuroimaging markers of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 86(2), 127-134. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307719>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_T$} method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lofft, Z., Taibi, A., Massara, P., Tokar, T., Paetau-Robinson, I., Khoo, C., Comelli, E.M. (2022). Cranberry proanthocyanidin and its microbial metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, but not 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid, partially reverse pro-inflammatory microRNA responses in human intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 66(8), 2100853. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100853>
- Madhu, P., Mukhopadhyay, S. (2021). Distinct types of amyloid- β oligomers displaying diverse neurotoxicity mechanisms in Alzheimer's disease. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(11), 1594-1608. <https://doi.org/10.1002/jcb.30141>
- Maiese, K. (2021). Targeting the core of neurodegeneration: FoxO, mTOR, and SIRT1. *Neural Regeneration Research*, 16(3), 448-455. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.291382>
- Makar, A.N., Borman, A., Mosen, P., Simpson, J., Marques, J., Michelberger, T., Aitken, S., Wheeler, A.P., Winter, D., von Kriegsheim, A., Gammoh, N. (2024). The V-ATPase complex component RNaseK is required for lysosomal hydrolase delivery and autophagosome degradation. *Nature Communications*, 15, 7743. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52049-3>
- Malar, D.S., Prasanth, M.I., Jeyakumar, M., Balamurugan, K., Devi, K.P. (2021). Vitexin prevents A β proteotoxicity in transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease by modulating unfolded protein response. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(1), e22632. <https://doi.org/10.1002/jbt.22632>
- Mamun, A.A., Uddin, M.S., Mathew, B., Ashraf, G.M. (2020). Toxic tau: structural origins of tau aggregation in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 15(8), 1417-1420. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.274329>
- Mapes, J., Chen, Y.Z., Kim, A., Mitani, S., Kang, B.H., Xue, D. (2012). CED-1, CED-7, and TTR-52 regulate surface phosphatidylserine expression on apoptotic and phagocytic cells. *Current Biology*, 22(14), 1267-1275. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.052>
- Marín, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F. (2015). Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: Antimicrobial properties. *BioMed Research International*, 2015, 905215. <https://doi.org/10.1155/2015/905215>
- Marques, D., Moura-Louro, D., Silva, I.P., Matos, S., dos Santos, C.N., Figueira, I. (2024). Unlocking the potential of low-molecular-weight (Poly)phenol metabolites: Protectors at the blood-brain barrier frontier. *Neurochemistry International*, 179, 105836. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2024.105836>
- McFarland, K.N., Chakrabarty, P. (2022). Microglia in Alzheimer's disease: a key player in the transition between homeostasis and pathogenesis. *Neurotherapeutics*, 19(1), 186-208. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01179-3>
- McGhee, J.D. (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.133.1>
- McGrattan, A.M., McGuinness, B., McKinley, M.C., Kee, F., Passmore, P., Woodside, J.V., McEvoy, C.T. (2019). Diet and inflammation in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Current Nutrition Reports*, 8, 53-65. <https://doi.org/10.1007/s13668-019-0271-4>

- McKay, D.L., Chen, C.Y.O., Zampariello, C.A., Blumberg, J.B. (2015). Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry*, 168, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.062>
- Medina-Rodriguez, E.M., Olivares, M., Romaní-Pérez, M., Sanz, Y. (2026). Gut microbiome-based solutions for lifestyle-related disorders. *Bioactive Components for Functional Foods*, Chapter 12, 365-392. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-29983-4.00011-9>
- Mei, M., Sun, H., Xu, J., Li, Y., Chen, G., Yu, Q., Deng, C., Zhu, W., Song, J. (2022). Vanillic acid attenuates H₂O₂-induced injury in H9c2 cells by regulating mitophagy via the PINK1/Parkin/Mfn2 signaling pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 976156. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.976156>
- Melov, S., Adlard, P. A., Morten, K., Johnson, F., Golden, T.R., Hinerfeld, D., Schilling, B., Mavros, C., Masters, C.L., Volitakis, I., Li, Q.X., Laughton, K., Hubbard, A., Cherny, R.A., Gibson, B., Bush, A.I. (2007). Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS ONE*, 2(6), e536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000536>
- Miao, J., Zhang, Y., Su, C., Zheng, Q., Guo, J. (2025). Insulin-Like Growth Factor signaling in Alzheimer's disease: Pathophysiology and therapeutic strategies. *Molecular Neurobiology*, 62, 3195-3225. <https://doi.org/10.1007/s12035-024-04457-1>
- Milisav, I., Šuput, D., & Ribarič, S. (2015). Unfolded protein response and macroautophagy in Alzheimer's, Parkinson's and Prion diseases. *Molecules*, 20(12), 22718-22756. <https://doi.org/10.3390/molecules201219865>
- Mishra, E., Thakur, M.K. (2023). Mitophagy: A promising therapeutic target for neuroprotection during ageing and age-related diseases. *British Journal of Pharmacology*, 180(12), 1542-1561. <https://doi.org/10.1111/bph.16062>
- Misrani, A., Tabassum, S., Yang, L. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 617588. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>
- Miyasaka, T., Shinzaki, Y., Yoshimura, S., Yoshina, S., Kage-Nakadai, E., Mitani, S., Ihara, Y. (2018). Imbalanced expression of tau and tubulin induces neuronal dysfunction in *C. elegans* models of tauopathy. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 415. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00415>
- Moerman, D.G., Fire, A. (1997). Muscle: Structure, Function, and Development. *C. Elegans II*. Chapter 16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk20130/>
- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M.C., Williams, S. (2014). Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(2), 121-135. <https://doi.org/10.1111/nan.12084>
- Moore, K.B.E., Hung, T.J., Fortin, J.S. (2023). Hyperphosphorylated tau (p-tau) and drug discovery in the context of Alzheimer's disease and related tauopathies. *Drug Discovery Today*, 28(3), 103487. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103487>
- Morris, J.Z., Tissenbaum, H.A., Ruvkun, G. (1996). A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 382, 536-539. <https://doi.org/10.1038/382536a0>
- Mostafa, D.G., Khaleel, E.F., Badi, R.M., Abdel-Aleem, G.A., Abdeen, H.M. (2019). Rutin hydrate inhibits apoptosis in the brains of cadmium chloride-treated rats via preserving the mitochondrial integrity and inhibiting endoplasmic reticulum stress. *Neurological Research*, 41(7), 594-608. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1596206>
- Moujalled, D., Strasser, A., Liddell, J.R. (2021). Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. *Cell Death & Differentiation*, 28, 2029-2024. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00814-y>
- Mudd, N., Liceaga, A.M. (2022). *Caenorhabditis elegans* as an in vivo model for food bioactives: A review. *Current Research in Food Science*, 5, 845-856. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.05.001>
- Mullen, W., Borges, G., Lean, M.E.J., Roberts, S.A., Crozier, A. (2010). Identification of metabolites in human plasma and urine after consumption of a Polyphenol-Rich juice drink. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2586-2595. <https://doi.org/10.1021/jf904096v>
- Murota, K., Nakamura, Y., Uehara, M. (2018). Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(4), 600-610. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467>
- Murphy, C.T., Hu, P.J. (2013). Insulin/insulin-like growth factor signaling in *C. elegans*. *Wormbook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.164.1>
- Nabi, S.U., Khan, A., Siddiqui, E.M., Rehman, M.U., Alshahrani, S., Arafah, A., Mehan, S., Alsaffar, R.M., Alexiou, A., Shen, B. (2022). Mechanisms of mitochondrial malfunction in Alzheimer's disease: New therapeutic hope. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 4759963. <https://doi.org/10.1155/2022/4759963>

- Naeem, A., Ming, Y., Pengyi, H., Jie, K. Y., Yali, L., Haiyan, Z., Shuai, X., Wenjing, L., Ling, W., Xia, Z.M., Shan, L.S., Qin, Z. (2022). The fate of flavonoids after oral administration: a comprehensive overview of its bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 6169-6186. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1898333>
- Nagar, P., Sharma, P., Dhapola, R., Kumari, S., Medhi, B., HariKrishnaReddy, D. (2023). Endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease: Molecular mechanisms and therapeutic prospects. *Life Sciences*, 330, 121983. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121983>
- Navarrete-Yañez, V., Garate-Carrillo, A., Rodriguez, A., Mendoza-Lorenzo, P., Ceballos, G., Calzada-Mendoza, C., Hogan, M.C., Villarreal, F., Ramirez-Sanchez, I. (2020). Effects of (-)-epicatechin on neuroinflammation and hyperphosphorylation of tau in the hippocampus of aged mice. *Food & Function*, 11(12), 10351-10361. <https://doi.org/10.1039/d0fo02438d>
- Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Jimenez, S., Muñoz-Castro, C., Sanchez-Varo, R., Davila, J.C., Vizuete, M., Gutierrez, A., Vitorica, J. (2018). Microglia in Alzheimer's disease: Activated, dysfunctional or degenerative. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 140. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00140>
- Neddens, J., Temmel, M., Flunkert, S., Kerschbaumer, B., Hoeller, C., Loeffler, T., Niederkofler, V., Daum, G., Attems, J., Hutter-Paier, B. (2018). Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 6, 52. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0557-6>
- Nelson, P.T., Head, E., Schmitt, F.A., Davis, P.R., Neltner, J.H., Jicha, G.A., Abner, E.L., Smith, C.D., Van Eldik, L.J., Kryscio, R.J., Scheff, S.W. (2011). Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathologica*, 121(5), 571-587. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0826-y>
- Nelson, V.K., Begum, M.Y., Dera, A.A., Ali, S.P., Suryadevara, P.R. (2025). Phytocompounds as modulators of HSF1 in neurodegenerative disease: Special emphasis on Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology*, 1005, 178034. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2025.178034>
- Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*, 42, 29-42. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0397-3>
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B. (2009). The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 284(20), 13291-13295. <https://doi.org/10.1074/jbc.r900010200>
- Nguyen, T.N., Sawa-Makarska, J., Khuu, G., Lam, W.K., Adriaenssens, E., Fracchiolla, D., Shoebridge, S., Bernklau, D., Padman, B.S., Skulsupaisarn, M., Lindblom, R.S.J., Martens, S., Lazarou, M. (2023). Unconventional initiation of PINK1/Parkin mitophagy by Optineurin. *Molecular Cell*, 83(10), 1693-1709.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.021>
- Nguyen, T.T., Ta, Q. T.H., Nguyen, T.T.D., Le, T.T., Vo, V.G. (2020). Role of insulin resistance in the Alzheimer's disease progression. *Neurochemical Research*, 45, 1481-1491. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03031-0>
- Nichols, E., Steinmetz, J.D., Vollset, S.E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T.T., ... Vos, T. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health*, 7(2), e105-e125. [https://doi.org/10.1016/s2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s2468-2667(21)00249-8)
- Nithianantham, S., Le, S., Seto, E., Jia, W., Leary, J., Corbett, K.D., Moore, J.K., Al-Bassam, J. (2015). Tubulin cofactors and Arl2 are cage-like chaperones that regulate the soluble α -tubulin pool for microtubule dynamics. *eLife*, 4, e08811. <https://doi.org/10.7554/elife.08811.001>
- Nixon, R.A., Rubinsztein, D.C. (2024). Mechanisms of autophagy-lysosome dysfunction in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25, 926-946. <https://doi.org/10.1038/s41580-024-00757-5>
- Obulesu, M., Lakshmi, M.J. (2014). Apoptosis in Alzheimer's disease: An understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochemical Research*, 39, 2301-2312. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1454-4>
- Oikonomou, G., Shaham, S. (2010). The glia of *Caenorhabditis elegans*. *Glia*, 59(9), 1253-1263. <https://doi.org/10.1002/glia.21084>
- Okello, A., Edison, P., Archer, H.A., Turkheimer, F.E., Kennedy, J., Bullock, R., Walker, Z., Kennedy, A., Fox, N., Rossor, M., Brooks, D.J. (2009). Microglial activation and amyloid deposition in mild cognitive impairment. *Neurology*, 72(1), 56-62. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000338622.27876.0d>
- Olszowy, M. (2019). What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants? *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.039>

- Osama, A., Zhang, J., Yao, J., Yao, X., Fang, J. (2020). Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment. *Ageing Research Reviews*, 64, 101206. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101206>
- Osorio-Paz, I., Valle-Jiménez, X., Brunauer, R., Alavez, S. (2023). Vanillic acid improves stress resistance and substantially extends life span in *Caenorhabditis elegans*. *The Journals of Gerontology: Series A*, 78(7), 1100-1107. <https://doi.org/10.1093/gerona/glad086>
- Oteiza, P.I., Fraga, C.G., Mills, D.A., Taft, D.H. (2018). Flavonoids and the gastrointestinal tract: Local and systemic effects. *Molecular Aspects of Medicine*, 61, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.01.001>
- Page, A.P., Johnstone, I.L. (2007). The cuticle. *Wormbook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.138.1>
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N. (2015). Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature*, 521, 525-528. <https://doi.org/10.1038/nature14300>
- Paolicelli, R.C., Bolascho, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., Gross, C.T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456-1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Papp, D., Csermely, P., Soti, C. (2012). A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002673. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002673>
- Paul, D., Chipurupalli, S., Justin, A., Raja, K., Mohankumar, S.K. (2020). *Caenorhabditis elegans* as a possible model to screen anti-Alzheimer's therapeutics. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 106, 106932. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2020.106932>
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Santos-Buelga, C. (2012). The flavonoid paradox: Conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1822-1825. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5697>
- Peters, F., Salihoglu, H., Pratsch, K., Herzog, E., Pigoni, M., Sgobio, C., Lichtenthaler, S.F., Neumann, U., Herms, J. (2019). Tau deletion reduces plaque-associated BACE1 accumulation and decelerates plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. *The EMBO Journal*, 38(23). <https://doi.org/10.15252/embj.2019102345>
- Philippens, I.H., Ormel, P.R., Baarends, G., Johansson, M., Remarque, E.J., Doverskog, M. (2016). Acceleration of amyloidosis by inflammation in the amyloid-beta marmoset monkey model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(1), 101-113. <https://doi.org/10.3233/jad-160673>
- Piccialli, I., Tedeschi, V., Caputo, L., D'Errico, S., Ciccone, R., De Feo, V., Secondo, A., Pannaccione, A. (2022). Exploring the therapeutic potential of phytochemicals in Alzheimer's disease: Focus on polyphenols and monoterpenes. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 876614. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.876614>
- Pincus, D. (2020). Regulation of Hsf1 and the Heat Shock Response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1243, 41-50. https://doi.org/10.1007/978-3-030-40204-4_3
- Pradeepkiran, J.A., Reddy, P.H. (2020). Defective mitophagy in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 64, 101191. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101191>
- Prasanth, M.I., Sivamaruthi, B.S., Chaiyasut, C., Tencomnao, T. (2019). A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients*, 11(2), 474. <https://doi.org/10.3390/nu11020474>
- Qi, D., Lin, H., Hu, B., Wei, Y. (2023). A review on in vitro model of the blood-brain barrier (BBB) based on hCMEC/D3 cells. *Journal of Controlled Release*, 358, 78-97. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.04.020>
- Qi, L., Tsai, B., Arvan, P. (2017). New insights into the physiological role of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Trends in Cell Biology*, 27(6), 430-440. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.12.002>
- Qin, J., Ma, Z., Chen, X., Shu, S. (2023). Microglia activation in central nervous system disorders: A review of recent mechanistic investigations and development efforts. *Frontiers in Neurology*, 14, 1103416. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1103416>
- Rajmohan, R., Reddy, P.H. (2016). Amyloid-beta and phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of Alzheimer's disease neurons. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57(4), 975-999. <https://doi.org/10.3233/jad-160612>
- Reddy, P.H., Oliver, D.M.A. (2019). Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease. *Cells*, 8(5), 488. <https://doi.org/10.3390/cells8050488>

- Regitz, C., Dußling, L.M., Wenzel, U. (2014). Amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(10), 1931-1940. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400014>
- Regitz, C., Fitzenberger, E., Mahn, F.L., Dußling, L.M., Wenzel, U. (2016). Resveratrol reduces amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$)-induced paralysis through targeting proteostasis in an Alzheimer model of *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Nutrition*, 55, 741-747. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0894-1>
- Rendeiro, C., Rhodes, J.S., Spencer, J.P.E. (2015). The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochemistry International*, 89, 126-139. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.08.002>
- Riffelmacher, T., Richter, F.C., Simon, A.K. (2018). Autophagy dictates metabolism and differentiation of inflammatory immune cells. *Autophagy*, 14, 199-206. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1362525>
- Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A., Worzella, T.J., Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Rivas-García, L., Crespo-Antolín, L., Forbes-Hernández, T.Y., Romero-Márquez, J.M., Navarro-Hortal, M.D., Arredondo, M., Llopis, J., Quiles, J.L., Sánchez-González, C. (2024). Bioactive properties of *Tagetes erecta* Edible Flowers: Polyphenol and antioxidant characterization and therapeutic activity against ovarian tumoral cells and *Caenorhabditis elegans* tauopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 280. <https://doi.org/10.3390/ijms25010280>
- Roda, A., Serra-Mir, G., Montoliu-Gaya, L., Tiessler, L., Villegas, S. (2022). Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 17(8), 1666-1674. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332127>
- Rodrigo-Gonzalo, M.J., González-Manzano, S., Mendez-Sánchez, R., Santos-Buelga, C., Recio-Rodríguez, J.I. (2022). Effect of polyphenolic complements on cognitive function in the elderly: A systematic review. *Antioxidants*, 11(8), 1549. <https://doi.org/10.3390/antiox11081549>
- Rodrigo-Gonzalo, M.J., González-Manzano, S., Pablos-Hernández, M.C., Méndez-Sánchez, R., Ayuda-Durán, B., González-Sánchez, J., Barbero-Iglesias, F., González-Paramás, A.M., Recio-Rodríguez, J.I. (2023). Effects of a raisin supplement on cognitive performance, quality of life, and functional activities in healthy older adults - Randomized clinical trial. *Nutrients*, 15(12), 2811. <https://doi.org/10.3390/nu15122811>
- Rodríguez-Daza, M.C., Pulido-Mateos, E.C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., Roy, D. (2021). Polyphenol-mediated gut microbiota modulation: Toward prebiotics and further. *Frontiers in Nutrition*, 8, 689456. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.689456>
- Rodriguez-Mateos, A., Vauzour, D., Krueger, C.G., Shanmuganayagam, D., Reed, J., Calani, L., Mena, P., del Rio, D., Crozier, A. (2014). Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: An update. *Archives of Toxicology*, 88, 1803-1853. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1330-7>
- Román, G.C., Jackson, R.E., Gadhia, R., Román, A.N., Reis, J. (2019). Mediterranean diet: The role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease. *Revue Neurologique*, 175(10), 724-741. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.08.005>
- Romero-Márquez, J.M., Navarro-Hortal, M.D., Jiménez-Trigo, V., Vera-Ramírez, L., Forbes-Hernández, T.J., Esteban-Muñoz, A., Giampieri, F., Bullón, P., Battino, M., Sánchez-González, C., Quiles, J.L. (2022). An oleuropein rich-olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces β -amyloid and tau proteotoxicity through regulation of oxidative- and heat shock-stress responses in *Caenorhabditis elegans*. *Food and Chemical Toxicology*, 162, 112914. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112914>
- Rosli, H., Shahar, S., Rajab, N.F., Che Din, N., Haron, H. (2022). The effects of polyphenols-rich tropical fruit juice on cognitive function and metabolomics profile—a randomized controlled trial in middle-aged women. *Nutritional Neuroscience*, 25(8), 1577-1593. <https://doi.org/10.1080/1028415x.2021.1880312>
- Ruganzu, J.B., Zheng, Q., Wu, X., He, Y., Peng, X., Jin, H., Zhou, J., Ma, R., Ji, S., Ma, Y., Qian, Y., Wang, Y., Yang, W. (2021). TREM2 overexpression rescues cognitive deficits in APP/PS1 transgenic mice by reducing neuroinflammation via the JAK/STAT/SOCS signaling pathway. *Experimental Neurology*, 336, 113506. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113506>
- Russell, R.C., Yuan, H.X., Guan, K.L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Research*, 24, 42-57. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.166>
- Sabogal-Guáqueta, A.M., Muñoz-Manco, J.I., Ramírez-Pineda, J.R., Lamprea-Rodriguez, M., Osorio, E., Cardona-Gómez, G.P. (2015). The flavonoid quercetin ameliorates Alzheimer's disease pathology and protects cognitive and

- emotional function in aged triple transgenic Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology*, 93, 134-145. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.01.027>
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., Saso, L. (2020). An overview of Nrf2 Signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules*, 25(22), 5474. <https://doi.org/10.3390/molecules25225474>
- Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Fattorelli, N., Thrupp, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., Mancuso, R., Chen, W.T., Woodbury, M.E., Srivastava, G., Möller, T., Hudry, E., Das, S., Saido, T., Karran, E., Hyman, B., Perry, V.H., Fiers, M., De Strooper, B. (2019). The major risk factors for Alzheimer's disease: Age, sex, and genes modulate the microglia response to A β plaques. *Cell Reports*, 27(4), 1293-1306.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.099>
- Saleh, R.O., Jabir, M.S., Mohammed, J.S., Ahmad, I., Ganesan, S., Shankhyan, A., Nanda, A., Ray, S., Zwamel, A.H., Hussein, A.R. (2025). Exploring the endoplasmic reticulum's role in Alzheimer's disease and its potential as a therapeutic target. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 39(8), e70405. <https://doi.org/10.1002/jbt.70405>
- Šamec, D., Karalija, E., Šola, I., Vujčić Bok, V., Salopek-Sondi, B. (2021). The role of polyphenols in abiotic stress response: The influence of molecular structure. *Plants*, 10(1), 118. <https://doi.org/10.3390/plants10010118>
- Sánchez-Martínez, J.D., García, A.R., Alvarez-Rivera, G., Valdés, A., Brito, M.A., Cifuentes, A. (2023). *In vitro* study of the blood-brain barrier transport of natural compounds recovered from agrifood by-products and microalgae. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 533. <https://doi.org/10.3390/ijms24010533>
- Sánchez-Martínez, J.D., Valdés, A., Gallego, R., Suárez-Montenegro, Z.J., Alarcón, M., Ibañez, E., Alvarez-Rivera, G., Cifuentes, A. (2022). Blood–brain barrier permeability study of potential neuroprotective compounds recovered from plants and agri-food by-products. *Frontiers in Nutrition*, 9, 924596. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.924596>
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2016). Flavonoids: Functions, metabolism and biotechnology. *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, Chapter 17, 469-496. <https://doi.org/10.1002/9783527681754.ch17>
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., González-Manzano, S. (2023). Phenolic acids and derivatives: Description, sources, properties, and applications. *Natural Secondary Metabolites: From Nature, Through Science, to Industry*, Chapter 3, 37-72. https://doi.org/10.1007/978-3-031-18587-8_3
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S. (2019). Plant phenolics as functional food ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research*, 90, Chapter 4, 183-257. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.012>
- Sarkar, A., Shamsuzzama, Kumar, L., Hameed, R., Nazir, A. (2022). Multiple checkpoints of protein clearance machinery are modulated by a common microRNA, miR-4813-3p, through its putative target genes: Studies employing transgenic *C. elegans* model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1869(12), 119342. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119342>
- Sarparast, M., Hinman, J., Pourmand, E., Vonarx, D., Ramirez, L., Ma, W., Liachko, N.F., Alan, J.K., Lee, K.S.S. (2023). Cytochrome P450 and epoxide hydrolase metabolites in A β and tau-induced neurodegeneration: Insights from *Caenorhabditis elegans*. *BioRxiv*, 2023.10.02.560527. <https://doi.org/10.1101/2023.10.02.560527>
- Schmidt, H.L., Garcia, A., Martins, A., Mello-Carpes, P.B., Carpes, F.P. (2017). Green tea supplementation produces better neuroprotective effects than red and black tea in Alzheimer-like rat model. *Food Research International*, 100, 442-448. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.026>
- Schuck, S. (2020). Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of Cell Science*, 133(17), 246322. <https://doi.org/10.1242/jcs.246322>
- Schulz, H.U., Schürer, M., Bässler, D., Weiser, D. (2005). Investigation of the bioavailability of hypericin, pseudohypericin, hyperforin and the flavonoids quercetin and isorhamnetin following single and multiple oral dosing of a hypericum extract containing tablet. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 55(1), 15-22. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296820>
- Schumacher, B., Schertel, C., Wittenburg, N., Tuck, S., Mitani, S., Gartner, A., Conradt, B., Shaham, S. (2005). *C. elegans ced-13* can promote apoptosis and is induced in response to DNA damage. *Cell Death & Differentiation*, 12(2), 153-161. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401539>
- Schwarz, D.S., Blower, M.D. (2016). The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 79-94. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2052-6>
- Selkoe, D.J., Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8, 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>

- Serra, A., Rubió, L., Borràs, X., Macià, A., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2012). Distribution of olive oil phenolic compounds in rat tissues after administration of a phenolic extract from olive cake. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(3), 486-496. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100436>
- Serra, D., Henriques, J.F., Serra, T., Silva, A.B., Bronze, M.R., Dinis, T.C.P., Almeida, L.M. (2020). An anthocyanin-rich extract obtained from portuguese blueberries maintains its efficacy in reducing microglia-driven neuroinflammation after simulated digestion. *Nutrients*, 12, 3670. <https://doi.org/10.3390/nu12123670>
- Serrano-Pozo, A., Das, S., Hyman, B.T. (2021). APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology*, 20(1), 68-80. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30412-9](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30412-9)
- Sharma, V.K., Singh, T.G., Singh, S., Garg, N., Dhiman, S. (2021). Apoptotic pathways and Alzheimer's disease: Probing therapeutic potential. *Neurochemical Research*, 46, 3103-3122. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03418-7>
- Shaye, D.D., Greenwald, I. (2011). OrthoList: A Compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLOS ONE*, 6(5), e20085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020085>
- Shen, N., Wang, T., Gan, Q., Liu, S., Wang, L., Jin, B. (2022). Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 383, 132531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>
- Shen, P., Yue, Y., Zheng, J., Park, Y. (2018). *Caenorhabditis elegans*: A Convenient *in vivo* model for assessing the impact of food bioactive compounds on obesity, aging, and Alzheimer's disease. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 1-22. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012709>
- Shi, X., Yu, X., Yang, L., Duan, X. (2023). Ethyl acetate extract of *Gastrodia elata* protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress and amyloid β peptide toxicity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 26(2), 405. <https://doi.org/10.3892/etm.2023.12104>
- Shishtar, E., Rogers, G.T., Blumberg, J.B., Au, R., Jacques, P.F. (2020). Long-term dietary flavonoid intake and risk of Alzheimer disease and related dementias in the Framingham Offspring Cohort. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 112(2), 343-353. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa079>
- Sierksma, A., Lu, A., Mancuso, R., Fattorelli, N., Thrupp, N., Salta, E., Zoco, J., Blum, D., Buée, L., De Strooper, B., Fiers, M. (2020). Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- β but not to TAU pathology. *EMBO Molecular Medicine*, 12, 201910606. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910606>
- Sies, H., Jones, D.P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Silva, M.C., Haggarty, S.J. (2020). Tauopathies: Deciphering disease mechanisms to develop effective therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8948. <https://doi.org/10.3390/ijms21238948>
- Simpson, D.S.A., Oliver, P.L. (2020). ROS generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants*, 9(8), 743. <https://doi.org/10.3390/antiox9080743>
- Singh, V., Aballay, A. (2006). Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditis elegans* immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13092-13097. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604050103>
- Singh-Manoux, A., Kivimaki, M., Glymour, M.M., Elbaz, A., Berr, C., Ebmeier, K.P., Ferrie, J.E., Dugravot, A. (2012). Timing of onset of cognitive decline: results from Whitehall II prospective cohort study. *BMJ*, 344, d7622. <https://doi.org/10.1136/bmj.d7622>
- Solleiro-Villavicencio, H., Rivas-Arancibia, S. (2018). Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 114. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00114>
- Song, Y., Cui, T., Xie, N., Zhang, X., Qian, Z., Liu, J. (2014). Protocatechuic acid improves cognitive deficits and attenuates amyloid deposits, inflammatory response in aged A β PP/PS1 double transgenic mice. *International Immunopharmacology*, 20(1), 276-281. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.03.006>
- Sorrentino, V., Romani, M., Mouchiroud, L., Beck, J.S., Zhang, H., D'Amico, D., Moullan, N., Potenza, F., Schmid, A.W., Rietsch, S., Counts, S.E., Auwerx, J. (2017). Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature*, 552, 187-193. <https://doi.org/10.1038/nature25143>
- Sperling, R.A., Mormino, E.C., Schultz, A.P., Betensky, R.A., Papp, K.V., Amariglio, R.E., Hanseeuw, B.J., Buckley, R., Chhatwal, J., Hedden, ... Johnson, K.A. (2019). The impact of amyloid-beta and tau on prospective cognitive decline in older individuals. *Annals of Neurology*, 85(2), 181-193. <https://doi.org/10.1002/ana.25395>

- Spires-Jones, T.L., Attems, J., Thal, D.R. (2017). Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 134, 187-205. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1709-7>
- Sternberg, P.W. (2005). Vulval development. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.6.1>
- Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1>
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111, A3.B.1-A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Sugi, T. (2017). Genome editing of *C. elegans*. *Genome Editing in Animals. Methods in Molecular Biology*, 1630, 247-254. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7128-2_20
- Surco-Laos, F., Cabello, J., Gómez-Orte, E., González-Manzano, S., González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C., Dueñas, M. (2011). Effects of O-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, 2(8), 445-456. <https://doi.org/10.1039/c1fo10049a>
- Surco-Laos, F., Dueñas, M., González-Manzano, S., Cabello, J., Santos-Buelga, C., González-Paramás, A.M. (2012). Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Research International*, 46(2), 514-521. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.014>
- Suresh, S., Vellapandian, C. (2024). Restoring impaired neurogenesis and alleviating oxidative stress by cyanidin against bisphenol A-induced neurotoxicity: *in vivo* and *in vitro* evidence. *Current Drug Discovery Technologies*, 21(2), e250124226256. <https://doi.org/10.2174/0115701638280481231228064532>
- Swerdlow, R.H. (2018). Mitochondria and mitochondrial cascades in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62(3), 1403-1416. <https://doi.org/10.3233/jad-170585>
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Vasciaveo, V., Tabaton, M. (2021). Oxidative stress and beta amyloid in Alzheimer's disease. Which comes first: The chicken or the egg? *Antioxidants*, 10(9), 1479. <https://doi.org/10.3390/antiox10091479>
- Tan, Q., Yan, X., Chen, L., Jiang, K., Guo, Z. (2025). Dietary flavonoids protect human brain microvascular endothelial cell from oxidative stress-induced dysfunction. *Molecular and Cellular Toxicology*, 21, 303-313. <https://doi.org/10.1007/s13273-024-00461-7>
- Teleanu, D.M., Niculescu, A.G., Lungu, I.I., Radu, C.I., Vladăncenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A.M., Teleanu, R.I. (2022). An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5938. <https://doi.org/10.3390/ijms23115938>
- Teleanu, R.I., Preda, M D., Niculescu, A.G., Vladăncenco, O., Radu, C.I., Grumezescu, A.M., Teleanu, D.M. (2022). Current strategies to enhance delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Pharmaceutics*, 14(5), 987. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050987>
- Terao, J., Murota, K., Kawai, Y. (2011). Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone *in vivo*. *Food & Function*, 2(1), 11-17. <https://doi.org/10.1039/c0fo00106f>
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, 282(5396), 2012-2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Thummayot, S., Tocharus, C., Suksamrarn, A., Tocharus, J. (2016). Neuroprotective effects of cyanidin against A β -induced oxidative and ER stress in SK-N-SH cells. *Neurochemistry International*, 101, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.09.016>
- Tohge, T., De Souza, L.P., Fernie, A.R. (2017). Current understanding of the pathways of flavonoid biosynthesis in model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 68(15), 4013-4028. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx177>
- Tolkovsky, A.M., Spillantini, M.G. (2021). Tau aggregation and its relation to selected forms of neuronal cell death. *Essays in Biochemistry*, 65(7), 847-857. <https://doi.org/10.1042/ebc20210030>
- Toral-Rios, D., Pichardo-Rojas, P.S., Alonso-Vanegas, M., Campos-Peña, V. (2020). GSK3 β and tau protein in Alzheimer's disease and epilepsy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 19. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00019>
- Torkzaban, B., Mohseni Ahooyi, T., Duggan, M., Amini, S., Khalili, K. (2020). Cross-talk between lipid homeostasis and endoplasmic reticulum stress in neurodegeneration: Insights for HIV-1 associated neurocognitive disorders (HAND). *Neurochemistry International*, 141, 104880. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104880>
- Torres, A.K., Mira, R.G., Pinto, C., Inestrosa, N.C. (2025). Studying the mechanisms of neurodegeneration: *C. elegans* advantages and opportunities. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 19, 1559151. <https://doi.org/10.3389/fncel.2025.1559151>

- Tsanova-Savova, S., Denev, P., Ribarova, F. (2018). Flavonoids in foods and their role in healthy nutrition. *Diet, Microbiome and Health*, Chapter 7, 165-198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811440-7.00007-7>
- Tylutka, A., Walas, Ł., Zembron-Lacny, A. (2024). Level of IL-6, TNF, and IL-1 β and age-related diseases: a systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Immunology*, 15, 1330386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1330386>
- Uddin, M.S., Al Mamun, A., Kabir, M.T., Ahmad, J., Jeandet, P., Sarwar, M.S., Ashraf, G.M., Aleya, L. (2020). Neuroprotective role of polyphenols against oxidative stress-mediated neurodegeneration. *European Journal of Pharmacology*, 886, 173412. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173412>
- Valle-Medina, A., Calzada-Mendoza, C.C., Ocharan-Hernández, M.E., Jiménez-Zamarripa, C.A., Juárez-Cedillo, T. (2025). Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease and other dementias: A possible alternative therapeutic. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 9. <https://doi.org/10.1177/25424823241307021>
- Vilchez, D., Morantte, I., Liu, Z., Douglas, P.M., Merkwirth, C., Rodrigues, A.P.C., Manning, G., Dillin, A. (2012). RPN-6 determines *C. elegans* longevity under proteotoxic stress conditions. *Nature*, 489, 263-268. <https://doi.org/10.1038/nature11315>
- Villemagne, V.L., Burnham, S., Bourgeat, P., Brown, B., Ellis, K.A., Salvado, O., Szeoke, C., Macaulay, S.L., Martins, R., Maruff, P., Ames, D., Rowe, C.C., Masters, C.L. (2013). Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *The Lancet Neurology*, 12(4), 357-367. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70044-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70044-9)
- Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szeoke, C., Salvado, O., Martins, R., O'Keefe, G., Mathis, C.A., Klunk, W.E., Ames, D., Masters, C.L., Rowe, C.C. (2011). Longitudinal assessment of A β and cognition in aging and Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 69(1), 181-192. <https://doi.org/10.1002/ana.22248>
- Viskupicova, J., Rezbarikova, P. (2022). Natural polyphenols as SERCA activators: Role in the endoplasmic reticulum stress-related diseases. *Molecules*, 27(16), 5095. <https://doi.org/10.3390/molecules27165095>
- Waigi, E.W., Webb, R.C., Moss, M.A., Uline, M.J., McCarthy, C.G., Wenceslau, C.F. (2023). Soluble and insoluble protein aggregates, endoplasmic reticulum stress, and vascular dysfunction in Alzheimer's disease and cardiovascular diseases. *GeroScience*, 45, 1411-1438. <https://doi.org/10.1007/s11357-023-00748-y>
- Waldherr, S.M., Strovass, T.J., Vadset, T.A., Liachko, N.F., Kraemer, B.C. (2019). Constitutive XBP-1s-mediated activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response protects against pathological tau. *Nature Communications*, 10, 4433. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12070-3>
- Walia, R., Chaudhary, K., Mehta, B., Madaan, R., Bala, R. (2021). Molecular pathways of apoptotic cell death. *Clinical Perspectives and Targeted Therapies in Apoptosis: Drug Discovery, Drug Delivery, and Disease Prevention*, Chapter 3, 79-109. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815762-6.00003-2>
- Wang, C., Fan, L., Khawaja, R.R., Liu, B., Zhan, L., Kodama, L., Chin, M., Li, Y., Le, D., Zhou, Y., Condello, C., Grinberg, L.T., Seeley, W.W., Miller, B.L., Mok, S.A., Gestwicki, J.E., Cuervo, A.M., Luo, W., Gan, L. (2022). Microglial NF- κ B drives tau spreading and toxicity in a mouse model of tauopathy. *Nature Communications*, 13, 1969. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29552-6>
- Wang, C., Saar, V., Leung, K.L., Chen, L., Wong, G. (2018). Human amyloid β peptide and tau co-expression impairs behavior and causes specific gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Disease*, 109, 88-101. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.10.003>
- Wang, D.M., Li, S. Q., Wu, W.L., Zhu, X.Y., Wang, Y., Yuan, H.Y. (2014). Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 39, 1533-1543. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1343-x>
- Wang, H., Zhang, S., Zhai, L., Sun, L., Zhao, D., Wang, Z., Li, X. (2021). Ginsenoside extract from ginseng extends lifespan and health span in *Caenorhabditis elegans*. *Food & Function*, 12(15), 6793-6808. <https://doi.org/10.1039/d1fo00576f>
- Wang, M., Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature*, 529, 326-335. <https://doi.org/10.1038/nature17041>
- Wang, M., Lu, Y., Wu, Q., Chen, G., Zhao, H., Ho, C.T., Li, S. (2023). Biotransformation and gut microbiota-mediated bioactivity of flavonols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(22), 8317-8331. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c01087>
- Wang, P., Yang, P., Qian, K., Li, Y., Xu, S., Meng, R., Guo, Q., Cheng, Y., Cao, J., Xu, M., Lu, W., Zhang, Q. (2022). Precise gene delivery systems with detachable albumin shell remodeling dysfunctional microglia by TREM2 for treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 281, 121360. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121360>

- Wang, Q., Huang, H., Yang, Y., Yang, X., Li, X., Zhong, W., Wen, B., He, F., Li, J. (2024). Reinventing gut health: leveraging dietary bioactive compounds for the prevention and treatment of diseases. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1491821. <https://doi.org/10.3389/fnut.2024.1491821>
- Wang, S., Yang, Y., Lin, J., Zhang, W., Yang, C., Zhang, R., Zhou, C., Zhang, L., Wang, X., Liu, J., Jin, X., Ma, Y. (2025). Astragalin activates autophagy and inhibits apoptosis of astrocytes in AD mice via down-regulating Fas/FasL-VDAC1 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 232, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2025.02.047>
- Wang, Y., Cai, B., Shao, J., Wang, T.T., Cai, R.Z., Ma, C.J., Han, T., Du, J. (2016). Genistein suppresses the mitochondrial apoptotic pathway in hippocampal neurons in rats with Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 11(7), 1153-1158. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.187056>
- Wang, Y., Le, W.D. (2019). Autophagy and ubiquitin-proteasome system. *Autophagy: Biology and Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1206. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_25
- Wang, Y., Xie, H., Li, Z., Jiao, J., Jiang, Y., Xu, Y., Zhang, Z., Wu, J., Chen, Z., Wang, J. (2025). Rapid characterization of the chemical composition and metabolic transformation of flavonoids in Da-Cheng-Qi Decoction guided by feature-based molecular networking and sequential metabolism strategy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 263, 116950. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2025.116950>
- Wang, Y.J., Thomas, P., Zhong, J.H., Bi, F.F., Kosaraju, S., Pollard, A., Fenech, M., Zhou, X.F. (2009). Consumption of grape seed extract prevents amyloid- β deposition and attenuates inflammation in brain of an alzheimer's disease mouse. *Neurotoxicity Research*, 15, 3-14. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9000-x>
- Watanabe, Y., Tsujimura, A., Taguchi, K., Tanaka, M. (2017). HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis. *Autophagy*, 13(1), 133-148. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1248018>
- Weaver, D.F. (2023). Alzheimer's disease as an innate autoimmune disease (AD²): A new molecular paradigm. *Alzheimer's and Dementia*, 19(3), 1086-1098. <https://doi.org/10.1002/alz.12789>
- Wegmann, S., Biernat, J., Mandelkow, E. (2021). A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 69, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2021.03.003>
- Wei, J.C.C., Huang, H.C., Chen, W.J., Huang, C.N., Peng, C.H., Lin, C.L. (2016). Epigallocatechin gallate attenuates amyloid β -induced inflammation and neurotoxicity in EOC 13.31 microglia. *European Journal of Pharmacology*, 770, 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.048>
- Weksler, B., Romero, I.A., Couraud, P.O. (2013). The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS*, 10, 16. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-16>
- Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., Yang, B. (2017). Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398(1), 120-129. <https://doi.org/10.1111/nyas.13350>
- Wenzel, D., Palladino, F., Jedrusik-Bode, M. (2011). Epigenetics in *C. elegans*: Facts and challenges. *Genesis*, 49(8), 647-661. <https://doi.org/10.1002/dvg.20762>
- Wheeler, J.M., McMillan, P., Strovos, T.J., Liachko, N.F., Amlie-Wolf, A., Kow, R.L., Klein, R.L., Szot, P., Robinson, L., Guthrie, C., ... Kraemer, B. (2019). Activity of the poly(A) binding protein MSUT2 determines susceptibility to pathological tau in the mammalian brain. *Science Translational Medicine*, 11(523), 6545. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao6545>
- White, J., Southgate, E., Thomson, J., Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 314(1165), 1-340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Więckowska-Gacek, A., Mietelska-Porowska, A., Wydrych, M., Wojda, U. (2021). Western diet as a trigger of Alzheimer's disease: From metabolic syndrome and systemic inflammation to neuroinflammation and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 70, 101397. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101397>
- Williamson, G. (2025). Bioavailability of food polyphenols: Current state of knowledge. *Annual Review of Food Science and Technology*, 16, 315-332. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-023817>
- Williamson, G., Clifford, M.N. (2017). Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology*, 139, 24-39. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.03.012>
- Williamson, G., Kay, C.D., Crozier, A. (2018). The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1054-1112. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12351>

- Wilson, E.L., Metzakopian, E. (2021). ER-mitochondria contact sites in neurodegeneration: genetic screening approaches to investigate novel disease mechanisms. *Cell Death and Differentiation*, 28, 1804-1821. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00705-8>
- Wilson, R.K. (1999). How the worm was won: The *C. elegans* genome sequencing project. *Trends in Genetics*, 15(2), 51-58. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(98\)01666-7](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(98)01666-7)
- Wilton, D.K., Dissing-Olesen, L., Stevens, B. (2019). Neuron-glia signaling in synapse elimination. *Annual Review of Neuroscience*, 42, 107-127. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050306>
- Wu Yi-Chun, Horvitz H.R. (1998). The *C. elegans* cell corpse engulfment gene *ced-7* encodes a protein similar to ABC transporters. *Cell*, 93(6), 951-960. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81201-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81201-5)
- Wu, D., Zhang, H., Li, F., Liu, S., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, J., Wu, Q. (2024). Resveratrol alleviates acute lung injury in mice by promoting Pink1/Parkin-related mitophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1868(7), 130612. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2024.130612>
- Wu, Y., Wu, Z., Butko, P., Christen, Y., Lambert, M.P., Klein, W.L., Link, C.D., Luo, Y. (2006). Amyloid- β -induced pathological behaviors are suppressed by *Ginkgo biloba* extract EGB 761 and ginkgolides in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 26(50), 13102-13113. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3448-06.2006>
- Wu, Y.L., Chang, J.C., Lin, W.Y., Li, C.C., Hsieh, M., Chen, H.W., Wang, T.S., Wu, W.T., Liu, C.S., Liu, K.L. (2018). Caffeic acid and resveratrol ameliorate cellular damage in cell and *Drosophila* models of spinocerebellar ataxia type 3 through upregulation of Nrf2 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 115, 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.011>
- Wu, Z., Wu, A., Dong, J., Sigears, A., Lu, B. (2018). Grape skin extract improves muscle function and extends lifespan of a *Drosophila* model of Parkinson's disease through activation of mitophagy. *Experimental Gerontology*, 113, 10-17. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.09.014>
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1874-1905. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1032400>
- Xiao, Y., Li, Y., Zhang, H., Yang, L., Jiang, Y., Wei, C., Feng, X., Xun, Y., Yuan, S., Xiang, S., Liu, N. (2021). TNFAIP1 is upregulated in APP/PS1 mice and promotes apoptosis in SH-SY5Y cells by binding to RhoB. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71, 1221-1233. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01748-9>
- Xiao, Y., Zhang, Y., Li, L., Jiang, N., Yu, C., Li, S., Zhu, X., Liu, F., Liu, Y. (2024). Cynaroside extends lifespan and improves the neurodegeneration diseases via insulin/IGF-1 signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 122, 105377. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2024.105377>
- Xie, C., Zhuang, X.X., Niu, Z., Ai, R., Lautrup, S., Zheng, S., Jiang, Y., Han, R., Gupta, ... Fang, E.F. (2022). Amelioration of Alzheimer's disease pathology by mitophagy inducers identified via machine learning and a cross-species workflow. *Nature Biomedical Engineering*, 6, 76-93. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00819-5>
- Xu, L., Wang, X. (2025). A comprehensive review of phenolic compounds in horticultural plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5767. <https://doi.org/10.3390/ijms26125767>
- Yan, L., Guo, M.S., Zhang, Y., Yu, L., Wu, J.M., Tang, Y., Ai, W., Zhu, F.D., Law, B.Y.K., ... Wu, A.G. (2022). Dietary plant polyphenols as the potential drugs in neurodegenerative diseases: Current evidence, advances, and opportunities. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 5288698. <https://doi.org/10.1155/2022/5288698>
- Yang, P., Zhang, H. (2011). The coiled-coil domain protein EPG-8 plays an essential role in the autophagy pathway in *C. elegans*. *Autophagy*, 7(2), 159-165. <https://doi.org/10.4161/auto.7.2.14223>
- Yang, X., Zhang, M., Dai, Y., Sun, Y., Aman, Y., Xu, Y., Yu, P., Zheng, Y., Yang, J., Zhu, X. (2020). Spermidine inhibits neurodegeneration and delays aging via the PINK1-PDR1-dependent mitophagy pathway in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)*, 12(17), 16852-16866. <https://doi.org/10.18632/aging.103578>
- Yao, R., Shen, J. (2023). Chaperone-mediated autophagy: Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. *MedComm*, 4(5), e347. <https://doi.org/10.1002/mco2.347>
- Yashaeva, L., Montoya, M., Joshi, J., Stephens, A., McNulty, O., Kaur, G. (2025). Advancing care in Alzheimer's disease: Current treatments and their impact on quality of life. *Cureus*, 17(8), e90527. <https://doi.org/10.7759/cureus.90527>
- Ysrafil, Y., Sapiun, Z., Slamet, N.S., Mohamad, F., Hartati, H., Damiti, S.A., Alexandra, F.D., Rahman, S., Masyeni, S., Harapan, H., Mamada, S.S., Emran, T. Bin, Nainu, F. (2023). Anti-inflammatory activities of flavonoid derivatives. *ADMET and DMPK*, 11(3), 331-359. <https://doi.org/10.5599/admet.1918>

- Zatsepina, O.G., Evgen'ev, M.B., Garbuz, D.G. (2021). Role of a heat shock transcription factor and the major heat shock protein Hsp70 in memory formation and neuroprotection. *Cells*, 10(7), 1638. <https://doi.org/10.3390/cells10071638>
- Zečić, A., Braeckman, B.P. (2020). DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and its role in metabolic remodeling. *Cells*, 9(1), 109. <https://doi.org/10.3390/cells9010109>
- Zegarra-Valdivia, J., Arana-Nombero, H., Perez-Fernandez, L., Casimiro, M.R., Gallegos-Manayay, V., Oliva-Piscoya, M.R., Alamo-Medina, R., Abanto-Saldaña, E., Cruz-Ordinola, M.C., Paredes-Manrique, C., Chino-Vilca, B. (2025). Insulin-like Growth Factor 1 impact on Alzheimer's disease: Role in inflammation, stress, and cognition. *Current Issues in Molecular Biology*, 47(4), 233. <https://doi.org/10.3390/cimb47040233>
- Zegarra-Valdivia, J.A., Santi, A., Fernández De Sevilla, M.E., Nuñez, A., Torres Aleman, I. (2019). Serum Insulin-Like Growth Factor I deficiency associates to Alzheimer's disease co-morbidities. *Journal of Alzheimer's Disease*, 69(4), 979-987. <https://doi.org/10.3233/jad-190241>
- Zeng, Y.Q., Wang, Y.J., Zhou, X.F. (2014). Effects of (-)-epicatechin on the pathology of APP/PS1 transgenic mice. *Frontiers in Neurology*, 5, 69. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00069>
- Zhang, C. (2023). Etiology of Alzheimer's disease. *Discovery Medicine*, 35(178), 757-776. <https://doi.org/10.24976/discov.med.202335178.71>
- Zhang, H., Baehrecke, E.H. (2015). Eaten alive: Novel insights into autophagy from multicellular model systems. *Trends in Cell Biology*, 25(7), 376-387. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.03.001>
- Zhang, H., Hassan, Y.I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., Tsao, R. (2020). Molecular mechanisms underlying the absorption of aglycone and glycosidic flavonoids in a Caco-2 BBc1 cell model. *ACS Omega*, 5(19), 10782-10793. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00379>
- Zhang, L., Han, Z., Granato, D. (2021). Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. *Advances in Food and Nutrition Research*, 98, Chapter One. 1-33. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2021.02.004>
- Zhang, N., Hu, Z., Zhang, Z., Liu, G., Wang, Y., Ren, Y., Wu, X., Geng, F. (2017). Protective role of naringenin against A β ₂₅₋₃₅-caused damage via ER and PI3K/Akt-mediated pathways. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38, 549-557. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0519-8>
- Zhang, Q., Yan, Y. (2023). The role of natural flavonoids on neuroinflammation as a therapeutic target for Alzheimer's disease: a narrative review. *Neural Regeneration Research*, 18(12), 2582-2591. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.373680>
- Zhang, S., Wang, H., Wang, J., Jin, W., Yan, X., Chen, X., Wang, D., Zhao, D., Wang, Y., Cong, D., Sun, L. (2022). Ginsenoside Rf inhibits human tau proteotoxicity and causes specific lncRNA, miRNA and mRNA expression changes in *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy. *European Journal of Pharmacology*, 922, 174887. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.174887>
- Zhang, Y., Chen, D., Smith, M.A., Zhang, B., Pan, X. (2012). Selection of reliable reference genes in *Caenorhabditis elegans* for analysis of nanotoxicity. *PLoS ONE*, 7, e31849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031849>
- Zhang, Y.J., Wu, L., Zhang, Q.L., Li, J., Yin, F.X., Yuan, Y. (2011). Pharmacokinetics of phenolic compounds of Danshen extract in rat blood and brain by microdialysis sampling. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.023>
- Zhao, Q.F., Yu, J.T., Tan, M.S., Tan, L. (2015). ABCA7 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 51, 1008-1016. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8759-9>
- Zheng, Q., Kebede, M.T., Keme, M.M., Islam, S., Lee, B., Bleck, S.D., Wurfl, L.A., Lazo, N.D. (2019). Inhibition of the self-assembly of A β and of tau by polyphenols: Mechanistic studies. *Molecules*, 24(12), 2316. <https://doi.org/10.3390/molecules24122316>
- Zhou, M., Ma, J., Kang, M., Tang, W., Xia, S., Yin, J., Yin, Y. (2024). Flavonoids, gut microbiota, and host lipid metabolism. *Engineering in Life Sciences*, 24(5), 2300065. <https://doi.org/10.1002/elsc.202300065>
- Zou, Z., Cheng, X., Chen, J., Xing, C., Zhang, C., Guo, X., Cao, H., Hu, G., Zhuang, Y. (2025). Curcumin alleviates atrazine-induced nephrotoxicity by enhancing mitophagy through PINK1/Parkin signaling pathway in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 295, 118118. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.118118>
- Zubić, K., Radovanović, V., Vlajnić, J., Hof, P.R., Oršolić, N., Šimić, G., Jazvinščak Jembrek, M. (2020). PI3K/Akt and ERK1/2 signalling are involved in quercetin-mediated neuroprotection against copper-induced injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 9834742. <https://doi.org/10.1155/2020/9834742>