



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos implicados en la neurodegeneración inducida por dieta grasa en modelos de senescencia

Verónica Palomera Ávalos

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA
TERAPÉUTICA

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR DIETA GRASA EN MODELOS DE SENESCENCIA

VERÓNICA PALOMERA ÁVALOS
2018

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y QUÍMICA
TERAPÉUTICA

BIOTECNOLOGÍA

MECANISMOS IMPLICADOS EN LA
NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA
POR DIETA GRASA EN MODELOS DE
SENESCENCIA

Memoria presentada por Verónica Palomera Ávalos para optar por
el título de doctor por la Universidad de Barcelona

Directora

Directora

Doctorando

Mercè Pallàs Lliberia

Anna María Canudas Teixido

Verónica Palomera Ávalos

Verónica Palomera Ávalos
2018

La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla.
(Marie Curie, 1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

Sin duda alguna la finalización de esta tesis fue gracias a la ayuda y el apoyo de muchas personas que durante cuatro años han sido parte fundamental en el doctorado y sin las cuales hubiera sido imposible haber llegado hasta aquí.

Es por eso que estos agradecimientos están divididos en dos partes: Barcelona y México.

Barcelona

Primero que nada, quiero agradecer a la Dra. Mercè Pallàs, por haberme recibido en su grupo de trabajo. Gracias por ser una excelente directora pero sobre todo gracias por esa calidez humana, ese interés personal y esa preocupación que siempre muestras a quienes estamos a tu lado. No solo me apoyaste académicamente sino que siempre has estado pendiente de mi y me has hecho sentir en todo momento que cuento contigo. Eres una mujer realmente admirable y te estaré infinitamente agradecida por todo lo enseñado y por este doctorado que ha marcado mi vida. Simplemente gracias, Mercè .

Quiero agradecer muy especialmente a Christian Griñan, por la cual esta tesis no hubiera sido posible sin tu enorme ayuda. Gracias por todo lo enseñado, tus valiosos consejos y tu apoyo emocional. Muchas gracias por todos los momentos vividos y por el cariño que siempre me has mostrado.

Gracias a la Dra. Anna María Canudas por su ayuda y comentarios para ésta tesis.

Agradecerle a la Dra. Coral Sanfeliu toda su apoyo, sus comentarios y su siempre disposición para que los artículos y esta tesis salieran adelante.

Gracias a Dolors por siempre tener palabras de aliento, por escucharme, entenderme y por ser más que una compañera de doctorado. Eres una gran amiga.

Gracias a Vanesa por el cariño y por toda la ayuda en este proceso del doctorado, te convertiste de alumna a una muy buena amiga.

Gracias a Fotini que aunque ha sido poco el tiempo de conocernos hemos tenido una bonita amistad. Gracias a Julia porque siempre ha estado dispuesta a ayudar y por todo su apoyo desde que llego.

Gracias a Eirini, Sofia y Celia con quienes compartí la primera etapa del doctorado y se convirtieron en amigas entrañables.

Gracias a todos los que han pasado por nuestro grupo en el laboratorio, ya que han hecho posible llevar a cabo gran parte del trabajo, especialmente a Nuria, Alexandra, Aitor y Pol.

Agradezco de manera muy especial a Mario, gracias por todo tu cariño, por todas esas charlas y por esos consejos que me han enriquecido como persona. Tu haces que todo se pueda ver con mas optimismo.

Gracias a Leti, que en ésta última etapa siempre ha sido un apoyo muy importante, gracias por compartir tantos y tan buenos momentos inolvidables. Te quiero cocker.

Agradezco de manera muy especial a quienes más que compañeros de laboratorio han sido amigos incondicionales, Javier (Calabaza), Lucia, Gaia, Silvia, David, Sergi, Leti, Dolos, Vanesa, Fotini, y Mario, gracias por ser ese grupo de amigos que hacen que el trabajo sea más ameno (sois un ejemplo a seguir). Y por supuesto, por compartir tantos cumpleaños, viajes, cervezas y muchas pero que muchas sonrisas.

Agradecer a los compañeros de Laboratorio que me han ayudado siempre que lo he necesitado, muchas gracias a Luisa, Andrés, Miren, Oriol, Raúl, Sonia, Gemma, Miguel, Emma y Mohamed.

Gracias a todo el personal del departamento, en especial a Mar y a Silvia porque sin su ayuda sería mas complicado el doctorado.

De manera especial quiero agradecer al personal del estabulario de la Facultad de Farmacia, su ayuda ha sido de suma importancia para realizar todo el trabajo con los ratolins para esta tesis. Gracias a Tere, Martha, David y Paula.

Mi agradecimiento mas profundo a los grandes amigos incondicionales que he encontrado durante el camino en Barcelona, a Hussein, Dan, Cristina, Rayner, Homar, Ivan y Roser. Gracias por todo los momentos que me han brindado y por las palabras de apoyo que han hecho que momentos difíciles sean mas llevaderos, pero sobre todo por las risas y las charlas interminables.

Gracias a Nela Monasterio por toda la ayuda para la tesis y por ser una estupenda amiga, siempre incondicional y con los mejores consejos y palabras acertadas. Te quiero mucho Nelita.

Gracias infinitas a mi pareja Sergio, muchas gracias cariño por apoyarme y caminar junto a mi en esta última etapa, gracias por todo el amor que me das, por estar siempre a mi lado y preocuparte por mi en todo momento, me has cambiado la vida, porque hemos comenzado un viaje juntos "sin frenos ni fronteras"... te amo.

México

Quiero agradecer de manera muy especial a Verónica Rosas, toquita muchísimas gracias por toda tu ayuda con la beca, sin todo lo que has hecho por mi definitivamente no la tendría. Pero sobre todo quiero agradecerte por la amistad de tantos años, por ser mi mejor amiga, por estar siempre preocupada por mi, por nunca dejarme sola aún en la distancia y por todo ese cariño que hay entre nosotras. Te quiero mucho.

Gracias a Josefina Casas, gracias Pinuchis por toda tu ayuda con la beca, por estar en esos momentos difíciles que me tocó vivir, tú fuiste de las primeras personas en ayudarme. Te agradezco enormemente tu amistad y tu cariño.

Gracias a la Dra. Anne Santerre, gracias Anne porque tú también fuiste de las primeras personas en ayudarme en los momentos complicados, gracias por toda la ayuda en todos los sentidos... has sido parte importante antes y

durante el doctorado y no tengo palabras para agradecerte todo el cariño que me tienes y todo lo que me has dado. Te sigo admirando enormemente.

Gracias a la Dra. Patricia Castro, gracias Paty porque siempre has estado ahí, gracias por apoyarme y saber que cuento contigo en cualquier momento. Eres parte fundamental en mi crecimiento como persona y como profesional, te agradezco por todo el cariño y por esa amistad que sigue sumando años.

Gracias a Brenda, gracias tutoriada favorita porque aún estando lejos me sigues queriendo tanto y me apoyas. Nos escuchamos, reímos y nos damos ánimos una a la otra. Te quiero Brendarks.

Gracias a Eduardo Sosa, gracias Lalín por ser mi amigo, porque cada vez que nos vemos es genial, porque te intereso, por ese cariño que ha ido creciendo con los años.

Gracias a Laura Izascum, querida comadreja mil gracias por todo tu amor, gracias por estar siempre a mi lado, gracias por los años de amistad que hemos tenido, por todo tu apoyo en esta etapa. Te quiero Lau.

Gracias al Dr. Daniel Ortuño, gracias Daniel porque me has ayudado tanto para poder hacer el doctorado, siempre dispuesto a ayudarme, te lo agradezco muchísimo, has sido una parte fundamental ya que no solo hemos compartido cosas académicas sino que ha trascendido a una linda amistad. Me has hecho saber que siempre cuento contigo y has estado ahí para demostrármelo. Simplemente GRACIAS.

Finalmente quiero agradecer y dedicar esta tesis a mis padres José y Aurora, porque cada logro es para ellos. Porque me han enseñado a salir adelante a pesar de las adversidades. Son el mejor ejemplo que puedo tener en la vida. Los amo...!!!

Este trabajo ha sido realizado en el departamento de Farmacología y Química Terapéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y ha estado financiado por:

Ministerio de Economía y Competitividad
(proyectos SAF-2012-39852 y SAF2009-13093)

Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas
(CIBERNED)

Generalitat de Catalunya
(2009/SGR00853)

Beca otorgada por la Universidad de Guadalajara. México.



Institut de Neurociències
UNIVERSITAT DE BARCELONA

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
RESUMEN	25
1. INTRODUCCIÓN	27
1. ENVEJECIMIENTO	29
1.1 Teorías del envejecimiento	36
1.2 Envejecimiento y Neurodegeneración	39
2. DETERIORO COGNITIVO EN EL ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	46
2.1 Demencia	46
2.2. Enfermedad de Alzheimer	50
2.2.1 Hipótesis cascada amiloide	50
2.2.2 Hipótesis Tau	52
2.2.2.1 Regulación de la actividad GSK3 a través de la vía de Wnt	55
2.3 Neuroinflamación en el envejecimiento y la EA	56
2.4 Disfunción Mitocondrial: Implicación en el envejecimiento y la EA	58
2.5 Papel de la mitocondria en el envejecimiento y EA: Dinámica mitocondrial	61
2.5.1. Fisión y Fusión mitocondrial	62
2.5.2. Biogénesis mitocondrial	64
3. RESVERATROL	66
3.1 Generalidades	66
3.1.1 Estructura química	66
3.1.2 Fuentes de resveratrol en la naturaleza	67

3.1.3 Solubilidad, Biodisponibilidad e Ingesta recomendada	68
3.1.4 Propiedades anti-oxidantes	69
3.1.5 Propiedades anti-inflamatorias	70
4. DIETA GRASA COMO ACELERADOR DEL DETERIORO COGNITIVO	71
5. EPIGENÉTICA Y NEURODEGENERACIÓN	74
5.1. Modificaciones Epigenéticas	74
5.1.1. Metilación e Hidroximetilación	74
5.1.2. Modificaciones postraduccionales de Histonas	75
5.1.3. Intercambio de variante de Histona	76
6. MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES DE ENVEJECIMIENTO..	79
6.1. Ratón de senescencia acelerada (SAMP8)	79
6.1.1. Cambios bioquímicos en SAMP8	81
6.1.1.1. Estrés Oxidativo	81
6.1.1.2. Patología amiloide β en SAMP8	82
6.1.1.3. Taupatía en SAMP8	84
2. OBJETIVOS	85
3. RESULTADOS	91
Publicación 1: Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway	93
Publicación 2: Metabolic Stress Induces Cognitive Disturbances and Inflammation in Aged Mice: Protective Role of Resveratrol	113
Publicación 3: Resveratrol Modulates Response Againsts An Acute Inflammatory Stimuli In Aged Mouse Brain	133
4. DISCUSIÓN	147
• Resveratrol como protector del cerebro de ratones SAMP8 bajo estrés metabólico	151

- Efectos del resveratrol en el envejecimiento de ratones C57BL/6J bajo estrés metabólico156
- El resveratrol aumenta la respuesta ante un estímulo inflamatorio agudo en ratones C57BL/6J envejecidos163

5. CONCLUSIONES167

6. BIBLIOGRAFÍA171

ABREVIATURAS

- 3xTgAD:** Del inglés "*Triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease*"
- 4-HNE:** 4-hidroxi-2-trans-nonenal
- 5-hmC:** 5-hidroximetilación
- 5-mC:** 5-metilación
- µg:** microgramos
- Aβ:** β-amiloide
- ADAM-10:** Del inglés "*Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein 10*"
- AGE:** Del inglés "*Advanced Glycation End Products*"
- ALDH2:** Del inglés "*Aldehyde Dehydrogenase*"
- AMP:** Del inglés "*Adenosine monophosphate*"
- AMPK:** Del inglés "*Adenosine Monophosphate Kinase*"
- APP:** Del inglés "*Amyloid precursor protein*"
- APP_{sα}:** Del inglés "*Larger soluble extracellular N-terminal portions of APP*"
- ARE:** Del inglés "*Antioxidant response element*"
- ATF4:** Del inglés "*Activating Transcription Factor 4*"
- ATP:** Del inglés "*Adenosine triphosphate*"
- BACE1:** Del inglés "*β-site APP cleaving enzyme 1*"
- BDNF:** Del inglés "*Brain-derived neurotrophic factor*"
- C83:** C-terminal de 83 residuos
- C99:** Amyloidogenic C-terminal fragment
- CaMKII:** Cinasa de la Calmodulina II
- CAT:** Catalasa
- CCL3:** Del inglés "*Chemokine (C-C motif) ligand 3*"
- CDK-5:** Del inglés "*Cycling dependent kinase 5*"
- CKII:** Caseína cinasa II
- CI-NDUFB8:** NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8
- CII-SDHB:** Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit
- CIII-UQCRC2:** Cytochrome b-c1 complex subunit 2

CIV-MTCQ1: Cytochrome c oxidase subunit 1
CV-ATPase: ATP synthase
CoQ: Coenzima Q
COX2: Citocromo-oxidasa 2
CXCL10: C-X-C motif chemokine 10
CX3CL1: Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
DAG: Diacil-glicerol
DCL: Demencia con Cuerpos de Lewy
DLFT: Degeneración Lobar Frontotemporal
DKK: Dickoff
DNA: Del inglés "deoxyribonucleic acid"
DNMT: Metiltransferasas
DNMT1: DNA metiltransferasa de mantenimiento 1
DNMT3A: DNA metiltransferasa 3A
DNMT3B: DNA metiltransferasa 3B
DRP1: Del inglés "*Dynammin-related protein 1*"
Dvl 3: Dishevelled 3
eIF2 α : Del inglés "*Eukariotic Initiation Factor 2*"
eIF4E: Del inglés "*Eukariotec translation initiation factor 4E*"
EA: Enfermedad de Alzheimer
EO: Estrés oxidativo
EP: Enfermedad de Parkinson
EPM: Del inglés "*Elevated Plus Maze*"
ERAD: Del inglés "*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*"
ERR- α : Del inglés "*Estrogen-related receptor alpha*"
ETC: Del inglés "*Electron Transport Chain*"
FIS1: Del inglés "*Mitochondrial fission 1 protein*"
Fz: Frizzled
g: gramos
GPX: Glutación peroxidasa
GSH: Glutación

GSK-3: Cinasa glucógeno sintasa 3
GTPasas: Guanosina trifosfatasa
HATs: Histonas acetil transferasas
HDACs: Histonas desacetilasas
HF: Del inglés "High Fat"
HMTs: Histonas metil transferasas
HO-1: Hemoxigenasa -1
H₂O₂: Peróxido de hidrogeno
ID: Índice de discriminación
IDE: Del inglés "*Insulin degrading enzyme*"
IFN γ : Interferon gamma
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL: Citocinas
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-6: Interleucina 6
iNOS: Del inglés "*Inducible nitric oxide synthase*"
IP3: inositol trifosfato
IRE: Del inglés "*Iron response element*"
JNK: cinasa Jun N-terminal
kg: kilogramos
KDMs: histonas demetilasas
Leu: Leucina
LEF: Factor de unión a potenciador linfoide
LPS: Lipopolisacárido
Lys: Lisina
mg: miligramos
MAC: Complejo de ataque de membrana
MAP: Proteína asociada a los microtúbulos
MAPK: Proteína cinasa activada por mitógenos
MARK: Cinasa reguladora de afinidad entre MAPs/microtúbulos
MHC II: Complejo de histocompatibilidad principal II

MIP-1 α : Macrófagos inflamatorios de la proteína-1 α
miR: micro RNAs
mtDNA: Del inglés "*Deoxyribonucleic acid mitochondrial*"
mTOR: Del inglés "*Mammalian target of rapamycin*"
MFN1: Mitofusina 1
MFN2: Mitofusina 2
MEM: Membrana externa mitocondrial
MIMs: Membranas internas mitocondriales
MWM: Del inglés "*Morris water maze*"
NAD: Del inglés "*Nicotine adenine dinucleotide*"
NADPH⁺: Del inglés "*Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa*"
ND: Del inglés "*Normal Diet*"
Nts: Nucleotidos
NMDA: Del inglés "*N-methyl-D-aspartate receptores de glutamato*"
NO•: Óxido nítrico
NRF1: Del inglés "*Nuclear factor erythroid-derived 1*"
NRF2: Del inglés "*Nuclear factor erythroid-derived 2*"
NF- κ B: Del inglés "*Nuclear factor $\kappa\beta$* "
NFTs: Del inglés "*Neurofibrillary Tangles*"
NORT: Del inglés "*Novel Object Recognition Test*"
NOS: Óxido nítrico sintasa
O₂⁻: Superóxido
OF: Del inglés "*Open Field*"
OH: Radicales hidroxilo
ONO₂⁻: Peróxido nítrico
OONO⁻: Radical peroxinitrato
OPA1: Del inglés "*Optic Atrophy1*"
OXPHOS: Del inglés "*Oxidative Phosphorylation*"
p70S6K: Del inglés "*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*"
PGC1- α : Del inglés "*Peroxisome proliferator-activated*"
PRXs: Peroxirredoxinas

PERK: Del inglés "*Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*"

PKA: Proteína cinasa A

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Proteínas G activen la fosfolipasa

PS-1: Presenilina-1

PUFAs: Del inglés "*Polyunsaturated fatty acid*"

ROS: Del inglés "*Reactive oxygen species*"

RONS: Del inglés "*Reactive oxygen and nitrogen species*"

redox: óxido-reducción

RE: Retículo Endoplasmático

RNA: Del inglés "*Ribonucleic acid*"

RNS: Del inglés "*Reactive nitrogen species*"

RAGE: Receptor para el producto final de glicación avanzada

ROS: Del inglés "*Reactive oxygen species*"

RV: Resveratrol

SAM: S-adenosil-1-metionina

SAM: Del inglés "*Senescence accelerated mouse*"

SAMP: Del inglés "*Senescence accelerated mouse prone*"

SAMR: Del inglés "*Senescence accelerated mouse resistant*"

SIRT1: Sirtuina 1

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD: Superóxido dismutasa

STAT: Del inglés "*Signal transducer and activator of transcription*"

TCF: Factor de transcripción específico de células T

TFAM: Del inglés "*Mitochondrial transcription factor A*"

TNF- α : Del inglés "*Tumor necrosis factor alpha*"

TGF- β : Del inglés "*Transforming growth factor*"

TET: Del inglés "*Ten-Eleven Translocation*"

TLR4: Del inglés "*Toll-Like Receptor 4*"

UPR: Del inglés "*Unfolded protein respon*"

VDAC1: Del inglés "*Voltage-dependent anion channel 1*"

RESUMEN

La población mundial está envejeciendo, la mayoría de países del mundo están experimentando un aumento en el número y la proporción de personas mayores. Los últimos datos publicados de la ONU en 2017 informan que se espera que el número de personas mayores de 60 años o más se duplique para el 2050 y triplique para 2100; pasará de 962 millones en 2017 a 2.100 millones en 2050 y 3.100 millones en 2100.

Al aumentar la esperanza de vida también se incrementan de manera paralela las patologías relacionadas con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. La tasa de envejecimiento y la aparición de patologías relacionadas con la edad están moduladas por la respuesta al estrés y las vías de reparación que se disminuyen gradualmente, incluidas la proteostasis y el daño mitocondrial, entre otras cosas. Por otro lado, en los últimos años se ha observado también que la obesidad está creciendo en todo el mundo, en parte debido a un aumento en el consumo de dietas altas en grasas. Se ha establecido que la obesidad es un factor de riesgo para desarrollar enfermedades neurodegenerativas.

En este contexto, y dado que el envejecimiento junto con una dieta alta en grasa son los principales factores de riesgo para desarrollar diferentes trastornos neurodegenerativos, nos planteamos estudiar cuales son los mecanismos implicados en la neurodegeneración inducidos por una dieta alta en grasas en modelos murinos. Además, estudiamos como el resveratrol, un polifenol ampliamente conocido por sus efectos beneficiosos en la salud, ejerce un efecto neuroprotector en el cerebro de los ratones.

Para éste estudio utilizamos un modelo de ratón que presenta senescencia acelerada y otra cepa silvestre con envejecimiento normal. Los resultados en este trabajo demuestran que el estrés metabólico inducido por la dieta alta en grasa produce daños significativos en la memoria y el aprendizaje, además altera vías moleculares importantes implicadas en las enfermedades neurodegenerativas así como daño mitocondrial, aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y alteraciones en marcadores de estrés oxidativo en el hipocampo. Finalmente, la mayoría de estos procesos alterados por el estrés metabólico fueron prevenidos por el resveratrol, ayudando al organismo a tener una mejor respuesta ante el daño provocado.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis proponen que se puede utilizar el resveratrol como un tratamiento preventivo y que se puede considerar como una estrategia para reducir los efectos nocivos provocados por la edad y por la dieta alta en grasa y así poder conseguir un envejecimiento saludable con una mejor calidad de vida.

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento biológico o senescencia se define como el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que conducen a una disminución de la capacidad de adaptación de un organismo y finalmente a un declive funcional y la muerte. Éstas provocan un lento deterioro de la función cerebral que conlleva a la disminución de la capacidad cognitiva, pérdida de memoria y trastornos de movimiento (Donmez, 2013).

Es importante diferenciar entre envejecimiento normal y envejecimiento patológico. La reducción en habilidades cognitivas específicas como la velocidad mental, la función ejecutiva y la memoria episódica son experimentados comúnmente en el envejecimiento normal, mientras que las habilidades verbales y el conocimiento del mundo se mantienen (Fjell y col., 2014). Por otra parte, el envejecimiento patológico se produce cuando la aparición de determinados procesos, fundamentalmente la enfermedad, alteran diversos parámetros fisiológicos que impiden o dificultan la correspondiente adaptación. En el organismo envejecido, el cerebro es susceptible tanto a las señales intrínsecas de la célula, como a las señales del entorno sistémico. Los estudios realizados en cerebros envejecidos de ancianos que no fueron diagnosticados de una enfermedad neurológica han mostrado la presencia de placas amiloides, ovillos neurofibrilares, cuerpos de Lewy, pérdida de neuronas y la pérdida de volumen cerebral, entre otros signos. Estas características varían mucho entre individuos y no se sabe qué causa tales lesiones y si son los precursores de la neurodegeneración y la enfermedad o simplemente los productos del envejecimiento cerebral (Wyss-Coray, 2016). El cerebro es un órgano de alto consumo de energía que requiere alrededor del 20% del oxígeno basal del cuerpo para cumplir su

función (Grimm y col., 2016). Por lo tanto, no es extraño que las alteraciones en el metabolismo energético cerebral conduzcan a enfermedades que incluyen alteraciones sutiles en la función neuronal provocando el proceso neurodegenerativo y la muerte celular (Grimm y Eckert, 2017).

López-Otín y colaboradores (2013) han identificado y categorizado las principales características celulares y moleculares del envejecimiento, proponiendo nueve causas que contribuyen y determinan el proceso y fenotipo del envejecimiento (Figura 1). Cada característica debe cumplir los siguientes criterios:

1. Debe manifestarse durante el envejecimiento normal.
2. Su agravamiento experimental debe acelerar el envejecimiento.
3. Su mejora experimental debe retrasar el proceso normal de envejecimiento y por lo tanto, aumentar la esperanza de vida.

Los principales procesos del envejecimiento descritos por López-Otín y colaboradores son: la inestabilidad genómica, el desgaste de los telómeros, las alteraciones epigenéticas, la pérdida de proteostasis, la desregulación de la detección de nutrientes, la disfunción mitocondrial, la senescencia celular, el agotamiento de las células madre y la alteración de la comunicación intercelular.

- Inestabilidad Genómica

La inestabilidad genómica se da por la acumulación de daño genético a través de la vida (Moskalev y col., 2012). La integridad y la estabilidad del DNA se ven alteradas continuamente por agentes físicos, químicos y biológicos exógenos, así como por amenazas endógenas, incluyendo errores de la

replicación del DNA, reacciones hidrolíticas espontáneas y especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) (Hoeijmakers, 2009). Las lesiones genéticas pueden ser derivadas de daños extrínsecos o intrínsecos como mutaciones puntuales, translocaciones, ganancias y pérdidas cromosómicas, acortamiento de telómeros y alteración génica causada por la integración de virus o transposones.

- Desgaste de Telómeros

Los telómeros son particularmente susceptibles al deterioro relacionado con la edad. Las polimerasas de DNA replicativas carecen de la capacidad para replicar completamente los extremos terminales de las moléculas de DNA lineal, una función que es propiamente de una polimerasa de DNA especializada conocida como telomerasa. Sin embargo, la mayoría de las células somáticas de mamíferos no expresan telomerasa, y esto conduce a la pérdida progresiva y acumulativa de secuencias protectoras de telómeros desde los extremos del cromosoma (Blackburn y col., 2006). Debido a que los telómeros no son reparados, el daño es persistente y altamente eficiente en la inducción de senescencia y/o apoptosis (Fumagalli y col., 2012; Hewitt y col., 2012). El acortamiento de los telómeros también se observa durante el envejecimiento normal tanto en humanos como en ratones.

- Alteraciones Epigenéticas

Los cambios epigenéticos implican alteraciones en los patrones de metilación del DNA, modificación postraducciona de las histonas y remodelación de la cromatina. El aumento de la acetilación de la histona H4K16, la trimetilación de H4K20 o la trimetilación de H3K4, así como la disminución de la metilación de H3K9 o la trimetilación de H3K27, constituyen marcas epigenéticas asociadas a la edad (Fraga y Esteller, 2007). Los múltiples sistemas enzimáticos que

aseguran la generación y mantenimiento de patrones epigenéticos incluyen DNA metiltransferasas, histonas, acetilasas, desacetilasas, metilasas y desmetilasas, así como complejos proteicos implicados en la remodelación de la cromatina.

- Pérdida de proteostasis

La proteostasis implica mecanismos para la estabilización de proteínas correctamente plegadas –la más importante, la familia de proteínas de choque térmico– y mecanismos para la degradación de proteínas por el proteosoma o el lisosoma. Además, existen reguladores de la proteotoxicidad relacionada con la edad, que actúan a través de una vía alternativa distinta de las chaperonas y proteasas moleculares (van Ham y col., 2010). Muchos estudios demuestran que la proteostasis se altera con el envejecimiento (Koga y col., 2011). Los dos sistemas principales proteolíticos implicados en el control de calidad de las proteínas son la autofagia-lisosomal y el sistema de ubiquitina-proteosoma. El colapso de estos dos sistemas constituye una característica común de la vejez.

- Desregulación de la detección de nutrientes

Actualmente existen evidencias que afirman que la desregulación de las vías moleculares relacionadas con la absorción de nutrientes, así como las señales anabólicas, aceleran el envejecimiento y la disminución de las vías de señalización de los nutrientes incrementando la longevidad (Fontana y col., 2010). Las vías de señalización de la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) son la vía de control del envejecimiento más conservada en evolución, y entre sus múltiples objetivos están la familia FOXO de factores de transcripción y los complejos mTOR, que también participan en el envejecimiento y se conservan a través de la evolución (Barzilia y col., 2012;

Fontana y col., 2010). Además de las vías antes mencionadas que participan en la detección de la glucosa, hay tres sistemas relacionados e interconectados con la detección de nutrientes: mTOR, para la detección de altas concentraciones de aminoácidos; AMPK, que detecta los estados de baja energía mediante la detección de altos niveles de AMP; y Sirtuinas, que detectan estados de baja energía detectando altos niveles de NAD.

- Disfunción Mitocondrial

A medida que las células y los organismos van envejeciendo, la eficacia de la cadena respiratoria disminuye, aumentando la fuga de electrones y reduciendo la generación de ATP (Green y col., 2011). La disfunción mitocondrial contribuye de manera importante al envejecimiento. El aumento de la generación de radicales libres mitocondriales como mecanismo base del envejecimiento se ha relativizado en los últimos años (Hekimi y col., 2011). Sin embargo, la pérdida de homeostasis redox sigue considerándose una causa de envejecimiento celular.

- Senescencia Celular

La senescencia celular induce a que las células dejen de dividirse cuando han acumulado muchos daños y así prevenir la expansión de los errores (Baker y col., 2011). La senescencia es causada por el acortamiento de telómeros y también por daños no teloméricos al DNA y la depresión del locus INK4/ARF. Estos últimos dos tipos de daños ocurren progresivamente con el envejecimiento cronológico.

- Agotamiento de células madre

Una de las características más obvias del envejecimiento es la disminución del potencial regenerativo de los tejidos. Con la edad disminuye la

hematopoyesis, lo que conlleva a una disminución de la producción de las células inmunitarias adaptativas (inmunosenescencia) y una mayor incidencia de anemia y neoplasias mieloides (Shaw y col., 2010). Los cambios hormonales son también una causa importante de la disminución de las células madre con el envejecimiento en múltiples tejidos. Estudios recientes, sugieren que el rejuvenecimiento de las células madre pueden revertir el fenotipo senescente (Rando y Chang, 2012).

- Alteración de la comunicación Intercelular

Más allá de las alteraciones autónomas de la célula, el envejecimiento también implica cambios en el nivel de la comunicación intercelular, ya sea endocrina, neuroendocrina o neuronal. Errores en la comunicación intercelular dan lugar a alteraciones en las respuestas celulares con exacerbación del estrés oxidativo (EO) y la inflamación; cuando ocurren ambos procesos principalmente de manera crónica o exacerbada producen envejecimiento y además contagian el envejecimiento a otros tejidos del organismo que todavía no estaban envejecidos (Durieux y col., 2011; Lavasani y col., 2012; Tomás-Loba y col., 2008).

Las nueve características del envejecimiento propuestas anteriormente se pueden agrupar en tres categorías: marcas principales, marcadores antagónicos y marcas integradoras. En las marcas principales la característica común es que todos son componentes negativos. Es el caso del daño del DNA, incluyendo aneuploidías cromosómicas, mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA), la pérdida de telómeros, la deriva epigenética y la proteostasis defectuosa. Las marcas antagónicas tienen efectos opuestos dependiendo de su intensidad. A niveles bajos, tienen efectos beneficiosos, pero a niveles altos se vuelven deletéreos. En este grupo se encuentra la

senescencia que protege al organismo del cáncer, pero que en exceso, puede promover el envejecimiento. De la misma manera, ROS media la señalización celular y la supervivencia, pero a niveles crónicos altos pueden producir daño celular. Así mismo la detección óptima de nutrientes y el anabolismo son importantes para la supervivencia pero en exceso y durante el tiempo pueden llegar a ser patológicos. Una tercera categoría comprende las marcas integradoras –el agotamiento de las células madre y la comunicación intercelular alterada– que afectan directamente a la homeostasis y la función de los tejidos (López-Otín y col., 2013).

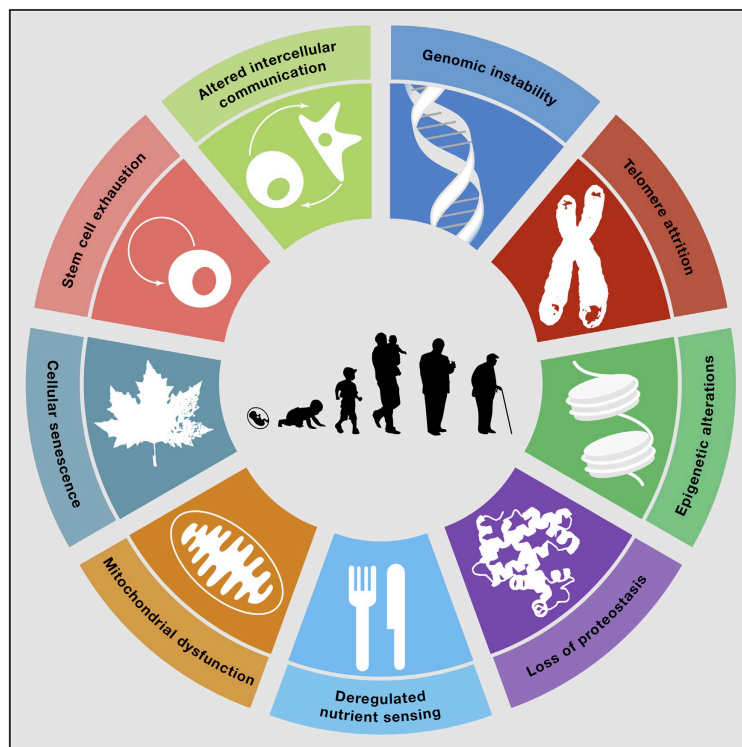


Figura 1. Mecanismos celulares y moleculares del envejecimiento (López-Otín y col., 2013).

1.1 Teorías del envejecimiento

Existen muchas teorías acerca de los mecanismos biológicos del envejecimiento, sin embargo, ninguna de ellas ha podido explicar completamente éste proceso ya que parece ser que no existe un único mecanismo responsable. Por lo general, las teorías del envejecimiento se clasifican en dos grupos:

1. Teorías estocásticas o ambientales: Éstas teorías se fundamentan en la acumulación casual de sucesos nocivos, debido a la exposición de factores externos y, por otra parte, a variables aleatorias que hacen que este fenómeno sea producto del azar (Tabla 1a).
2. Teorías no estocásticas o deterministas: Engloban aquellos mecanismos que describen un número determinado de variables concretas y conocidas. Son innatas y están programadas en el genoma del individuo (Tabla 1b).

Tabla 1a. Teorías estocásticas del envejecimiento.

Teoría del error catastrófico	Con el tiempo aparecen errores en la síntesis de proteínas y DNA provocando proteínas defectuosas. Esto conlleva a un error de la homeostasis celular que provoca la muerte celular y por consiguiente el envejecimiento.	Orgel, 1963
Teoría del entrecruzamiento	La formación de enlaces moleculares entre proteínas o cadenas de ácidos nucleicos se incrementan con la edad. Se produce un aumento significativo de productos finales de glicosilación avanzada (AGE, <i>Advanced Glycation End products</i>) que perturban la función biológica de las proteínas extracelulares por reaccionar con lisinas esenciales.	Brownlee, 1991

Teoría del desgaste	Si las células se dañan en sus partes vitales, conlleva a la muerte de tejidos y órganos y ello conduce a la vejez.	Sheldrake, 1974
Teoría genético-estocástica	<p>Esta teoría incluye tres planteamientos independientes, pero, relacionados. Responsabiliza de los daños provocados al azar en el DNA al entorno celular.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Teoría de la regulación genética:</i> El envejecimiento tendrá una relación directa con el desequilibrio de los factores que permiten el mantenimiento de la fase de reproducción. 2. <i>Teoría de la diferenciación terminal:</i> El envejecimiento celular se debe a una serie de alteraciones en la expresión genética, pero que suponen una diferenciación terminal de las células. 3. <i>Teoría de la inestabilidad del genoma:</i> La inestabilidad del genoma se resalta como causa del envejecimiento, tanto al nivel del DNA como afectando la expresión de los genes sobre RNA y proteínas. 	Pardo Andreu, 2003
Teoría de la mutación somática	El envejecimiento es el resultado de la suma de alteraciones genéticas en el DNA nuclear de las células somáticas.	Sziilard, 1959
Teoría de los radicales libres	El envejecimiento resulta de los efectos perjudiciales fortuitos causados a tejidos por reacciones de radicales libres. Estas reacciones pueden estar implicadas en la producción de los cambios del envejecimiento, asociados con el medio ambiente, enfermedad y con su proceso intrínseco. Los radicales libres reactivos formados dentro de las células pueden oxidar biomoléculas y conducir a muerte celular y daño tisular. Las reacciones perjudiciales de los radicales libres se producen sobre todo en los lípidos, los cuales son los más susceptibles. Está teoría se refinó con la contribución central de la mitocondria, ya que la actividad mitocondrial es un foco de	Harman, 1956

producción de radicales libres (Miquel y col., 1980).

Tabla 1b. Teorías deterministas del envejecimiento.

Teoría del límite Hayflick	El envejecimiento está genéticamente programado. Existe un gen que una vez activado llevaría a todos los cambios que causa el envejecimiento.	Hayflick, 1961
Teoría inmunológica	El genoma nuclear actúa como un "reloj molecular" o un "reloj celular", controlando y programando los cambios que se desarrollan en un organismo desde su concepción, a través de las distintas etapas biológicas hasta el envejecimiento. Surge un deterioro inmunitario como resultado de este proceso, que conduce a la aparición de un mayor número de procesos de auto-inmunidad.	Flodin, 1984
Teoría neuroendocrina	Se dan cambios morfológicos a nivel neuronal lesivos, que provocan cambios de nivel endocrino, que son a su vez causa del envejecimiento.	Gavrilov y Gavrilova, 2006

1.2 Envejecimiento y Neurodegeneración

De acuerdo con las Naciones Unidas en su informe de 2017 sobre el envejecimiento de la población mundial, se prevé que el número de personas de 60 años o más en todo el mundo se duplicará en los próximos 35 años, llegando casi a los 2100 millones de personas. La mayor parte de este crecimiento vendrá de los países en vías de desarrollo. A pesar de estas mejoras en la esperanza de vida, se ha incrementado la incidencia de patologías relacionadas con el envejecimiento como la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Wyss-Coray, 2016).

Como hemos visto, el envejecimiento es un proceso regulado por diferentes mecanismos moleculares y genéticos. Existen tres vías de intervención de longevidad conocidas: Reducción de la señalización de la insulina, aumento de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK, *Adenosine Monophosphate Kinase*) y reducción de la diana de rapamicina (TOR, *Target Of Rapamycin*) y la reducción de las sirtuinas. Las sirtuinas son deacetilasas de histonas tipo III (HDAC) dependientes de NAD^+ y su activación produce efectos neuroprotectores frente a trastornos cerebrales relacionados con la edad. Existen siete homólogos de sirtuina en mamíferos denominados SIRT1-7. El miembro más conservado de la familia es SIRT1 y ha sido ampliamente estudiado en las enfermedades neurodegenerativas (Donmez, 2013).

Como ya se ha mencionado el envejecimiento y la neurodegeneración están estrechamente relacionados. El aumento en el EO, la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria han sido ligadas a un envejecimiento acelerado y a la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Chakrabarti y Mohanakumar, 2016; Petersen y Smith, 2016). Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) son generalmente las moléculas principales que

contribuyen al EO. Los radicales libres más estudiados son el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radicales hidroxilo (OH), peróxido nítrico (ONO_2^-) y óxido nítrico ($NO\bullet$) cuya mayor parte (95-98%) provienen de los subproductos de la cadena de transporte de electrones (ETC, *Electron Transport Chain*) de las mitocondrias. La generación de éstos radicales libres es necesaria, ya que son esenciales para la defensa del huésped, las células fagocíticas usan ROS para digerir los patógenos invasores y los desechos (Petersen y Smith, 2016). El EO es el estado redox resultante de un desequilibrio entre la generación y desintoxicación de ROS. La sobreproducción de ROS por las mitocondrias disfuncionales, además del desbalance de la fusión/fisión mitocondrial y las mutaciones en el mtDNA pueden causar daño oxidativo en las células produciendo alteraciones en sus funciones bioquímicas y fisiológicas y alterar los perfiles de la expresión genética llevando a las células a la apoptosis y por lo tanto a patologías neurodegenerativas (Hroudová y col., 2014; Grimm y col., 2016; Fivenson y col., 2017). Por lo general, cada célula tiene mecanismos de defensa para contrarrestar la aparición del EO. Estas defensas antioxidantes son enzimas endógenas que incluyen la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), catalasas (CATs), y peroxirredoxinas (PRXs). Con el avance de la edad hay una disminución progresiva natural de la capacidad anti-oxidante endógena, causando trastornos en el equilibrio entre los diferentes mecanismos antioxidantes y la producción de RONS, resultando en un aumento de EO. Eventualmente esto causa daño celular que no puede ser reparado por mecanismos internos, lo que finalmente culmina en la disfunción del sistema (Petersen y Smith, 2016).

La acumulación de daño de los radicales libres a lo largo del tiempo conduce a una mayor inflamación dentro del cerebro. Por lo tanto, el estrés también

puede interrumpir el balance homeostático entre citocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias e inducir neurodegeneración. Las citocinas son proteínas de señalización secretadas por la célula en respuesta a condiciones intra-neuronales y extra-neuronales predominantes. Han surgido recientemente unos nuevos protagonistas en la modulación de la inflamación, los microRNAs (miRNAs) (Fenn y col., 2015). Diferentes estudios de microarrays indican que hay un aumento general en los genes inflamatorios y pro-oxidantes en el cerebro de roedores más viejos en comparación con los adultos. Los miRNAs son cadenas cortas (19-22 nts) no codificantes de RNA que pueden inhibir la traducción de mRNAs. Algunos de los miRNAs implicados en la regulación de la inflamación del Sistema Nervioso Central (SNC) son el miR-124 y el miR-29. miR-124 se expresa en niveles más altos en el cerebro que en la periferia y algunos estudios sugieren que este miRNA está reducido en cerebros envejecidos, aunque ésta reducción solo se ha visto en una pequeña subpoblación de células de la microglia (Lagos-Quintana y col., 2002; Inukai y col., 2012). miR-29 se ha encontrado en altos niveles dentro de la glía en el SNC. Uno de los cambios más importantes en el cerebro de personas con Alzheimer es la regulación positiva de la expresión génica de la beta-secretasa BACE1 (Hebert y col., 2008). Se encontró que miR-29 inhibe fuertemente la expresión de BACE1 in vitro y su expresión génica marcadamente disminuida en pacientes con Alzheimer esporádico. Sorprendentemente, se encontró lo opuesto para el envejecimiento normal no patológico (Fenn y col., 2015).

Otro proceso que está surgiendo como un regulador central del envejecimiento del SNC es la autofagia, ya que desempeña un papel crucial como punto de control para las proteínas y orgánulos que deben ser eliminados de las células. Muchas de las alteraciones antes mencionadas como la alteración de la detección de nutrientes, daño en las mitocondrias,

senescencia celular y agotamiento en las células madre, entre otras, están relacionados con cambios en la autofagia basal y/o el deterioro de la correcta inducción del flujo de la autofagia durante el estrés celular (Ma y col., 2011; Plaza-Zabala y col., 2017). Específicamente se ha observado en cerebros envejecidos de roedores un incremento en la actividad mTORC1 junto con el declive de los niveles de la proteína ATG sugiriendo una disminución en la función autofágica (Plaza-Zabala y col., 2017). Cada vez aparecen más evidencias que demuestran la existencia de alteraciones en los procesos de autofagia en muchas enfermedades neurodegenerativas.

Como ya se ha mencionado, recientemente se han definido varios procesos interconectados con las características del envejecimiento, en el que se propone alteraciones sustanciales de la proteostasis celular como uno de los pilares del envejecimiento (López-Otín y col., 2013; Keneddy y col., 2014). Se sabe que, para mantener la integridad del organismo, la célula debe controlar la cantidad y calidad de las proteínas. El Retículo Endoplasmático (RE) es el orgánulo en donde se sintetizan todas las proteínas transmembranales y la mayoría de las proteínas secretadas, además se produce la biosíntesis de lípidos y el almacenamiento de calcio. Cuando se altera la homeostasis del RE se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en su lumen. Como respuesta a este estrés se activan un conjunto de vías de señalización RE-núcleo denominadas respuesta a proteínas desplegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*), en la que se bloquea la expresión general, aumenta la expresión de chaperonas y se activan las vías proteolíticas del proteasoma y macroautofagia, con el objetivo de devolver al RE su estado de funcionamiento normal (Brown y Naidoo, 2012). El estrés del RE puede ser provocado por una variedad de condiciones fisiológicas, incluyendo perturbaciones en la homeostasis de calcio, privación de glucosa/energía,

cambios redox, isquemia y mutaciones que perjudican el plegamiento de las proteínas (Kaufman, 2002). Para limitar la acumulación de proteínas desplegadas la célula utiliza la UPR que desencadena tres clases de respuestas celulares protectoras: i) regulación positiva de las chaperonas del RE como BIP/GRP78, para ayudar en el replegamiento de las proteínas; ii) atenuación de la traducción de proteínas que está mediada por la cinasa serina-treonina PERK que fosforila el factor de iniciación eIF2 α en la serina 51 causando la disminución de la síntesis proteica en general y la promoción de la supervivencia celular en el estrés del RE; y iii) degradación de las proteínas plegadas erróneamente por el proteasoma mediante un proceso denominado degradación asociada al RE (ERAD, *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*). La activación de PERK también incrementa la respuesta antioxidante a través del factor 2 relacionado con NF-E2 (NRF2) (Johnson y col., 2008; Brown y Naidoo, 2010; Martínez y col., 2017). PERK fosforila NRF2 en treonina-80 para activarlo e inducir a los genes de elemento de respuesta antioxidante (ARE, *Antioxidant Response Element*) que aumentan el nivel de glutatión (GSH), reduce ROS en el RE y promueve la supervivencia (Cullinan y col., 2004; Ma y col., 2011; Ma, 2013) (Figura 2).

Además de coordinar la expresión de los genes de respuesta al estrés durante el estrés del RE, la UPR inicia rutas inflamatorias esenciales para la respuesta inmune innata. Las principales proteínas de señalización inflamatoria activadas durante la UPR son el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y las proteínas de la familia de la proteína cinasa activada por mitogenos (MAPK), proteína cinasa c-Jun N terminal (JNK) y p38 (Tang y col., 2001; Sprenkle y col., 2017).

Estudios recientes han propuesto que la activación de la UPR es una característica común en las enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha observado la activación canónica de la UPR en las neuronas de pacientes con la EA (Hoozemans y col., 2005; Yoon y col., 2012) y en modelos de ratón EA (Ma y col., 2011). El despliegue de las proteínas puede considerarse como el evento inicial que respalda las enfermedades neurodegenerativas (Selkoe, 2002; Haass y Selkoe, 2007; Uversky, 2007; Makioka y col., 2010; Lindquist y Kelly, 2011; Martin y col., 2011; Roussel y col., 2013; Hetz y Mollereau, 2014; Valastyan y Lindquist, 2014). Las neuronas son particularmente sensibles al plegamiento erróneo de las proteínas, ya que las células neuronales post-mitóticas no divididas son completamente dependientes de la UPR para la supervivencia (Remondelli y Renna, 2017). Se ha encontrado que la disfunción crónica del RE está altamente asociada con la memoria y las manifestaciones cognitivas comúnmente observadas en diferentes modelos experimentales de EA (Duran-Aniotz y col., 2017; Lourenco y col., 2013; Sprenkle y col., 2017). También se ha encontrado que la proteína BiP/GRP78 está incrementada en el hipocampo y corteza temporal de la EA, además varios estudios de diferentes grupos han demostrado una mayor presencia de p-PERK , p-IRE1 y p-eIF2 α en las neuronas de personas con la EA (Chang y col., 2002; Hamos y col., 1991; Hoozemans y col., 2009; Hoozeman y col., 2005; Stutzbach y col., 2013; Unterberger y col., 2006). Estos marcadores aparecen en neuronas morfológicamente sanas o en neuronas con una proteína tau anormalmente fosforilada, pero están casi ausentes en las neuronas que contienen los ovillos neurofibrilares (NFTs, *Neurofibrillary Tangles*). En general, los niveles de BiP/GRP78 y la aparición de p-PERK en neuronas con la EA se correlaciona muy bien con la presencia anormal de tau fosforilada y las etapas Braak de los NFTs (Hoozemans y col., 2009). Estas observaciones indican que la UPR está

involucrada en las primeras etapas de la patología de la EA (Scheper y Hoozemans, 2015).

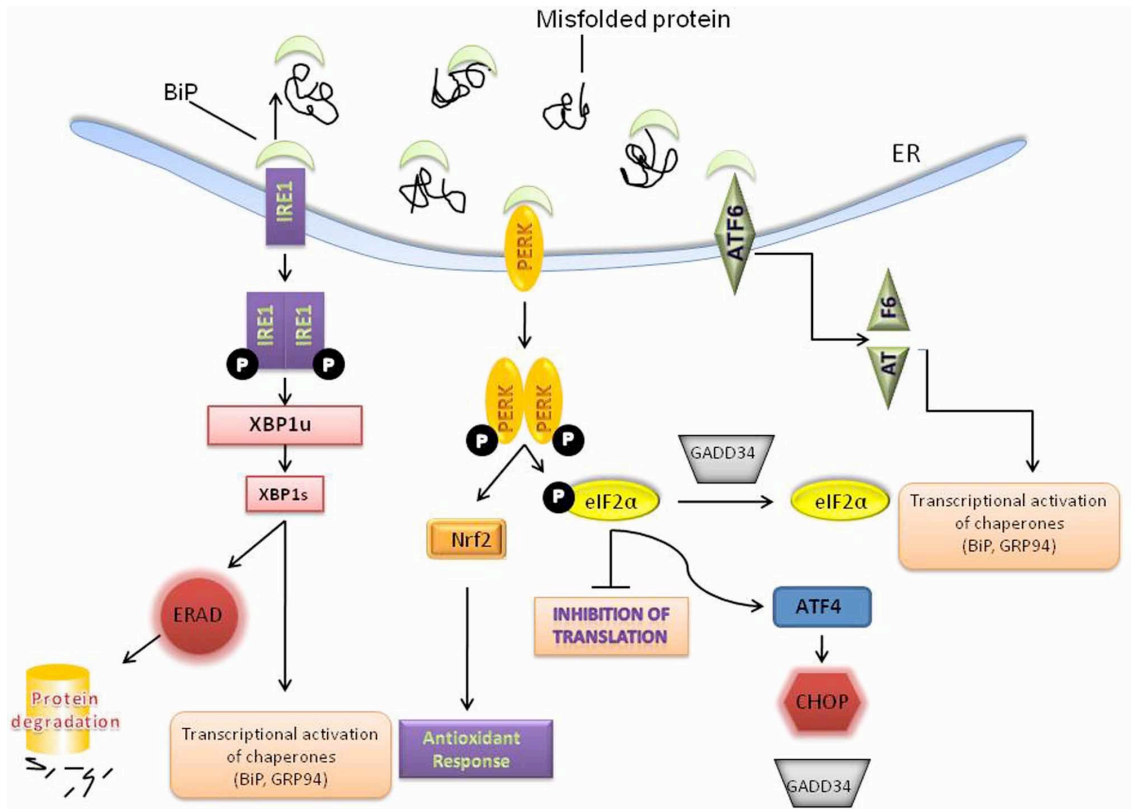


Figura 2. Activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) en el RE (Brown y Naidoo, 2012).

2. DETERIORO COGNITIVO EN EL ENVEJECIMIENTO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

2.1 Demencia

La demencia es un término general para definir una disminución de la capacidad mental u otras habilidades de pensamiento lo suficientemente severa como para interferir en la vida cotidiana. La demencia no es una enfermedad específica, debido a que incluye una amplia gama de síntomas asociados con una disminución en la memoria. Esta disminución ocurre por el daño que sufren las neuronas en diferentes partes del cerebro que están involucradas en la función cognitiva (Alzheimer & Dementia, 2016; www.alz.org).

Los síntomas de la demencia pueden variar mucho, al menos dos de las siguientes funciones mentales centrales deben ser alteradas de manera significativa para que se las considere demencia:

- Memoria
- Comunicación e idioma
- Capacidad de concentrarse, enfocarse y prestar atención
- Razonamiento y juicio
- Percepción visual

La mayoría de los cambios en el cerebro que causan demencia son permanentes y empeoran con el tiempo; sin embargo, los problemas de memoria causados por afecciones como la depresión, efectos secundarios de los medicamentos, uso excesivo de alcohol, problemas tiroideos y deficiencias vitamínicas pueden mejorar si son tratados.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia en las personas de edad avanzada. Aproximadamente afecta a un 7% de las personas mayores de 65 años de edad, y quizá al 40% de los que pasan los 80 años. La segunda causa más frecuente de demencia en los ancianos es la enfermedad cerebrovascular, sola o en combinación con la EA. Otras causas de demencia entre las más importantes son la demencia con cuerpos de Lewy, la enfermedad de Parkinson (EP) y la demencia fronto-temporal con parkinsonismo. En la Tabla 2 se describen las características asociadas para cada una de las causas más importantes de la demencia.

Tabla 2. Causas de demencia y características asociadas (Alzheimer's & Dementia, 2016).

Causa	Características
Enfermedad de Alzheimer (EA)	<p>La EA es la causa más común de la demencia; representa un 60-80% de los casos. La mitad de estos casos involucran únicamente EA, los restantes tienen cambios patológicos relacionados con otras demencias (demencia mixta).</p> <p>Síntomas clínicos tempranos de la enfermedad son la dificultad para recordar conversaciones recientes, nombres o eventos. Los síntomas posteriores incluyen comunicación alterada, desorientación, confusión, mal juicio, cambios de comportamiento y en última instancia dificultad para hablar, tragar y caminar.</p> <p>Las principales patologías de la EA son la acumulación progresiva del fragmento de proteína beta-amiloide (placas) fuera de las neuronas en el cerebro y las hebras torcidas de la proteína tau (enredos) dentro de las neuronas. Estos cambios son acompañados eventualmente por el daño y la muerte de las neuronas.</p>
Demencia Cerebrovascular	<p>Anteriormente conocida como demencia de múltiples infartos o post-accidente cerebrovascular, este tipo de demencia es menos común que la EA, representa solo el 10% de los casos de demencia. El síntoma inicial es el juicio deteriorado o la capacidad deteriorada para tomar</p>

decisiones, planificar u organizar, en contraposición a la pérdida de memoria asociada con los síntomas iniciales del Alzheimer. Además de los cambios en la cognición, las personas con demencia vascular pueden tener dificultades con la función motora, especialmente la marcha lenta y el equilibrio deficiente.

La demencia vascular se produce más comúnmente por el bloqueo de los vasos sanguíneos o daños que conducen a infartos (derrames cerebrales) o sangrado en el cerebro. La ubicación, el número y el tamaño de las lesiones cerebrales determinan si la demencia resultará y cómo el pensamiento y el funcionamiento físico del individuo se verán afectados.

Demencia
con Cuerpos de Lewy
(DCL)

Las personas con DCL tienen algunos de los síntomas comunes en el Alzheimer, pero son más propensos a tener síntomas iniciales o tempranos de trastornos del sueño, alucinaciones visuales bien formadas y lentitud, desequilibrio de la marcha u otras características del movimiento parkinsoniano. Estas características, así como el deterioro visuo-espacial temprano, pueden ocurrir en ausencia de deterioro significativo de la memoria.

Los cuerpos de Lewy son agregaciones anormales (o grupos) de la proteína alfa-sinucleína en las neuronas. La demencia resulta cuando estos cuerpos de Lewy se desarrollan en la corteza. La alfa-sinucleína también se agrega en cerebros de las personas con la EP, en la que se acompaña de una pérdida neuronal grave en la sustancia nigra. Mientras que las personas con DCL y EP tienen cuerpos de Lewy, el inicio de la enfermedad está marcado por el deterioro motor en la EP y el deterioro cognitivo en DCL.

Los cambios cerebrales de DCL solo pueden causar demencia pero muchas veces tiene coexistencia con EA. La demencia vascular también puede coexistir y contribuir a que el individuo presente la demencia mixta.

Demencia Mixta

La demencia mixta es caracterizada por las anomalías de más de una causa de demencia –más comúnmente Alzheimer combinado con demencia

vascular, seguido de Alzheimer con DCL y finalmente Alzheimer con demencia vascular y DCL, la demencia vascular con DCL es mucho menos común- .

Estudios recientes sugieren que la demencia mixta es más común de lo que se había reconocido y también muestran que la probabilidad de tener demencia mixta aumenta con la edad y es mas alta en las personas mayores de 85 años o más.

Degeneración Lobar Frontotemporal (DLFT)

Incluye demencias tales como DLFT de variante conductual, afasia progresiva primaria, enfermedad de Pick, degeneración corticobasal y parálisis supranuclear progresiva.

Los síntomas tempranos típicos incluyen cambios marcados en personalidad y comportamiento y/o dificultad con la producción o la comprensión del lenguaje. A diferencia de la EA, la memoria se suele ahorrar en las primeras etapas de la enfermedad. Las células nerviosas del lóbulo frontal y las regiones de lóbulos temporales del cerebro están especialmente afectadas y se atrofian notablemente. Además, las capas superiores de la corteza típicamente se vuelven blandas y esponjosas y tienen inclusiones de proteínas (usualmente proteína tau o la proteína transactiva de unión al DNA).

Los cambios cerebrales de DLFT pueden ocurrir en mayores de 65 años, similar a la EA, pero la mayoría desarrolla síntomas a una edad mas temprana. Alrededor del 60% de las personas con este tipo de demencia tiene entre 45 y 60 años. La DLFT representa alrededor del 10% de los casos de demencia.

Demencia Enfermedad de Parkinson (EP)

Los síntomas comunes de la EP son los problemas con el movimiento (lentitud, rigidez, temblor y cambios en la marcha). En la EP los agregados de alfa-sinucleína aparecen en la sustancia nigra. Se cree que los agregados causan la degeneración de las células nerviosas que producen dopamina.

La incidencia de la EP es una decima parte de la EA. A medida que la EP progresa, a menudo resulta en demencia secundaria a la acumulación de cuerpos de Lewy en la corteza (similar a DCL) o a la acumulación de grupos beta-amiloides y enredos tau (similar a la EA).

2.2. Enfermedad de Alzheimer

Como se ha mencionado la EA es una de las enfermedades neurodegenerativas más comunes y representa más del 80% de los casos de demencia en todo el mundo en personas de edad avanzada. Conduce a la pérdida progresiva del declive mental, conductual, funcional y de la capacidad de aprender (Anand y col., 2014).

En 1907, Alois Alzheimer describió el primer caso del tipo de demencia que actualmente lleva su nombre. Una mujer de 51 años había desarrollado pérdida de la memoria y deterioro progresivo de su capacidad cognitiva. La autopsia desveló las lesiones anatomopatológicas, NTFs y placas amiloides en la neocorteza y el hipocampo.

Se han propuesto varias hipótesis sobre la base de los diversos factores causales para explicar este trastorno multifactorial (Mohandas y col., 2009), como la hipótesis colinérgica, la hipótesis β -amiloide ($A\beta$), la hipótesis tau y la hipótesis de la inflamación (Mohandas y col., 2009; Francis y col., 1999; Maccioni y col., 2010; Selkoe y Hardy, 2016; Harrison y Owen, 2016). La hipótesis más aceptada comúnmente es la de $A\beta$, prevaleciendo en las últimas dos décadas.

2.2.1 Hipótesis cascada amiloide

La hipótesis amiloide establece que las placas amiloides formadas por agregados de péptido $A\beta$ generados por las escisiones proteolíticas de APP son centrales para la patología de la EA (Hardy y Selkoe, 2002). La APP se escinde en todo el complejo de Golgi mediante O-glicosilación. La principal vía de procesamiento de la APP es la **vía no amiloidogénica**, la escisión necesaria por la α -secretasa que ocurre entre Lys 16 y Leu 17 dentro del

dominio A β que impide la formación de péptidos A β (Figura 3). Durante esta escisión se libera un ectodominio soluble de APP (sAPP α) y queda un fragmento C-terminal de 10 kDa (p3CT) dentro de la membrana (Hemming y Selkoe 2005; Zhang y col., 2002). El péptido soluble derivado de la APP, sAPP α puede tener funciones neuroprotectoras. Al menos el 30% de APP es procesado por esta vía (Mattson, 2004; Pákási y Kálmán, 2008).

La generación de A β a partir de APP se produce por medio de un proceso proteolítico de dos etapas que implica las β - y γ -secretasas. La enzima de escisión de APP de β -sitio (BACE1), primero escinde APP para generar un fragmento C-terminal soluble unido a membrana. Una posterior división del fragmento C-terminal por la actividad γ -secretasa genera además A β_{40} y A β_{42} (Hemming y Selkoe, 2005). Ambos tipos de péptidos se pueden encontrar en placas amiloides, pero A β_{42} es más neurotóxico y tiene una mayor propensión a agregarse (Zhang y col., 2002). Esta vía por la que se escinde APP se denomina vía amiloidogénica (Figura 3). A β_{42} puede formar monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas. Las especies monoméricas no son patológicas, sin embargo las especies oligoméricas y protofibrilares pueden facilitar la hiperfosforilación de tau, la disrupción del proteosoma, la disfunción de las mitocondrias, la desregulación de la homeostasis del calcio, el fallo sináptico y la disfunción cognitiva (Mattson, 2004; Pákási y Kálmán 2008; Mohandas y col., 2009).

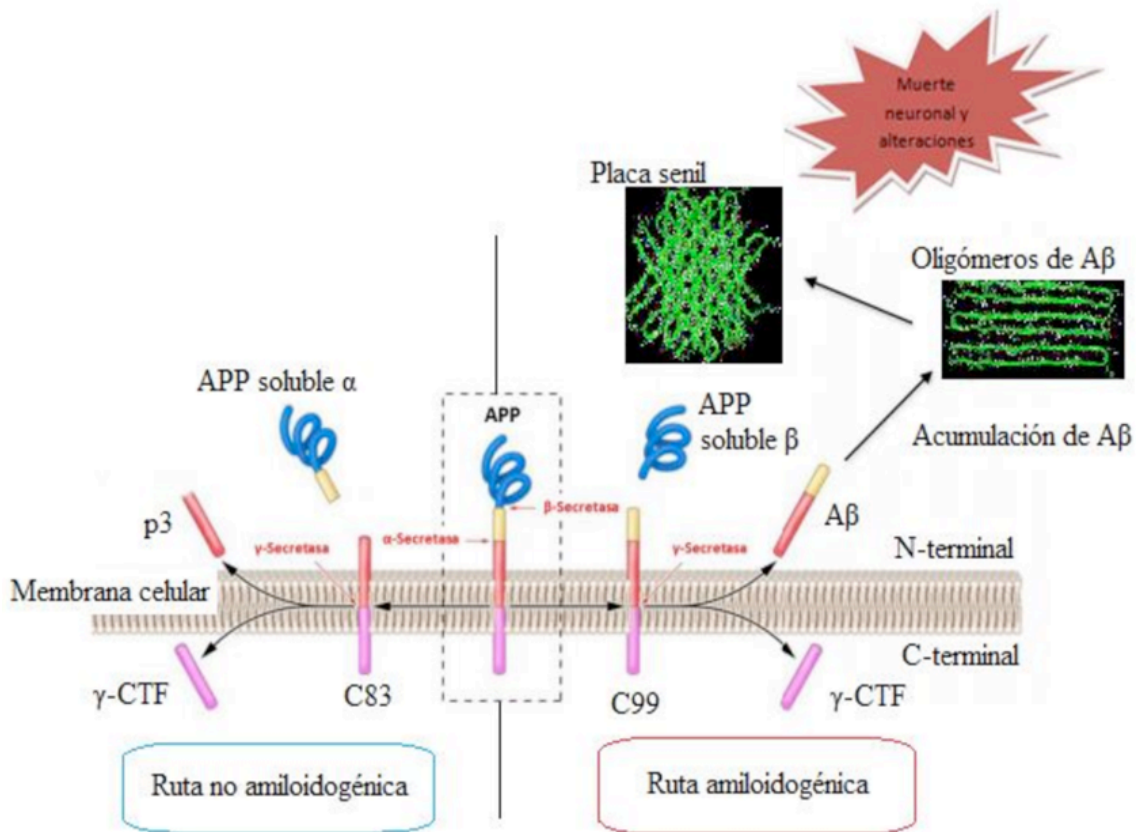


Figura 3. Procesamiento del Aβ por vía no amiloidogénica y amiloidogénica (Modificado de Gandy, 2005).

2.2.2 Hipótesis Tau

La proteína tau se expresa predominantemente en el citosol de células nerviosas. La función de tau es la estabilización de los microtúbulos y la regulación del transporte axonal (Götz y col., 2006), promoviendo la polimerización y estabilización de los microtubulos (Drubin y Kirschner, 1986). Tau se encuentra localizada mayoritariamente en el axón pero en condiciones fisiológicas también se puede encontrar en dendritas, aunque los niveles son mucho mas bajos (Ittner y Götz, 2011). Aunque es importante en los procesos de neurogénesis, mantenimiento y transporte axonal no es esencial para el desarrollo debido a la redundancia funcional y a la presencia de otras proteínas asociadas a microtúbulos.

Tau tiene hasta 84 posibles sitios de fosforilación, de los cuales 45 son serinas, 35 treoninas y 4 tirosinas. Se encuentra más fosforilada durante el desarrollo que en las neuronas maduras (Brion y col., 1993).

Los sitios de fosforilación de tau se han dividido en dos grupos:

- Los que se modifican por cinasas dirigidas por prolina, aquí se encuentran la cinasa glucógeno sintasa 3 (GSK3) (Ishiguro y col., 1992), la cinasa dependiente de ciclina 5 (CDK-5) (Hosoi y col., 1995), o la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK(p38)), entre otras (Figura 4).
- Los que pueden ser modificados por cinasas no dirigidas por prolina como la proteína cinasa A (PKA) (Sironi y col., 1998), la proteína cinasa C (PKC) (Correas y col., 1992), la cinasa de la Calmodulina II (CaMKII) (Sironi y col., 1998), la cinasa reguladora de afinidad entre MAPs/microtúbulos (MARK) (Drewes y col., 1997) o la caseína cinasa II (CKII) (Correas y col., 1992) (Figura 4).

Las seis isoformas de tau están presentes en un estado hiperfosforilado en filamentos helicoidales apareados en la EA. Las mutaciones que alteran la función y la expresión de las isoformas de tau conducen a la hiperfosforilación. La tau hiperfosforilada desmonta los microtúbulos y son secuestradores de la tau normal, MAP1 (proteína asociada a los microtúbulos 1), MAP2 y ubiquitina en enredos de filamentos helicoidales emparejados. Esta estructura insoluble daña las funciones citoplasmáticas e interfiere con el transporte axonal, que puede conducir a la muerte celular (Mudher y Lovestone, 2002). Por consiguiente, una característica importante de la EA es la fosforilación de tau

anormal para formar los ovillos intraneurales. El A β también parece actuar sobre la fosforilación de tau y, de hecho, se ha encontrado en neuronas cultivadas una actividad aumentada de GSK-3 β después del tratamiento con A β (Takashima y col., 1998). También se ha observado GSK-3 β activa en cerebros con la EA con cambios neurofibrilares y aumento de la hiperfosforilación de tau (Pei y col., 1999). Además, ratones transgénicos de GSK-3 β muestran deficiencias de neurodegeneración y aprendizaje espacial (Lucas y col., 2001; Hernández y col., 2002).

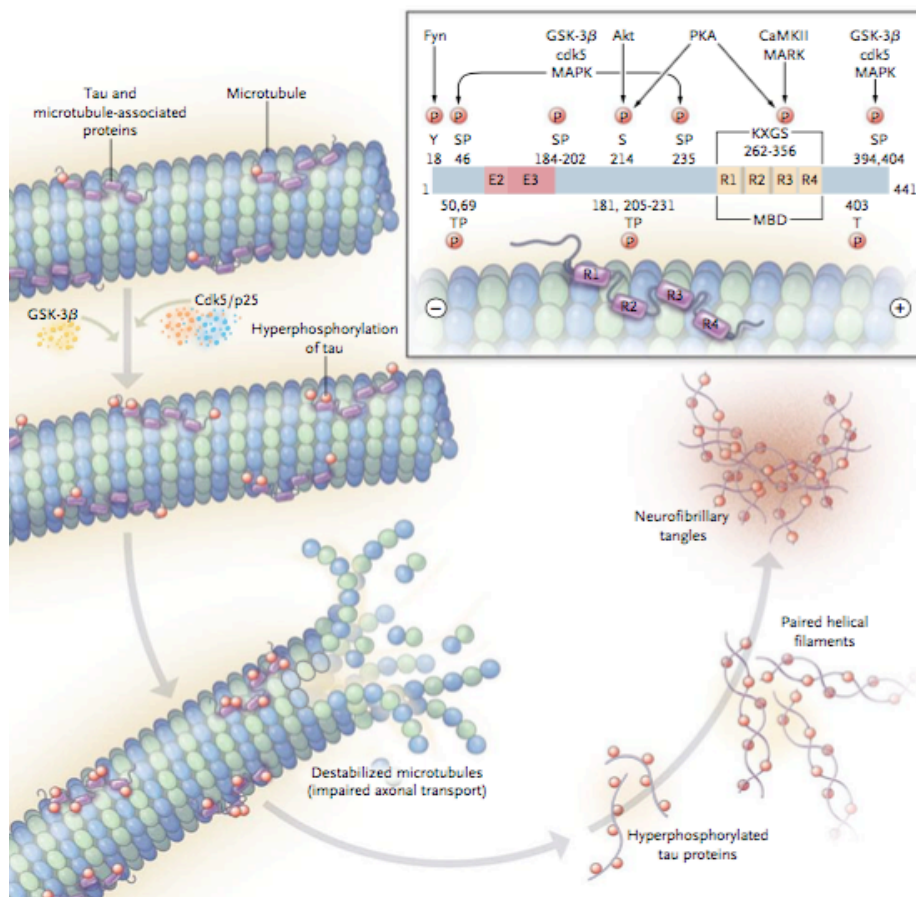


Figura 4. Sitios de fosforilación de la proteína tau por las principales cinasas dirigidas y no dirigidas por prolina (Querfurth y LaFerla, 2010).

2.2.2.1 Regulación de la actividad GSK3 a través de la vía de Wnt

La vía de señalización de Wnt juega un papel crítico en varios procesos celulares incluyendo la diferenciación celular, la migración y la actividad sináptica (Nusse y Varmus, 2012; Oliva y col., 2013). La señalización de Wnt está relacionada con varias enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la demencia, la EA y la EP (Inestrosa y col., 2012; Marinou y col., 2012; Anastas y Moon, 2013; Inestrosa y Arenas, 2010). La vía puede ser activada por 19 ligandos (Toledo y col., 2008) y pueden dividirse principalmente en dos tipos: La vía de señalización canónica o dependiente de β -catenina (Wnt/ β -catenina) y las vías de señalización no canónicas (Wnt/PCP y Wnt/ Ca^{2+}) (Logan y Nuse, 2004; Gordon y Nusse, 2006). La vía canónica Wnt/ β -catenina tiene un papel importante en la neuroprotección (Mo y Cui, 2012; Arrázola y col., 2015). Ésta ruta canónica comienza con la unión de un ligando de Wnt a su receptor Frizzled (Fz) y la oligomerización de sus co-receptores de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína (LRP5/6). El complejo Wnt-LRP-Fz activa la proteína Dishevelled (Dvl) que causa el cambio de conformación del complejo de proteínas que están regulando la actividad de GSK-3 β , inhibiendo su actividad cinasa. Al inhibir la GSK no se produce la fosforilación de β -catenina, previniéndose su degradación. Así, la β -catenina puede translocarse al núcleo para interactuar con el factor de transcripción específico de células T (TCF) y el factor de unión a potenciador linfóide (LEF) que regulan la expresión de genes diana de Wnt (Figura 5) (Clevers y Nusse, 2012; Nusse y Varmus, 2012; Bayod y col., 2014). En la vía Wnt/PCP, el ligando Wnt se une a su receptor Fz y conduce a la activación de Dvl que provoca la activación de algunas pequeñas GTPasas como Rho y Rac, que posteriormente activan la cinasa Jun N-terminal (JNK) relacionada con la reorganización y mantenimiento del citoesqueleto (Rosso y col., 2005; Rosso e Inestrosa, 2013).

En la vía Wnt/Ca²⁺ la unión del ligando a los receptores Fz permite que proteínas G activen la fosfolipasa (PLC), lo que aumenta la producción de diacil-glicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), generando un aumento intracelular de Ca²⁺ que activa las proteínas dependientes de Ca²⁺ y el factor de transcripción NF-AT para promover la transcripción de genes diana (Inestrosa y col., 2012; Oliva y col., 2013).

Desde hace más de una década se ha evidenciado una fuerte relación entre la EA y el deterioro de la vía de señalización Wnt (De Ferrari e Inestrosa, 2000; Inestrosa y col., 2000, 2002; Garrido y col., 2002; De Ferrari y col., 2007) (Figura 5). Diferentes componentes de la vía se alteran, tales como β-catenina que se reduce en cerebros de pacientes con Alzheimer que llevan mutaciones heredadas de presenilina-1 (PS-1) (Zhang y col., 1998) y DKK1 que está incrementado en cerebros con Alzheimer o también en ratones transgénicos que se usan de modelo para la EA (Caricasole y col., 2004; Rosi y col., 2010).

2.3 Neuroinflamación en el envejecimiento y la EA

La neuroinflamación es una respuesta fisiológica del cerebro a una lesión, infección o enfermedad con el fin de prevenir un daño potencial, la destrucción neuronal o eliminar un agente dañino. Varias citocinas son liberadas por células de la glía, microglia, astrocitos (SNC), linfocitos, monocitos y macrófagos durante la respuesta inflamatoria. El estrés puede incrementar los niveles de citocinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina (IL)-1β, e IL-6 y reducir la expresión de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-4 y el factor de crecimiento de transformación beta (TGF-β) perjudicando la neurogénesis, promoviendo la muerte celular y causando neurodegeneración (Fajemiroye y col., 2017). La microglia es un factor clave en el aumento del estado inflamatorio del SNC, ya

que se ha observado su hiperactividad con la edad y la reducción de las vías reguladoras. Por lo tanto, es importante mantener el control de la activación microglial. Las neuronas producen varios factores inmunoreguladores que interactúan con la microglia, como CD200, ligando fractalkine (CX3CL1), neurotransmisores y neurotrofinas, entre otros.

La microglia, los astrocitos y posiblemente en un menor grado las neuronas están implicados en el proceso inflamatorio en la EA. Los depósitos A β pueden activar la microglia que conduce a un aumento de la expresión de la superficie celular del complejo de histocompatibilidad principal II (MHC II) junto con una mayor secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como la IL-8, macrófagos inflamatorios de la proteína-1 α (MIP-1 α) y monocitos quimio-atrayentes de la proteína-1 (Moore y O'Banion, 2002). A β también induce una respuesta fagocítica en microglia y la expresión de óxido nítrico sintasa (NOS), resultando en daños neuronales (Ballotore y col., 2007). La microglia también puede desempeñar un papel en la degradación de A β por la liberación de la enzima degradante de la insulina (IDE).

Los astrocitos también se agrupan alrededor de depósitos de A β y secretan interleucinas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulación e inhibidores de proteasa. Sin embargo, sigue siendo una incógnita si la inflamación es causa o efecto del proceso neurodegenerativo, aún así la asociación entre neuroinflamación y la neurodegeneración ha sido descrito por un gran número de estudios neuropatológicos y neuropsiquiátricos (Najjar y col., 2013).

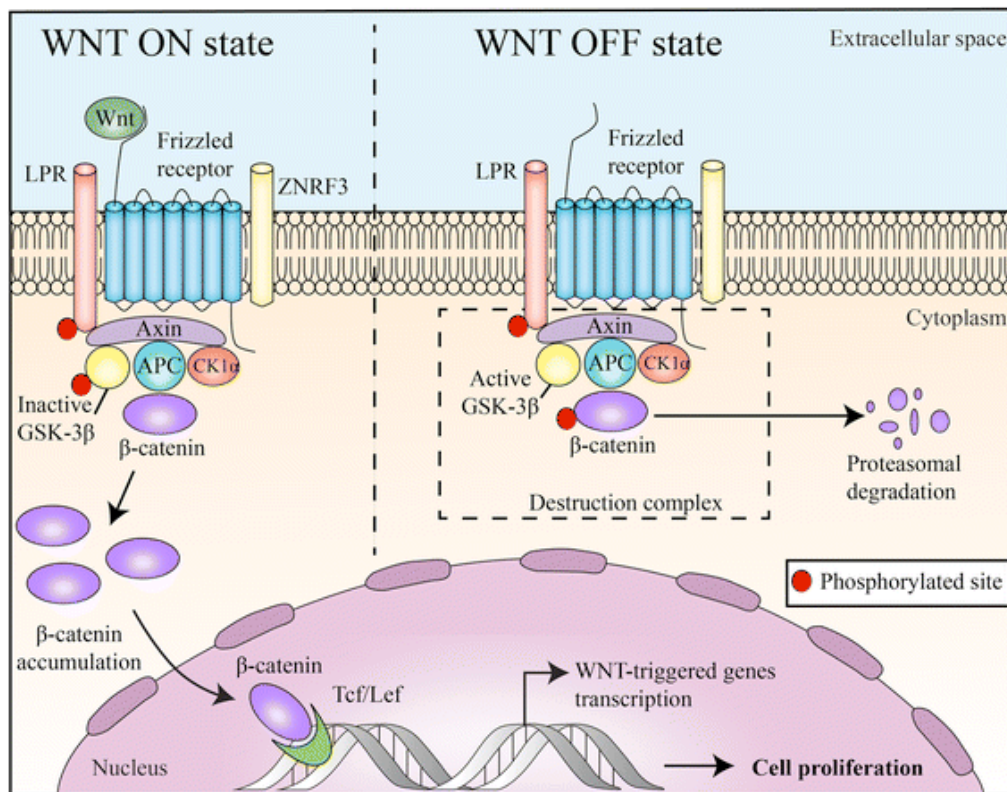


Figura 5. Vía canónica Wnt / β -catenina (Pai y col., 2017).

2.4 Disfunción Mitocondrial: implicación en el envejecimiento y la EA

El cerebro es un órgano que consume mucha energía y requiere aproximadamente el 20% del oxígeno basal del cuerpo para cumplir su función, representando tan solo el 2% de la masa corporal. Las neuronas son células post-mitóticas y excitables y tienen requerimientos energéticos realmente altos para realizar las siguientes funciones: i) mantener su potencial de membrana permitiendo la propagación de señales eléctricas; ii) restablecer el equilibrio iónico después del disparo del potencial de acción; iii) desencadenar la liberación de neurotransmisores por fusión de vesículas a la membrana plasmática; iv) permitir la recaptura de los neurotransmisores de la hendidura sináptica. La fuente de energía más relevante en el cerebro es la

oxidación de la glucosa. En consecuencia, las neuronas dependen casi exclusivamente del sistema mitocondrial OXPHOS para satisfacer sus necesidades de energía suministradas bajo la forma de ATP. Las neuronas al ser células post-mitóticas no se remplazan (o rara vez) durante la vida, esto las hace más sensibles a la acumulación de daños oxidativos en comparación con las células en división y son más propensas a acumular mitocondrias defectuosas durante el envejecimiento (Terman y col., 2010; Grimm y Eckert, 2017).

La distribución mitocondrial adecuada en las neuronas es primordial para mantener el requerimiento de energía en ubicaciones específicas dentro de los diferentes compartimentos neuronales. Varios estudios sugieren que las mitocondrias ubicadas en las terminales nerviosas son más sensibles a la disfunción relacionada con la edad y al daño oxidativo en comparación con las mitocondrias no sinápticas (Grimm y Eckert, 2017).

Por otro lado, el cerebro es rico en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) (Bazinet y Layè, 2014), los cuales presentan propiedades de neuroprotección y se encuentran entre los objetivos más vulnerables al daño por radicales libres, éste daño es conocido como peroxidación lipídica (Montini y Morrow, 2005).

Las mitocondrias disfuncionales liberan radicales libres oxidantes, causando un considerable EO en el envejecimiento y en la EA. Los depósitos A β son dañinos para las mitocondrias, especialmente aquellas que se encuentran en la sinapsis. La exposición de mitocondrias aisladas a A β inhibe las enzimas mitocondriales, y este hecho se produce también en modelos de EA. Si la citocromo c oxidasa es atacada, el transporte de electrones, la producción de ATP, el consumo de oxígeno y el potencial de la membrana mitocondrial se

deterioran. El aumento de la formación de los radicales O_2^- mitocondrial y la conversión en H_2O_2 causan EO, liberación de citocromo c y apoptosis. Se ha encontrado que en pacientes con la EA y en cerebros transgénicos de ratón hay una acumulación de $A\beta$ dentro de las mitocondrias, siendo uno de los objetivos la alcohol deshidrogenasa. Esta inestabilidad y la falta de reparación del genoma mitocondrial del cerebro permite la acumulación gradual de mutaciones del mtDNA. En la figura 6 se representa como un péptido $A\beta$ genera la producción de RONS. Su ataque peroxidativo sobre los lípidos de la membrana de las células y los orgánulos produce las toxinas mitocondriales 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4-HNE) y malondialdehído. El daño oxidativo a las ATPasas iones-específicas unidas a membranas y la estimulación de los mecanismos de entrada de calcio (Ca^{2+}) – por ejemplo, receptores de glutamato (N-methyl-D-aspartate [NMDA]) (NMDAr), complejo de ataque de membrana (MAC) de complemento y la formación de poros amiloides ion-selectivos) –causan sobrecarga de Ca^{2+} citosólica y mitocondrial. El $A\beta$ celular ataca directamente al complejo de transporte de electrones IV (citocromo c oxidasa) y las enzimas clave del ciclo de Krebs (α -cetoglutarato y piruvato deshidrogenasa) y daña al mtDNA, lo que lleva a la fragmentación. Los productos de la peroxidación de lípidos también promueven la fosforilación y la agregación de la proteína tau que a su vez inhibe el complejo I. Así, se generan cantidades exageradas de RONS en los complejos I y III. A medida que el potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) colapsa y abren los poros, se produce la salida de diferentes factores proteicos que activan algunas caspasas (vía intrínseca). $A\beta$ induce también a la proteína quinasa activada por estrés p38 y a la cinasa N-terminal c-jun (JNK), así como p53, que están ligadas con la apoptosis (Querfurth y LaFerla 2010).

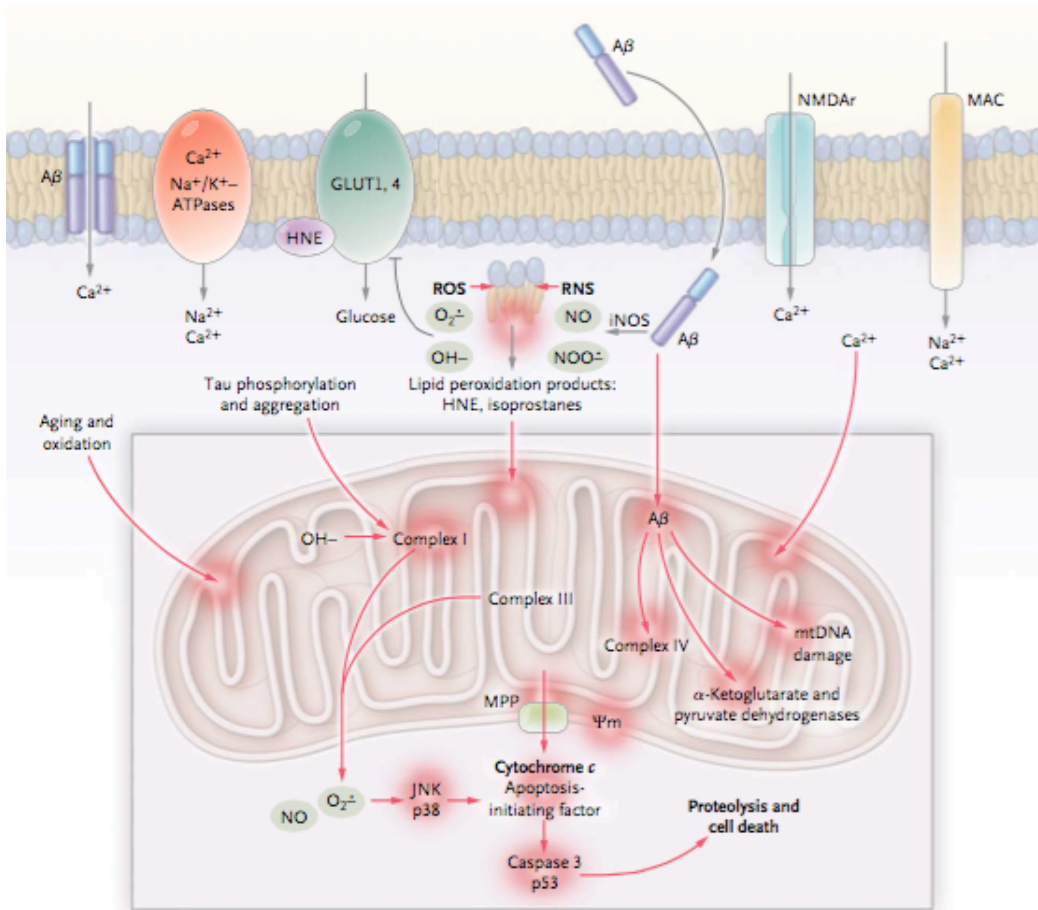


Figura 6. Estrés oxidativo y daño mitocondrial (Querfurth y LaFerla 2010).

2.5. Papel de la mitocondria en el envejecimiento y EA: Dinámica mitocondrial

La disminución en la función mitocondrial juega un papel clave en el proceso de envejecimiento y aumenta la incidencia de trastornos relacionados con la edad (Seo y col., 2010). Ya se ha mencionado anteriormente su papel en el EO a que se somete a las neuronas durante el envejecimiento y procesos de neurodegeneración.

2.5.1. Fisión y fusión mitocondrial

Las mitocondrias son orgánulos altamente complejos y dinámicos que pueden alterar su organización, forma y tamaño, dependiendo de las señales intracelulares y extracelulares (van der Bliek y col., 2013). Las mitocondrias sufren un ciclo continuo de fusión y fisión, y el equilibrio entre estos eventos opuestos determina la morfología del orgánulo (Chen y Chan, 2004) (Figura 7). Considerando que la fusión disminuida puede dar lugar a la fragmentación mitocondrial debido a la fisión excesiva, la disminución de la fisión puede generar mitocondrias largas y altamente conectadas (Sesali y Jensen, 1999). Se ha demostrado que la regulación dinámica de la fusión y fisión mitocondrial es un importante mecanismo de modulación del estado redox celular, la integridad del mtDNA, la función organular y la muerte celular (Liesa y col., 2009).

Las proteínas mejor estudiadas implicadas en la fusión mitocondrial son la guanosina trifosfatasa (GTPasas) relacionada con la dinamina, la Mitofusina 1 (MFN1) y Mitofusina 2 (MFN2). MFN1 y MFN2 están ancladas cada una a la membrana externa mitocondrial (MEM) a través de su dominio C-terminal de unión a la membrana, mientras que su dominio GTPasa N-terminal está presente en el citoplasma (Rojo y col., 2002). Ambas proteínas MFNs median la fusión a través de sus dominios activos de GTPasa ligando membranas mitocondriales opuestas (Chen y col., 2003; Eura y col., 2003). La fusión mitocondrial involucra múltiples etapas, incluyendo la unión mitocondrial y la fusión de las MEMs, acoplamiento y fusión de las membranas internas mitocondriales (MIMs) y la mezcla de componentes intra-mitocondriales (Ishihara y col., 2004). La fusión MIM está controlada por otra GTPasa relacionada con la dinamina, la proteína de la atrofia óptica (OPA1, *Optic Atrophy1*). OPA1 está dirigida e importada en las mitocondrias por una pre-

secuencia N-terminal escindible, existe como una proteína integral de la MIM y un péptido espacial inter-membranal soluble en la base de los pliegues de las crestas (Alexander y col., 2000). La modificación post-transcripcional de OPA1 por "splicing" alternativo genera varias isoformas denominadas isoformas largas (L) e isoformas cortas (S) (Delettre y col., 2001).

La regulación de la fisión mitocondrial en las células está controlada por dos proteínas clave: la proteína relacionada con la dinamina 1 (DRP1) y la proteína de fisión 1 (FIS1). DRP1 se encuentra predominantemente en el citosol y se adhiere a las superficies mitocondriales, donde se asocia con FIS1 (Smirnova y col., 2001). El papel de FIS1 en la fisión mitocondrial es principalmente la de actuar como una proteína de anclaje para DRP1 (Wasilewski y Socorrano, 2009).

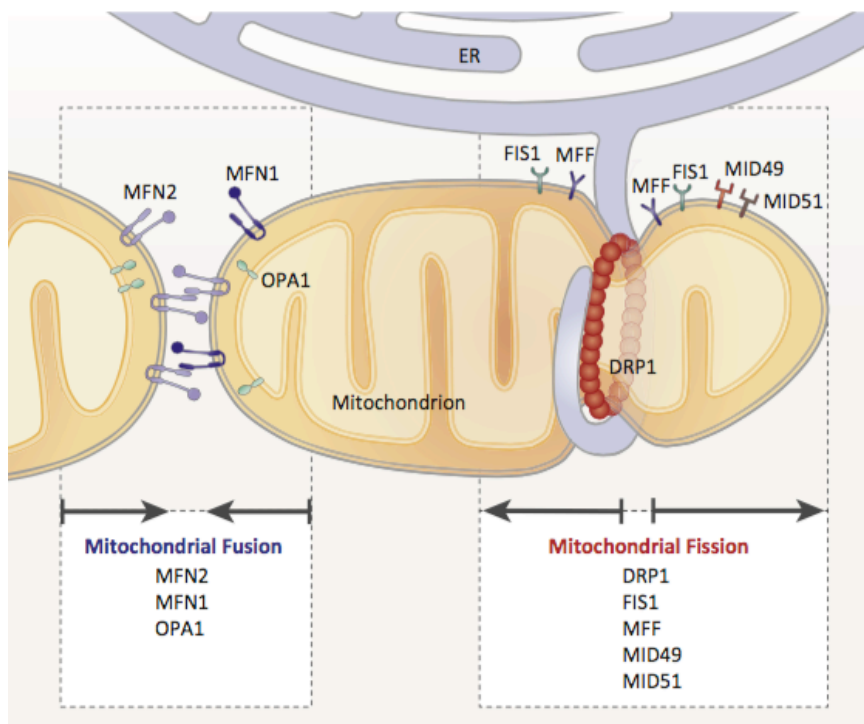


Figura 7. Proteínas implicadas en la dinámica mitocondrial (Sebastián y col., 2017).

2.5.2. Biogénesis mitocondrial

La renovación constante de las mitocondrias es crucial para mantener las mitocondrias saludables con la edad. La renovación precisa de los orgánulos requiere la coordinación de dos procesos celulares clave: la biogénesis mitocondrial y la degradación selectiva (autofagia). La capacidad de biogénesis mitocondrial disminuye con la edad y este es un parámetro importante en la disfunción mitocondrial asociada con el envejecimiento (Sugiyama y col., 1993; Fannin y col., 1999; Seo y col., 2010).

La proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1- α) es el mediador intracelular más conocido de la biogénesis organular (Scarpulla, 2008). PGC1- α es un coactivador transcripcional que potencia la actividad de factores de transcripción específicos, coordinando a su vez la expresión de genes mitocondriales codificados en el núcleo que son necesarios para el funcionamiento del orgánulo (Mootha y col., 2004; Wu y col., 1999). Uno los genes diana de PGC1- α , el receptor- α relacionado con estrógeno (ERR- α), estimula la expresión génica de MFN2 (Cartoni y col., 2005; Soriano y col., 2006). MFN2 en las células incrementa el consumo de oxígeno, la oxidación de la glucosa, el potencial de la membrana mitocondrial y la expresión de proteínas de fosforilación oxidativa (Bach y col., 2003; Chen y col., 2005; Pich y col., 2005). La AMPK es uno de los activadores cruciales de PGC1- α para aumentar el metabolismo mitocondrial y la biogénesis. La actividad de la AMPK está reducida en animales envejecidos y está directamente relacionada con la resistencia a la insulina ligada a la edad y a la oxidación de ácidos grasos deteriorada (Qiang y col., 2007; Reznick y col., 2007). La plasticidad de las mitocondrias disminuye con la edad: su capacidad para la biogénesis mitocondrial se reduce debido a una disminución de la actividad PGC1- α que

podría ser provocada por un aumento de ROS con la edad (Qiang y col., 2007; Reznick y col., 2007). En conjunto, PGC1- α puede retrasar el inicio de condiciones que están asociadas con el envejecimiento y ayudar a atenuar el impacto del daño oxidativo una vez que está presente (Austin y St-Pierre, 2012).

Imágenes en microscopía electrónica han demostrado que en biopsias de cerebros de pacientes con EA hay abundantes mitocondrias estructuralmente dañadas con las crestas rotas y la pérdida parcial o casi completa de la estructura interna. Además, se ha observado un ligero, pero significativo aumento en el tamaño mitocondrial junto con una disminución significativa en el número mitocondrial en las neuronas (Hirai y col., 2001). Estudios recientes demuestran cambios significativos en la expresión de casi todas las proteínas de fisión y fusión mitocondrial incluyendo DRP1, OPA1, MFN1, MFN2 y FIS1 en el cerebro de pacientes con EA (Wang y col., 2009; Bossy y col., 2010; Manczak y col., 2011; Wang y col., 2008; Wang y col., 2012). La proteína de fisión mitocondrial DRP1 está incrementada en cerebros con EA (Wang y col., 2009). Un análisis detallado reveló una reducción significativa de la longitud mitocondrial, pero un aumento del diámetro de la mitocondria, resultando en un aumento significativo del tamaño total. Como consecuencia, la morfología de las mitocondrias en cerebros de EA es más redonda y gruesa (Wang y col., 2008).

3. RESVERATROL

3.1 Generalidades

El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbena) es un polifenol natural, con estructura de estilbena, con un elevado potencial antioxidante. Fue aislado por primera vez por Michio Takaoka, quien logró caracterizarlo de las raíces de *Veratrum grandiflorum* O. Loes. Pero no fue hasta 1992 cuando se descubrió que se encontraba en el vino por Siemann y Creasy.

3.1.1. Estructura química

La estructura del resveratrol consiste en la unión de 2 anillos fenólicos por un doble enlace estireno que forman el 3,5,4'-trihidroxiestilbena (peso molecular: 228.25 g/mol). Este doble enlace es el responsable de las formas isoméricas *cis* y *trans* del resveratrol (Figura 8). El isómero *trans* es la forma más estable.

Se conocen multitud de análogos sintéticos o naturales del resveratrol, así como los isómeros, aductos, derivados y conjugados de estos. Además, en la naturaleza es frecuente encontrar el resveratrol unido a azúcares simples, formando glucósidos.

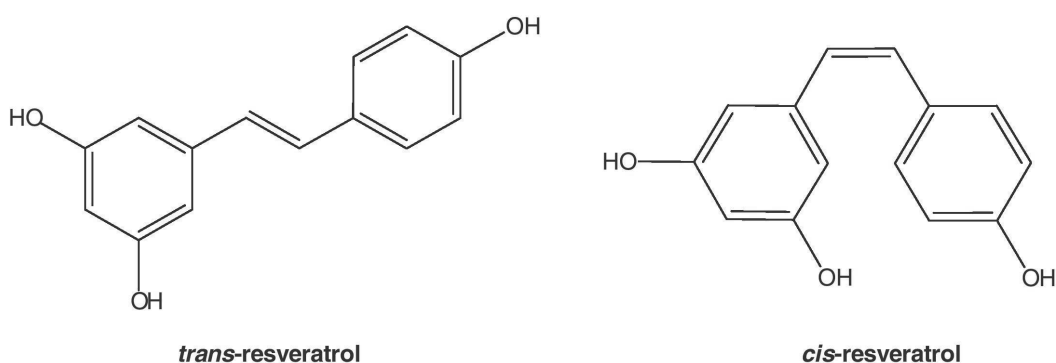


Figura 8. Estructura química del *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol (Gambini y col., 2013).

3.1.2. Fuentes de resveratrol en la naturaleza

El resveratrol está presente en la piel y semillas de más de 70 especies de plantas, incluyendo las uvas (*Vitaceae*), arándanos (*Vaccinium spp.*), moras (*Morus spp.*), té (*Theaceae*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*) y chocolate negro (*Theobroma cacao*), entre otros. La síntesis del resveratrol en las plantas forma parte del sistema de defensa de la planta en reacción a diferentes situaciones estresantes ambientales, como la presencia de metales pesados, heridas, infecciones fúngicas o la radiación ultravioleta. El nivel de resveratrol en las plantas alcanza su pico máximo después de las 24 horas de su exposición al estrés. La mayor concentración de resveratrol se encuentra en la piel, semillas, peciolo y partes leñosas de las uvas negras (50-100 $\mu\text{g/g}$), siendo éstas el principal componente del vino tinto. En promedio la concentración de resveratrol en el vino tinto oscila entre 0.1 y 14.3 mg/L, la concentración depende de varios factores, por ejemplo, el clima y presencia fúngica. La presencia del resveratrol está documentada también en algunos árboles como el eucalipto y el abeto.

En los años 90 se acuñó el término "Paradoja Francesa" para explicar la relación entre el consumo de vino tinto con una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población francesa. Este hecho excepcional se atribuyó a la presencia de la molécula resveratrol en el vino tinto. A partir de estos datos se incrementó el interés por el efecto beneficioso del resveratrol en la salud humana. De esta manera se han recogido un elevado número de evidencias científicas obtenidas de estudios preclínicos en donde se demuestra que el resveratrol posee múltiples efectos terapéuticos como por ejemplo su actividad anti-microbiana, cardioprotectora, anti-tumoral, anti-diabética, su efecto beneficioso en la obesidad y el envejecimiento, sin olvidar la acción anti-oxidante. Sin embargo, hasta hoy el mecanismo concreto

por el que actúa el resveratrol en nuestro organismo no es del todo conocido (Weiskirchen y Weiskirchen, 2016).

3.1.3. Solubilidad, Biodisponibilidad e Ingesta recomendada

La estructura química del resveratrol hace que su solubilidad en agua sea baja (<0.05 mg/ml) lo cual puede afectar a la absorción. Lo anterior hace que el resveratrol tenga una baja biodisponibilidad; sin embargo, posee un alta eficacia in vivo, lo cual podría ser explicado por la conversión de los sulfatos y glucurónidos de nuevo a resveratrol en órganos diana como el hígado, o bien por la recirculación enterohepática de los metabolitos del resveratrol, seguido por la desconjugación por la microflora intestinal y la reabsorción y por último por las actividades de sus metabolitos.

La absorción del resveratrol es altamente variable, en función de la forma en que se consumen y de los alimentos ingeridos. La cantidad recomendada de resveratrol es equivalente a una dosis de 12.5 mg/kg de peso corporal si se asume un adulto de 80 kg. Estas concentraciones son extrapoladas de experimentos que se han realizado con animales, la mayoría de los cuales requieren dosis diarias de hasta 160 mg de resveratrol/kg de peso corporal para alcanzar un efecto biológico específico (Weiskirchen y Weiskirchen, 2016).

Hay varios ensayos clínicos que evalúan el efecto del resveratrol en humanos. En un estudio clínico, 42 personas sanas consumieron 1 g de resveratrol por día durante 4 semanas y los resultados demostraron que este régimen era suficiente para modular sistemas enzimáticos que participan en la activación carcinogénica y las vías de desintoxicación (Chow y col., 2010). Incluso se observó que si se administraban dosis más bajas de una formulación de resveratrol llamada SRT51 era eficaz para mejorar la sensibilidad a la insulina

en pacientes con diabetes tipo 2 (Brasnyó y col., 2011). Sin embargo, tanto las formulaciones y los suplementos enriquecidos con resveratrol han tenido efectos secundarios como náuseas, diarreas y vómito. En general, los estudios son muy alentadores, aunque es importante considerar que el efecto del polifenol varía dependiendo de la dosis administrada. En humanos se ha demostrado que se puede tolerar una dosis de hasta 5 g por día (Brown y col., 2010; Patel y col., 2011). Sin embargo, no hay una dosis óptima de resveratrol establecida para la administración de seres humanos ya que la mayoría de las actividades terapéuticas sólo se han establecido en cultivos celulares o en modelos preclínicos.

3.1.4 Propiedades anti-oxidantes

Como ya se ha mencionado anteriormente, el EO causado por una producción excesiva de ROS en el cerebro ha sido considerado como la causa subyacente de la patogénesis de trastornos neurodegenerativos, asociados o no al envejecimiento como la EA. El resveratrol tiene una acción antioxidante porque reduce la formación de radicales libres de oxígeno mediante la inhibición de genes que codifican proteínas pro-oxidantes tales como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH⁺) y mieloperoxidasa, e induciendo la expresión de genes que codifican para varias enzimas antioxidantes como la SOD, la catalasa, la tiorredoxina y la GPX (Wang y col., 2012; Carrizo y col., 2013). Asimismo, el resveratrol disminuye la actividad de las enzimas implicadas en el desarrollo del EO (Carrizo y col., 2013), reduciendo de manera directa la producción de radicales libres en los tejidos (Rege y col., 2014). El resveratrol ha demostrado ser eficaz en la supresión de la producción de iNOS, que está implicada en la peroxidación lipídica inducida por A β y la regulación negativa de la hemo oxigenasa -1 (HO-1) en un modelo de EA en rata (Huang y col., 2011). El resveratrol también

actúa mejorando las respuestas gliales, oxidativas e inflamatorias al aumentar la expresión de HO-1 y el contenido de GPX extracelular en las células C6 inducidas por H₂O₂ (Quincozes-Santos y col., 2013). Además, el resveratrol también protegió las células PC12 contra la citotoxicidad inducida por la A β , la muerte celular y la acumulación de ROS intracelular y también inhibió la activación de NF- κ B inducida por la A β en células PC12 (Jang y Surh, 2003). El resveratrol al ser un activador de SIRT1 ha demostrado poseer actividad anti-amiloidogénica en cerebros de ratones, además de proteger a neuronas cultivadas de la cepa de ratón SAMP8 contra el daño oxidativo (Kelsey y col., 2010; Cristòfol y col., 2012; Porquet y col., 2013; Jeong y col., 2005).

3.1.5 Propiedades anti-inflamatorias

Diversos estudios han demostrado que el resveratrol media la regulación a la baja de varios biomarcadores inflamatorios, tales como TNF- α , COX2, iNOS e interleucinas (Pallas y col., 2013; Centeno-Baez y col., 2011; Annabi y col., 2012). Además, se ha demostrado que el resveratrol actúa como un inhibidor directo de COX2, y también inhibe la generación de ON, los niveles de proteínas iNOS en el citosol y de macrófagos activados por el lipopolisacárido (LPS) (Gentilli y col., 2001). Otras investigaciones también han demostrado que el resveratrol inhibe la translocación de p65 al núcleo por lo que bloquea la acción pro-inflamatoria de la vía NF κ B en varios tejidos. Dado que la señalización de NF- κ B está implicada en la muerte celular inducida por A β , otro vínculo entre la EA y la acción neuroprotectora del resveratrol es su potencial para disminuir la expresión de iNOS, prostaglandina E2, catepsina y ON modulada por NF- κ B (Kim y col., 2006). Por otro lado, los péptidos A β interactúan con diversos receptores tipo Toll (TLR, *Toll-Like Receptor*) como los TLR4 y pueden provocar la activación microglial. La acción anti-inflamatoria del resveratrol ha demostrado prevenir la activación inducida por LPS (ligando de

TLR4) de macrófagos murinos y células microgliales. También previno el efecto proinflamatorio de A β sobre los macrófagos inhibiendo la activación de STAT1, STAT3 y NF- κ B interfiriendo con la fosforilación de IKK e I κ B (Capiralla y col., 2012).

4. DIETA GRASA COMO ACELERADOR DEL DETERIORO COGNITIVO

En la última década, ha surgido un mayor interés en los efectos relacionados con la nutrición y la salud, incluyendo el efecto de la dieta en la función cerebral (Freeman y col., 2014). En particular, la obesidad es un problema de salud pública y es un factor de riesgo para muchas afecciones como la diabetes, la hipertensión, los accidentes cerebrovasculares, las enfermedades cardíacas, la EA y el deterioro cognitivo (Haslam y James, 2005; Beydoun y col., 2008; Anstey y col., 2014). Diversos estudios sugieren que la obesidad y el aumento del consumo de dietas ricas en grasas como la dieta "Western" aumentan el riesgo de desarrollar demencia (Kalmijn y col., 1997; Luchsinger y col., 2002; Elias y col., 2003; Hebert y col., 2003; Solfrizzi y col., 2003; Parrot y Greenwood, 2007; Craft, 2009). Los primeros trabajos publicados acerca del efecto de la dieta grasa sobre la memoria y el aprendizaje en ratas son los de Greenwood y Winocur en 1990. En sus estudios los animales se alimentaron durante 3 meses con una dieta alta en ácidos grasos saturados para posteriormente evaluar la cognición. Los resultados mostraron que las ratas alimentadas con la dieta alta en grasas (40% de grasa) respondieron peor en las pruebas cognitivas empleadas, revelando los efectos perjudiciales de este tipo de dieta en la función cerebral (Greenwood y Winocur, 1990). Otros estudios más recientes en roedores han demostrado que la obesidad inducida por el consumo de dieta alta en grasas esterol se asocia con la EA, aumentado APP, A β y tau (Thirumangalakudi y col., 2008; Jeon y col., 2012; Puig y col.,

2012; Knight y col., 2014; Petrov y col., 2015; Palomera-Avalos y col., 2016; Martins y col., 2017). En la tabla 3 se resumen los resultados de algunos estudios con roedores que exploran una correlación entre una dieta rica en grasas y el deterioro cognitivo (Freeman y col., 2013).

Por otra parte, la obesidad se ha asociado con anormalidades en las neuronas y/o mielina, en la sustancia gris y blanca (Gazdzinski y col., 2008; Naderali y col., 2009; Mueller y col., 2012), en la atrofia cerebral (Enzinger y col., 2005; Ward y col., 2005; Taki y col., 2008; Fotuhi y col., 2012; Brooks y col., 2013) y reducción del volumen de la materia gris focal (Pannacciulli y col., 2006). En particular, el hipocampo y el lóbulo frontal son altamente sensibles a las alteraciones estructurales inducidas por la obesidad. El volumen del hipocampo se asocia con la función cognitiva (Stewart y col., 2005) y una reducción en el volumen puede predecir el deterioro cognitivo y la demencia (Elias y col., 2000). Por otra parte, la obesidad en la mediana edad conduce a la atrofia del hipocampo y el deterioro de la función ejecutiva (Debette y col., 2011) lo que apoya el hecho de que la obesidad en esas edades se asocia con mayor riesgo de desarrollar demencia, en particular EA.

Estudios epidemiológicos en humanos, han demostrado como la ingesta de una dieta rica en grasas que incluye principalmente omega-6 y ácidos grasos saturados se asocia con un peor desempeño en una tarea cognitiva (Kalmijn y col., 1997; Ortega y col., 1997; Morris y col., 2004; Zhang y col., 2006). Además, otros estudios también han revelado que una dieta que contenga principalmente ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans se asocian con un mayor riesgo de EA (Luchsinger y col., 2002; Kalmijn y col., 1997; Ortega y col., 1997; Morris y col., 2004; Zhang y col., 2006; Morris y col., 2003). Por otro lado, se ha reportado que en personas obesas hay un déficit en el aprendizaje,

la memoria y la función ejecutiva en comparación con pacientes no obesos (Elias y col., 2003; Elias y col., 2005; Waldstein y Katzel, 2006).

Tabla 3. Estudios en roedores: efecto de la dieta sobre la cognición (Freeman y col., 2014)

Composición de la dieta	Resultados cognitivos	Mecanismo biológico	Referencias
Dieta a base de manteca (40% grasa)	Peor desempeño en memoria del trabajo y retención	No discutido	Greenwood y Wincour, 1990.
Aceite de manteca y maíz (39% de energía)	Peor desempeño en el laberinto acuático de Morris (MWM)	EO, niveles reducidos de (BDNF, "Brain-Derived Neurotrophic Factor")	Wu y col., 2004
Dieta rica en grasas (45% grasa)	Peor desempeño en el emparejamiento diferido basado en operante para posicionar la tarea	Resistencia a la insulina	McNeilly y col., 2011
Dieta rica en grasas y alta en glucosa suplementada con jarabe de maíz de alta fructosa	Peor rendimiento en aprendizaje espacial	Resistencia a la insulina, niveles reducidos de BDNF	Stranahan y col., 2008
Grasa esterol saturados altos	Peor rendimiento en el laberinto del brazo radial del agua	Inflamación, integridad dendrítica reducida en el hipocampo	Freeman y col., 2011
Dieta "Western" (41% grasa) o manteca (60% grasa)	Deterioro de la retención en la prueba de comportamiento para la dieta 60% grasa pero no para la dieta "Western"	EO	Morrison y col., 2010
Dieta rica en grasas (45% grasa)+metmorfina	Mejor rendimiento en la tarea basada en operante	Sensibilidad a la insulina	McNeilly y col., 2012

Dieta rica en grasa y en carbohidratos+vitamina E	Mejor rendimiento en el laberinto del brazo radial del agua	EO	Alzoubi y col., 2013
Dieta rica en grasa (45% grasa)	Deterioro en el acondicionamiento en la tarea del miedo (Fear Conditioning)	EO	Freeman y col., 2013
Dieta rica en grasa + azúcar	Deterioro en la tarea negativa de la función serial	Vascular/ adiposidad	Davidson y col., 2012

5. EPIGENÉTICA Y NEURODEGENERACIÓN

La epigenética abarca una amplia gama de cambios heredables en la expresión génica que se producen en respuesta a influencias ambientales y que no resultan en alteraciones en la secuencia del DNA (Fraga y Esteller, 2007; Hwang y col., 2017). Estas alteraciones surgen debido a la metilación o hidroximetilación del DNA, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los cambios en el posicionamiento de los nucleosomas (Hwang y col., 2017).

5.1. Modificaciones Epigenéticas

5.1.1. Metilación e Hidroximetilación

En el cerebro, la metilación del DNA (5-mC) y la hidroximetilación (5-hmC) conllevan la activación o represión de genes y sus efectos se extienden sobre dominios cromosómicos largos, dando lugar a estados “memorizados” de expresión génica (Bird, 2002). Las DNA metiltransferasas (DNMT1, DNMT3A y DNMT3B) catalizan la transferencia de grupos metilo de S-adenosil-1-metionina (SAM) al carbono de posición 5 en citosinas dentro del DNA para generar 5-metilcitosina (Figura 9). La DNMT1 está encargada de mantener los grupos metilos copiando el patrón de metilación de la hebra parental a la

hebra hija de DNA, por lo que la metilación se hereda después de la división celular (Razin y Riggs, 1980). Por otro lado, las DNMT3A y DNMT3B se encargan de añadir grupos metilos de novo al dinucleótido citosina CpG no metilado. Aunque originalmente se pensó que esta transferencia de grupos metilo era irreversible, recientemente se ha evidenciado que el DNA puede experimentar rápida y reversiblemente cambios en la metilación y puede sufrir desmetilación (Miller y Sweatt, 2007). La desmetilación es una eliminación catalítica de los grupos metilo llevada a cabo por miembros de la familia de la DNA-hidroxilasa de la Familia de Translocación Diez-Once (TETs, *Ten-Eleven Translocation*). Las proteínas TET1, TET2 y TET3 pueden catalizar la conversión de 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina (Tahiliani y col., 2009; Kriaucionis y Heintz, 2009). El resto hidroximetilo es lábil y puede generar rápidamente citosinas no metiladas que a su vez activan genes. TET1 y TET2 juegan un papel importante en el control de genes y la muerte celular en las neuronas (Gu y col., 2011) y están asociadas al envejecimiento y neurodegeneración (Romaine y col., 2015), mientras que TET3 se relaciona con los procesos de desarrollo embrionario temprano (Ficz y col., 2011).

5.1.2. Modificaciones postraduccionales de Histonas

Cada histona tiene un dominio central y varias colas amino-terminales no estructuradas que contienen sitios para más de 100 modificaciones postraduccionales (Jakovcevski y Akbarian, 2012), incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, desaminación y poli (ADP) ribosilación. En la parte b de la Figura 9 se muestran los sitios en los que la histona H3 se modifica después de la traducción mediante acetilación, metilación y fosforilación. Estas marcas son añadidas por las enzimas de remodelación de la cromatina conocidas como “escritoras” y son eliminadas por enzimas conocidas como “borradoras”. Las “escritoras” como la familia de

histonas acetiltransferasas (HATs) y la familia de histonas Metiltransferasas (HMTs) son proteínas que alteran las histonas mediante la adición de grupos acetilo, esta modificación bloquea la capacidad de la histona para unirse al DNA y así hacer la cromatina en una conformación abierta para decodificar este código. Por el contrario, las “borradoras”, como la familia de histonas deacetilasas (HDACs) y la familia de histonas demetilasas (KDMs) son proteínas que eliminan el grupo acetilo de las histonas que restauran la interacción entre la histona y el DNA, dejando el DNA una vez más en una conformación cerrada. Las proteínas conocidas como “lectoras” reconocen las marcas epigenéticas en las histonas centrales a través de motivos especializados y por lo tanto son reclutados para los promotores de los genes diana (Gardner y col., 2011).

5.1.3. Intercambio de variante de Histona

La sustitución de una variante de histona por otra es un modo adicional de remodelación de la cromatina que es importante en la consolidación de la memoria. A diferencia de las histonas canónicas, las variantes de histonas experimentan una expresión independiente de la replicación y tiene efectos pronunciados sobre la estabilidad y el posicionamiento de los nucleosomas (Jakovcevski y Akbarian, 2012). Por ejemplo, la variante H2A.Z reemplaza la histona H2A canónica en el hipocampo, donde amortigua la formación de memoria en respuesta al condicionamiento del miedo en ratones (Zovkic y col., 2014), lo que implica a H2A.Z como regulador negativo de la consolidación de la memoria (Maze y col., 2015).

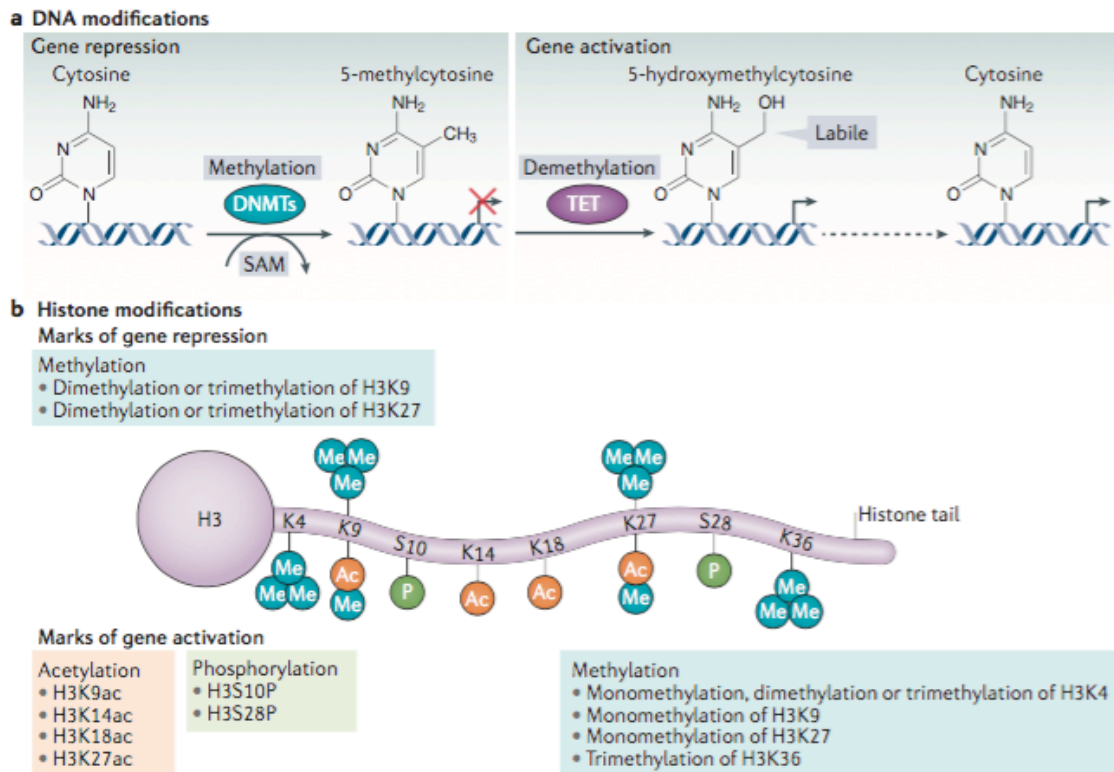


Figura 9. Principales modificaciones epigenéticas. a. Modificaciones en el DNA. b. Modificaciones en Histonas (Hwang y col., 2017).

Además de realizar cambios hereditarios en la expresión génica, la epigenética es también un mecanismo a través del cual las experiencias pueden modificar la plasticidad sináptica, la adquisición y la consolidación de memoria, entre otras cosas. Se ha demostrado que la desregulación epigenética está implicada en el deterioro de la cognición y la muerte neuronal que se asocian con enfermedades neurodegenerativas (Sanchez-Mut y Gräff, 2015; Hwang y col., 2017).

Los cambios en el epigenoma durante el envejecimiento llevan a alteraciones en la regulación genética y la inestabilidad genómica, contribuyendo principalmente a la aparición de enfermedades neurodegenerativas, entre otros (Brunet y Berger, 2014). Específicamente se han observado alteraciones

en los niveles de la metilación global de histonas H3 y H4 durante el envejecimiento y la neurodegeneración (Feser y Tyler, 2011; Muñoz-Najar y Sedivy, 2011; Murr, 2010). Estos cambios se producen en respuesta a las modificaciones ambientales negativas que produce el estrés y la ansiedad (Yoo y col., 2009) y el daño celular (Murr, 2010). Es importante destacar que las alteraciones en los genes de las enzimas epigenéticas, como la expresión de DNMT1 y 3A, así como de HMTs, GLP y Ga9 en las neuronas diferenciadas causan alteraciones en la memoria y el aprendizaje (Feser y Tyler, 2011, Zardo y col., 2012; Spiegel y col., 2014; Rowbotham y col., 2015; Sierra y col., 2015). Por otro lado, la reducción de la expresión de HDAC2 y HDAC3 facilita la formación de la memoria y el aprendizaje, aumentando a su vez el número de dendritas y sinapsis (Lepeule y col., 2012; Johnson y col., 2012). Más específicamente, con la edad se observa una reducción en la metilación en las posiciones H4K20me, H3K36me₃ y un aumento en posiciones H3K27me₃, H3K79me y H4K20me₃; además, se ve reducida en células senescentes la metiltransferasa EZH2 responsable de la metilación en la posición H3K27 (Muñoz-Najar y Sedivy, 2011, Morris y Monteggia, 2014, LaPlant, 2010). En referencia a la remodelación de la cromatina y específicamente al proceso de acetilación se ha reportado un aumento en los patrones globales de acetilación de las histonas H3 y H4 durante el envejecimiento (Kramer y col., 2011).

6. MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES DE ENVEJECIMIENTO

6.1. Ratón de senescencia acelerada (SAMP8)

El ratón SAMP8 fue una de las cepas de senescencia acelerada que se desarrolló espontáneamente a partir de los cruces de la cepa AKR/J en la Universidad de Kyoto (Takeda y col., 1981). Después de la endogamia en el mantenimiento de la colonia, observaron que varias camadas mostraban características indicativas de envejecimiento acelerado, incluyendo pérdida de cabello, lordocifosis, trastornos peri-oftálmicos, pérdida de actividad y menor esperanza de vida, entre otras características. La selección de estos fenotipos y a través de cruces entre hermanos durante varias generaciones generó una cepa con senescencia acelerada, la cepa SAMP con un promedio de vida de 9.7 meses. Los ratones que no mostraban fenotipos relacionados con la senescencia fueron criados de la misma manera para obtener la cepa de ratón resistente a la senectud (SAMR) con un promedio de vida de 16.3 meses (Figura 10). La esperanza de vida de los SAMR, a pesar de que son más longevos que los SAMP, es menor que cualquier otra cepa endogámica, que se considera de 28 meses. Podemos encontrar nueve sub-cepas de SAMP y 3 sub-cepas de SAMR, cada una exhibiendo anomalías fenotípicas ligeramente diferentes. Sin embargo, la principal característica de todas las cepas SAMP es el desarrollo normal y la madurez de la función reproductiva, seguida de una manifestación temprana de los fenotipos relacionados con la senescencia. Estos incluyen fenotipos neurobiológicos como déficit de aprendizaje y memoria, atrofia cerebral, trastornos emocionales, ritmos circadianos anormales y trastornos de la audición (Takeda y col., 1997; 1999; Pallàs, 2012).

Desde 1981, cuando se publicó el primer artículo sobre el desarrollo de la cepa SAMP, se han realizado numerosos estudios utilizando esta cepa como modelo en diversas patologías, incluyendo el envejecimiento. Miyamoto y col informaron por primera vez en 1986 de los déficits en la memoria y aprendizaje relacionados con la edad en los ratones SAMP8. Desde entonces una gran cantidad de estudios se han llevado a cabo para aclarar las características neurobiológicas que subyacen este déficit en el modelo SAMP8 (Takeda, 2009). Se ha sugerido que el ratón SAMP8 puede ser un buen modelo para estudiar las enfermedades neurodegenerativas, ya que muestra muchas alteraciones neurológicas asociadas con el envejecimiento como deterioro cognitivo, desórdenes emocionales, alteración del ritmo circadiano junto con determinadas alteraciones neuropatológicas y neuroquímicas (Takeda, 2009; Morley y col., 2012).



Figura 10. Machos de 9 meses de edad de las cepas SAMP8 (derecha) y SAMR1 (izquierda).

6.1.1. Cambios bioquímicos en SAMP8

6.1.1.1. Estrés Oxidativo

Como ya se ha mencionado, el EO se produce cuando la generación de ROS y RNS supera la capacidad antioxidante endógena de las células, causando la muerte neuronal y la neurodegeneración en el cerebro. Por lo tanto, el daño oxidativo está asociado con el envejecimiento y trastornos neurodegenerativos como EA (Pallàs, 2012). Se han demostrado niveles elevados de peroxidación lipídica y carbonilación proteica en la corteza cerebral de SAMP8 de tan solo 4 a 8 semanas de edad comparados con los controles SAMR1 (Sato y col., 1996b; Albasanz y col., 2011). También se ha confirmado que los eventos oxidativos podrían ser desencadenados por la pérdida de actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa y/o por el aumento de actividad de enzimas pro-oxidativas como acetil-CoA oxidasa (Sato y col., 1996a). En la Tabla 4 se muestra un resumen de la actividad de las enzimas anti y pro-oxidantes en la cepa SAMP8. No obstante, la literatura relacionada con el EO en SAMP8 no siempre es concluyente. Por ejemplo, Okatani y col no encontraron cambios relacionados con la edad en la SOD, ni en SAMP8 ni en la cepa SAMR1 (Okatani y col., 2002), por otro lado, Alvarez-Garcia y col no observaron cambios relacionados con la edad en la actividad de la catalasa y la glutatión reductasa pero si detectaron cambios en SOD (Alvarez-Garcia y col., 2006). Es evidente que otros sistemas detoxificantes también pueden participar en los procesos de EO en SAMP8. Estudios recientes han demostrado que al igual que en el cerebro EA, la desintoxicación de peróxido por los astrocitos podría desempeñar un papel en los déficits cognitivos relacionados con la edad. Los astrocitos derivados de ratones SAMP8 eran más susceptibles al daño inducido por H₂O₂ que los astrocitos de los ratones SAMR1 (Lu y col., 2008).

Tabla 4. Alteraciones oxidativas encontradas en SAMP8.

Diana	Modificación
Carbonilación proteica	Aumentado
Peroxidación lipídica	Aumentado
Oxidación de Ácidos Nucleicos	Aumentado
Enzima súper oxido dismutasa manganeso	Actividad disminuida
Glutation reductasa	Actividad no modificada o disminuida
Catalasa	Actividad no modificada o disminuida
Glutamina sintetasa	Actividad disminuida
ON sintasa	Actividad disminuida
Acumulación de 8-oxoguanina	Aumentado

6.1.1.2. Patología amiloide β en SAMP8

Debido a las características que presenta el ratón SAMP8 se ha propuesto como un modelo para estudiar la EA. Una de éstas características es la presencia del péptido A β , los depósitos de A β se han encontrado en regiones afectadas por EA como hipocampo, septo medial, corteza cerebral y cerebelo. Liao y col. (2006) realizaron los primeros estudios que demostraban la aparición de las placas A β en ratones SAMP8 jóvenes, y más tarde se demostró una acumulación inmunoreactiva a anticuerpos A β (Del Valle y col., 2010), sin embargo no hay evidencias irrefutables de que se formen placas amiloides propiamente dichas. Las investigaciones realizadas apuntan a un aumento en los niveles de A β en la cepa SAMP8 y a una alteración de la vía de procesamiento de la proteína APP que sería molecularmente cercano a las alteraciones presentes en la EA. Se ha detectado un aumento relacionado con la edad de la expresión del gen APP en el hipocampo de SAMP8, que se correlaciona con un aumento relacionado con la edad en los niveles de proteína APP (Morley y col., 2000; Poon y col., 2004a). También se han reportado variaciones en la expresión de otros genes relacionados con la EA.

Se ha informado que SAMP8 presenta un aumento en la expresión génica de presenilina-1 (PS1) y presenilina-2 (PS2), dos proteínas que están incluidas en el complejo de secretasa cuyas mutaciones dan lugar a un aumento en el corte amiloidogénico de APP observados en EA familiar (Wei y col., 1999; Kumar y col., 2009). La expresión de la apolipoproteína E (ApoE) otro marcador de EA también se encontró en SAMP8 (Wei y col., 1999), expresándose menos en SAMP8 en comparación con la cepa SAMR1. Además Wu y col. (2009) encontraron que el gen y la proteína RAGE, LDL y LPR1 que son receptores importantes para la eliminación de la proteína A β y para el control del EO fueron más bajos en cerebros de SAMP8 que en SAMR (Tabla 4).

Se han realizado varios estudios acerca de la regulación de APP en SAMP8 para mejorar los déficits cognitivos y de comportamiento. El primer trabajo fue realizado por Kumar y col. (2000), donde lograron una regulación negativa de APP utilizando oligonucleótidos específicos que mejoraban los parámetros de senescencia cerebral presentes en SAMP8. Recientemente, se ha propuesto una nueva estrategia empleando miRNAs, que son reguladores post-transcripcionales de APP en SAMP8. Liu y col (2010b) sostienen que los miRNAs (miR-16, miR-144, miR-195 y miR-383) regulan negativamente la expresión de APP en SAMP8. Además, se ha realizado un estudio utilizando un anticuerpo monoclonal contra los oligómeros A β en ratones SAMP8, lo que hace cada vez más evidente que los déficits relacionados con la edad observados en la cepa SAMP8 son dependientes de la vía del A β . En este estudio, la administración del anticuerpo específico a ratones SAMP8 mejoró las tareas de aprendizaje y memoria y disminuyó los oligómeros de A β y los niveles de fosfo-tau (Zhang y col., 2011).

6.1.1.3. Taupatía en SAMP8

Canudas y col (2005) detectaron un aumento de tau fosforilada en ratones SAMP8 (corteza, estriado e hipocampo) en comparación con SAMR1. Además, se encontraron niveles elevados de proteína tau fosforilada en ratones SAMP8 de 5 meses de edad (Álvarez-García y col., 2006). También se estudiaron dos de las cinasas responsables de la fosforilación de tau relacionadas con EA, CDK5 y GSK3, detectándose una actividad elevada de CDK5 y un aumento de la expresión en corteza, estriado e hipocampo, sin embargo la expresión y la actividad de GSK3 no se alteraron (Canudas y col., 2005). Por otra parte, un tratamiento crónico con melatonina o litio en SAMP8 disminuyó la hiperfosforilación de tau, reduciendo la actividad de CDK5 y GSK3, sugiriendo que estas cinasas y sus vías descendentes participan en la hiperfosforilación de tau en ratones SAMP8 (Gutiérrez-Cuesta y col., 2007; Tajés y col., 2008). Todas las características mencionadas (Tabla 5) sugieren que la expresión anormal de genes asociados a EA pueden desempeñar un papel clave en el deterioro cognitivo observado en el modelo SAMP8.

Tabla 5. Marcadores histopatológicos y celulares de EA y envejecimiento en SAMP8

Diana	Modificación
Proteína tau	Aumentada niveles y fosforilación
Cinasas tau	Aumentada niveles o actividad
Receptor para el producto final de glicación avanzada (RAGE)	Aumentado
Proteína APP	Aumentada
β -Amiloide	Contenido amiloide aumentado y agregado
Secretasas	ADAM-10 y PS1
Barrera hematoencefalica	Alterada

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS

El envejecimiento se caracteriza por una pérdida progresiva de la integridad fisiológica que conduce a un deterioro de las funciones cognitivas, una mayor vulnerabilidad al estrés y a la muerte. A pesar de que ha aumentado la esperanza de vida en los últimos años, las enfermedades neurodegenerativas como la EA entre otras, se han convertido en un problema para el sector de salud ya que se estima que aumentaran las personas mayores de 60 años de un 12% a un 22% en el mundo. Por lo tanto, es importante encontrar estrategias que conlleven beneficios terapéuticos para los pacientes y a reducir el impacto del envejecimiento sobre la salud. En este sentido la dieta y las sustancias bio-activas presentes en los alimentos son estrategias óptimas para intervenciones que pueden promover el envejecimiento cerebral saludable.

En este contexto, y dado que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para los trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad, el objetivo general de este trabajo ha sido estudiar los mecanismos implicados en la neurodegeneración inducidos por la dieta grasa y evaluar el efecto neuroprotector del resveratrol en modelos de senescencia.

Se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el efecto nocivo del estrés metabólico mediante una dieta alta en grasa y el efecto protector del resveratrol en el cerebro de ratones machos SAMP8 de 9 meses de edad.
 - Evaluar la función cognitiva y alteraciones en el comportamiento.
 - Analizar las enzimas y marcadores de EO e inflamación cerebral.

-
- Determinar la acción negativa de la dieta grasa y el efecto protector del resveratrol en el proceso de la hiperfosforilación de tau.
 - Estudiar los cambios inducidos por la dieta grasa y el resveratrol en la función mitocondrial y vía de la Wnt

2. Estudiar la importancia del estrés metabólico en animales fisiológicamente envejecidos de la cepa C57BL/6J de 24 meses de edad con respecto a la cognición y determinar los cambios moleculares subyacentes a la pérdida de capacidades cognitivas y al efecto beneficioso del resveratrol.

- Evaluar el efecto del resveratrol y la dieta alta en grasa sobre la función cognitiva de los ratones.
- Analizar los cambios en las enzimas y marcadores de EO e inflamación cerebral.
- Analizar los efectos del resveratrol y la dieta grasa en la dinámica mitocondrial.
- Evaluar la acción del resveratrol y la dieta grasa en diferentes vías implicadas en la neurodegeneración.
- Estudiar diferentes marcadores epigenéticos relacionados con la cognición.

3. Investigar el efecto modulador del resveratrol en la dieta frente a un estímulo inflamatorio agudo con LPS en ratones fisiológicamente envejecidos de la cepa C57BL/6J.

- Evaluar los niveles de expresión de marcadores de inflamación, como citocinas.
- Evaluar los niveles de marcadores de EO y estrés del RE.

- Analizar los cambios moleculares producidos por la administración de resveratrol en respuesta a un daño agudo por LPS.

3. RESULTADOS

Publicación 1

Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway

Palomera-Avalos V, Griñán-Ferré C, Puigoriol-Ilamola D, Camins A, Sanfeliu C,
Canudas AM, Pallàs M.

Molecular Neurobiology (2016)

RESUMEN


Los mecanismos fisiológicos implicados en la disfunción cognitiva y el envejecimiento debido al estrés metabólico inducido por una dieta alta en grasas (HF) no están totalmente descritos. Para comprender y profundizar en dichos mecanismos se indujo estrés metabólico mediante la alimentación de una dieta alta en grasas (HF) en el modelo de ratón con senescencia acelerada (SAMP8) durante 15 semanas. Además, se estudió el efecto preventivo del resveratrol sobre el estrés metabólico en el hipocampo de los ratones.

La dieta HF produjo deterioro cognitivo en SAMP8 y el resveratrol presentó un efecto preventivo cuando fue administrado en la dieta. Las proteínas involucradas en la dinámica mitocondrial como la proteína de la atrofia óptica 1 (OPA1) y la mitofusina 2 (MFN2) presentaron cambios en el hipocampo de SAMP8 alimentados con HF, estos cambios fueron revertidos por el resveratrol. La microscopia electrónica mostró mitocondrias más grandes en SAMP8 con resveratrol respecto a SAMP8 con HF los cuales presentaron mitocondrias más pequeñas y con morfología alterada, indicando aumento en el proceso de fusión en ratones con resveratrol. También se encontraron aumentos significativos en OXPHOS en los complejos I-NDUFB8, II-SDNB, III-UQCRC2, y V- ATPasa en ratones tratados con resveratrol, además el canal de aniones dependiente de voltaje 1 (VDAC1) también se incremento en animales tratados con resveratrol respecto a los de HF. Las citosinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α aumentaron de manera significativa con la dieta HF y el resveratrol ayudo a prevenir su aumento.

Por otro lado, se encontró que la dieta HF afecta la vía de la Wnt inactivando la β -catenina y modificando varios componentes de esta vía como Dickkopf (DKK), Dishevelled (Dvl3), Axina1 y GSK3 β . La dieta grasa incremento de manera significativa la proteína Tau fosforilada (Tau p205, Tau p306 y Tau pSer 404) la cual fue disminuida por el resveratrol.

En conclusión, el estrés metabólico generado por HF afecta vías celulares cruciales implicadas en la neurodegeneración y produce deterioro cognitivo en ratones SAMP8. El resveratrol puede prevenir este tipo de daño en el cerebro y podría ser utilizado como medida preventiva en el envejecimiento o en condiciones neurodegenerativas.

Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway

V. Palomera-Avalos¹ · C. Griñán-Ferré¹ · D. Puigoriol-Illamola¹ · A. Camins¹ · C. Sanfeliu² · A. M. Canudas¹ · M. Pallàs^{1,3} 

Received: 4 November 2015 / Accepted: 1 February 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Metabolic stress induced by high-fat (HF) diet leads to cognitive dysfunction and aging, but the physiological mechanisms are not fully understood. Senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) models were conducted under metabolic stress conditions by feeding HF for 15 weeks, and the preventive effect of resveratrol was studied. This dietary strategy demonstrates cognitive impairment in SAMP8-HF and significant preventive effect by resveratrol-treated animals. Hippocampal changes in the proteins involved in mitochondrial dynamics optic atrophy-1 protein (OPA1) and mitofusin 2 (MFN2) comprised a differential feature found in SAMP8-HF that was prevented by resveratrol. Electronic microscopy showed a larger mitochondria in SAMP8-HF + resveratrol (SAMP8-HF + RV) than in SAMP8-HF, indicating increases in fusion processes in resveratrol-treated mice. According to the mitochondrial morphology, significant increases in the I-NDUFB8, II-SDNB, III-UQCRC2, and V-ATPase complexes, in addition to that of voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)/porin, were found in resveratrol-treated animals with regard to SAMP8-HF, reaching control-animal levels. Moreover, tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

and interleukin (IL-6) were increased after HF, and resveratrol prevents its increase. Moreover, we found that the HF diet affected the Wnt pathway, as demonstrated by β -catenin inactivation and modification in the expression of several components of this pathway. Resveratrol induced strong activation of β -catenin. The metabolic stress rendered in the cognitive and cellular pathways altered in SAMP8 focus on different targets in order to act on preventing cognitive impairment in neurodegeneration, and resveratrol can offer therapeutic possibilities for preventive strategies in aging or neurodegenerative conditions.

Keywords Aging · Neurodegeneration · Behavior · Cognition · Diabetes metabolic stress · Mitochondrial dynamics · Resveratrol · Mitochondria · Fission · Fusion · β -catenin · Learning

Introduction

Aging is characterized by cognitive decline in attention and executive functions [1]. It is well established that aging is one of the factors related with an increase in the prevalence of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) [2].

On the other hand, elderly people often have impaired glucose metabolism, with insulin resistance and reduced glucose utilization [3]. Glucose metabolism in the brain limits the synthesis of acetylcholine, glutamate, aspartate, gamma-aminobutyric acid, glycine, and adenosine triphosphate (ATP) production [4, 5]. In addition, high concentration of extracellular glucose causes increased oxidative stress (OS) [6]. The reduced use of glucose in aging and AD [7, 8] could be due to mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) impairment, which some authors have reported

✉ M. Pallàs
pallas@ub.edu

¹ Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry (Pharmacology Section) and Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

² Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC, and IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain

³ Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

as being related with a reduction in the gene expression of the electronic chain-specific components [9].

There are evidences that link OS and the mitochondrial dysfunction caused by metabolic stresses, such occurs in animals fed with a high-fat (HF) diet, which renders insulin resistance and beta-amyloid and neurofibrillary tangle (NFT) accumulation [10, 11]. A growing body of evidence supports mitochondrial dysfunction as a prominent and early chronic OS-associated event that contributes to synaptic abnormalities in aging and that, ultimately, increases susceptibility to age-related disorders, including AD [6, 12]. Studies of aging brain mitochondria consistently report reductions of complex I activity, complex IV activity, and increased reactive oxygen species (ROS) production [6, 13]. Defects in mitochondrial DNA (mtDNA) have been found in elderly persons without AD and have been associated with decreased cytochrome oxidase activity in the brain [14, 15]. The accumulation of mtDNA changes might increase ROS production and reduce mitochondrial ATP in an age-dependent manner. Increases of somatic mtDNA in aging might contribute to AD development [12].

On the other hand, in brain aging, mitochondrial biogenesis might represent a compensatory response to longitudinal declines in brain mitochondrial function [16]. In AD, data suggest that the mitochondrial biogenesis state may be mixed but certainly fewer normal mitochondria and more abnormal mitochondria in AD neurons, and mitochondrial removal via lysosomes is increased [17, 18]. Expression of oxidative phosphorylation subunit genes also appears mixed, with some studies showing decreased expression and others, increased expression (at least up through intermediate disease stages) [19]. This raises the possibility that switching from an enhanced to a diminished state of mitochondrial biogenesis could represent a key transition between normal brain aging and AD (review [16]). The biodynamics of mitochondria includes fission and fusion processes, two antagonistic mechanisms that equilibrate the balance of energy balance in the cell. Fusion implies mitochondrial compartments and increases ATP synthesis to maximize cellular respiration. Moreover, the formation of hyperfused mitochondria after fusion processes optimizes mitochondrial function during the starvation networks that are formed upon exposure of cells to stress [20]. Fusion is activated in stress-exposed or starving cells because it improves the bioenergetic capacity in the long term. In addition, it is demonstrated that, during aging, fusion compensates for the accumulation of mitochondrial mutations, improving metabolic rates in cells. In contrast, the fission process lead to fragmented mitochondria [21]. Fission processes are frequently found in resting cells and when high respiratory activity is not required. Mitochondrial fission contributes to the maintenance of the bioenergetic capacity because of the elimination of damaged mitochondria by autophagy [20]. Mitochondrial dynamics are regulated as a direct response to the bioenergetic state of mitochondria and include

transcription, post-translational modification of proteins implicated as optic atrophy-1 protein (OPA1), mitofusin 1 (MFN1), fission protein-1 (Fis1), and dynamin-related protein 1 (DRP1), among others [22].

Emerging evidences point out the link between metabolism and Wnt signaling. Wnt is the upstream extracellular effector that, when activated, stimulates several intracellular signal transduction pathways. The most important of these are the canonical or Wnt/ β -catenin-dependent pathway and the non-canonical or β -catenin-independent pathway [23]. Increased risk for type II diabetes has been linked with specific Wnt component modifications [24–26]. However, the physiological relevance of this role in metabolic processes and in brain functioning is less known. However, evidences indicate that Wnt proteins participate in the synapses remodeling and function, as well as the involvement of the Wnt component pathway in the development of neurological and mental disorders (for review [27]). Moreover, evidences that support a neuro-protective role of Wnt proteins in Alzheimer's disease are reported by several authors [28, 29].

Several pharmacological and non-pharmacological strategies demonstrate front primary cause in plaque and tangle formation during the development of age-related neurodegeneration. From a therapeutic point of view, resveratrol, a polyphenol with higher antioxidant properties, has been postulated for years as a possible therapeutic compound against cognitive decline, including AD [30, 31]. Several bodies of evidence have shown that resveratrol reduces neurodegeneration and improves cognition capabilities in senescence-accelerated-prone mice P8 (SAMP8), a mouse model of aging and AD [32] and in APP/PS1 mice [33].

The relationship between brain glucose metabolism and learning deficit was established in the SAMP8, which has been proven to be a useful murine model of age-related behavioral disorders as AD [34, 35]. Authors conclude that the SAMP8 strain is a useful model of glucose hypometabolism observed in aging and AD.

Here, we aimed to delve deeper into the harmful effect of metabolic stress in SAMP8 brain, as an age-related cognitive decline and AD model [36, 37] and to study the protective role of dietary resveratrol, focusing on changes in mitochondrial functioning, inflammatory processes, and Wnt pathway.

Methods

Animals

During the initial holding period, male SAMP8 had ad libitum access to a standard chow diet (2018 Teklad Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Teklad, Madison, WI, USA) and tap water up to 6 weeks of age,

at which time mice were randomized into three diet groups ($n=10$) in which the mice were fed either a standard AIN-93G diet (normal diet (ND): carbohydrate/protein/fat ratio of 64:19:17 % of kcal) or an HF diet consisting of an AIN-93G diet modified to provide 60 % of calories from fat (HF: carbohydrate/protein/fat ratio of 16:23:61 %). Resveratrol was added to the HF (1 g/kg *w/w*) that was formulated to provide daily doses of approximately 160 mg/kg to the mice (SAMP8-HF + RV). Mice were treated according to European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedures established by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya, Spain. Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals that were administered resveratrol.

Glucose Curve

Intraperitoneal (i.p.) glucose tolerance test was performed following 8 weeks of HF diet feeding, as described previously [38]. In brief, mice were fasted overnight for 16 h. The test was performed in a quiet room, preheated to +30 °C. The tip of the mouse's tail was cut with the heparin-soaked (Heparina Rovi, 5000 IU/mL; Rovi S.A., Madrid, Spain) scissors, 30 min prior to 1 g/kg i.p. glucose injection (diluted in H₂O). Blood glucose levels were measured at 0, 5, 15, 30, 60, and 120 min after the glucose injection with the Ascensia ELITE blood glucose meter (Bayer Diagnostics Europe, Ltd., Dublin, Ireland).

Novel Object Recognition Test

The test was conducted in a 90°, two-arm, 25-cm-long, 20-cm-high maze [39]. Light intensity in the middle of the field was 30 lx. The objects to be discriminated were plastic figures (object A, 5.25 cm high, and object B, 4.75 cm high). First, mice were individually habituated to the apparatus for 10 min for 3 days. On day 4, they were submitted to a 10-min acquisition trial (first trial), during which they were placed in the maze in the presence of two identical novel objects (A + A or B + B) placed at the end of each arm. A 10-min retention trial (second trial) occurred 2 h later. During this second trial, objects A and B were placed in the maze, and the times that the animal took to explore the new object (t_n) and the old object (t_o) were recorded. A discrimination index (DI) was defined as $(t_n - t_o) / (t_n + t_o)$. In order to avoid object preference biases, objects A and B were counterbalanced so that one half of the animals in each experimental group were first exposed to object A and then to object B, whereas the other one half first saw object B and then object A was presented. The maze, the surface, and the objects were cleaned with 96° ethanol between the animals' trials so as to eliminate olfactory cues.

Morris Water Maze Test

An open circular pool (100 cm in diameter, 50 cm in height) was filled halfway with water [40], and water temperature was maintained at 22 ± 1 °C. Two principal perpendicular axes were defined; thus, the water surface was divided into four quadrants (NE, SE, SW, and NW), and five starting points were set (NE, E, SE, S, and SW). Four visual clues were placed on the walls of the tank (N, E, S, and W). Non-toxic white latex paint was added to make the water opaque, and a white escape platform was submerged 1 cm below the water level (approximately in the middle of one of the quadrants).

The animal's swimming paths were recorded by a video camera mounted above the center of the pool, and the data were analyzed with SMART® ver. 3.0 statistical software. The learning phase consisted of 6 days of trials for each mouse. The animals were submitted to five trials each day starting from the positions set (in random order) and without a resting phase between each trial and the subsequent one. At each trial, the mouse was placed gently into the water, facing the wall of the pool, and allowed to swim for 60 s. If not able to locate the platform in this period of time, the mouse was guided to the platform by the investigator. Animals were left on the platform each time for 30 s in order to allow spatial orientation.

The parameters measured were latency time in finding the platform, time spent in each quadrant, and distance swum for each trial; the mean was calculated for each trial day. A memory test was performed at the end of the learning days, in which the platform was removed and the time spent by each mouse in each quadrant was measured.

Elevated Plus Maze Test

This test is used to assess anxiety [41]. The basic measurement is the animal's preference for dark, enclosed over bright, exposed places. The animal is placed in the center of the apparatus and observed for a set time. Measurements include total time spent in open and closed arms (and central platform), as well as entries into open and closed arms. Each mouse was individually placed at the center of the maze facing one of the enclosed arms and allowed to explore the maze freely during a 5-min observation period. Maze performance was video-recorded for later analysis. Time spent in open arms and numbers of arm entries were analyzed as indices of emotional behavior utilizing SMART® ver. 3.0 (PanLab, SLU, Spain).

Open-Field Test

Open-field (OF) test apparatus was constructed of white plywood (50 × 50 × 25 cm) [42]. Red lines were drawn on dividing the floor into 25-cm squares. Behavior was scored with SMART® ver. 3.0 software, and each trial was recorded for later analysis, utilizing a camera fixed to the ceiling at a height

of 2.1 m situated above the apparatus. Mice were placed at the center, or at one of the four corners, of the open field and allowed to explore the apparatus for 5 min. After the 5-min test, the mice were returned to their home cages and the open field was cleaned with 70 % ethyl alcohol and allowed to dry between tests. To assess the animal's habituation process to the novelty of the arena, the mice were exposed to the apparatus for 5 min on two consecutive days. The behaviors scored included line crossing, center entries, center stay duration, rearing, defecation, and urination. Each animal was then given a score for total locomotor activity, which was calculated as the sum of total distance, line crosses, and number of rears.

Three-Chamber Socializing and Social Novelty Test

The three-chamber socializing and social novelty test (TCST) allows for studying cognition and general sociability (time spent with rodents) and social novelty (time spent with a novel intruder in contrast with a familiar one) [43]. In brief, the TCST identifies mice with changes in sociability and social novelty. Testing took place in two sessions within a three-chambered box (15 × 15 × 20 cm) with openings among the chambers. After a 5-min period of adaptation to the empty box, the mice encounter a never-before-met intruder under one pencil cup and an empty pencil cup in the "sociability" session. The subject then encounters the first intruder, as well as a second, never-before-met intruder under another pencil cup in the "social novelty" session. Time spent sniffing each pencil cup, time spent in each chamber, and number of entries into each chamber were measured.

Brain Isolation and Western Blot Analysis

Mice were euthanized 1 day after the last trial was conducted, and brain quickly removed from the skull. The hippocampus was dissected and frozen in powdered dry ice and maintained at -80 °C for further use. Tissue samples were homogenized in lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitors (Cocktail II, Sigma), and cytosol and nuclear fractions were obtained as described elsewhere. Protein concentration was determined by the Bradford method. Twenty micrograms of protein was separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (8–15 %) and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5 % non-fat milk in Tris-buffered saline containing 0.1 % Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4 °C with primary antibodies diluted in TBS-T and 5 % bovine serum albumin (BSA) as follows: oxidative phosphorylation (OXPHOS) cocktail (1:500, MitoSciences), voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) (1:1000, Abcam), total glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) (1:1000, Cell Signaling), p-Y216 GSK3 β (1:1000, Cell

Signaling), superoxide dismutase 1 (SOD1) (1:1000, Calbiochem), axin1 (1:1000, Cell Signaling), disheveled 3 (Dvl3) (1:1000 Cell Signaling), Dickkopf1 (1:500, Santa Cruz), β -catenin ABC (1:1000, Millipore), mitofusin 2 (1:1000, Millipore), OPA1 (1:1000, BD Transduction Laboratories), DRP1 (1:1000, Abcam), pT205 Tau (1:1000, Invitrogen), pSer306 Tau (1:1000, Invitrogen), pSer404 Tau (1:1000, Invitrogen), and GAPDH (1:2000, Millipore). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive proteins were visualized utilizing an enhanced chemiluminescence-based detection kit (ECL kit; Millipore), and digital images were acquired employing a ChemiDoc XRS+ system (BioRad). Band intensities were quantified by densitometric analysis using Image Lab software (BioRad), and values were normalized to GAPDH.

Brain Processing for Ultrastructural Observation on Transmission Electron Microscopy

To determine whether mitochondrial morphology was altered in mice fed with high-fat diet and high-fat diet plus resveratrol, we performed transmission electron microscopy in dentate gyrus from SAMP8 mice. The animals were anesthetized i.p. with 80 mg/kg of sodium pentobarbital and perfused intracardially with 50 mL of saline solution followed by 50 mL of p-formaldehyde (PF, Sigma-Aldrich) at 2 % in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Coronal brain sections 100 μ m in thickness were obtained with a vibratome. Sections were post-fixed with 2.5 % glutaraldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS. The samples were treated with 1 % osmium tetroxide (OsO₄) containing potassium ferricyanide for 1 h at 4 °C, dehydrated in acetone at 4 °C, and finally embedded in Spar varnish. Semi-thin sections (1 μ m thick) were obtained, and after methylene blue staining, dentate gyrus regions were localized. Ultra-thin sections (55 nm in thickness) were obtained using a Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome and a diamond knife (Diatome, Switzerland), and the sections were then placed onto gold grids and post-stained with uranyl acetate and lead citrate. Ultra-thin sections were examined using a JEM-1010 transmission electron microscope operated at an accelerating voltage of 80 kV. The images were obtained using a Bioscan 792 camera (Gatan, Inc., Pleasanton, CA, USA).

RNA Extraction and Gene Expression Determination

Total RNA isolation was carried out by means of Trizol reagent following the manufacturer's instructions. RNA content in the samples was measured at 260 nm, and sample purity was determined by the A260/280 ratio in a NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Samples were also tested in an Agilent 2100B Bioanalyzer (Agilent Technologies) to determine the RNA integrity number. Reverse transcription-

polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as follows: 2 µg of messenger RNA (mRNA) was reverse-transcribed using the High Capacity complementary DNA (cDNA) Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (qPCR) was utilized to quantify the mRNA expression of inflammatory genes interleukin 6 (*IL-6*) and tumor necrosis factor alpha (*TNF-α*). Normalization of expression levels was performed with actin for SYBER Green. The primers were as follows: for *IL-6*, forward 5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' and reverse TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT; for *TNF-α*, forward 5'-TCGGGGTGATCGGTCCCAA-3' and reverse 5'-TGGTTTGCTACGACGTGGGCT-3'; and for actin, forward 5'-CAACGAGCGGTTCCGAT-3' and reverse 5'-GCCACAGGTTCCATACCCA-3'.

Real-time PCR was performed on the Step One Plus Detection System (Applied Biosystems) employing the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Each reaction mixture contained 7.5 µL of cDNA, whose concentration was 2 µg, 0.75 µL of each primer (whose concentration was 100 nM), and 7.5 µL of SYBR Green PCR Master Mix (2×).

Data were analyzed utilizing the comparative cycle threshold (Ct) method ($\Delta\Delta Ct$), where the actin transcript level was utilized to normalize differences in sample loading and preparation. Each sample ($n=4-5$) was analyzed in triplicate, and the results represented the n -fold difference of transcript levels among different samples.

Statistical Analysis

Data are expressed as means ± standard error of the mean (SEM). The trapezoidal rule was used to determine area under the curve (AUC). The level of statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA) and Tukey post hoc test. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Metabolic Changes Induced by High-Fat Diet and Resveratrol: Glucose Tolerance Tests

SAMP8-HF mice exhibited progressive increase in body weight up to 15 weeks, higher than control mice at parallel time points (Fig. 1a), this correlating with caloric intake (Fig. 1b). Consistent with previous reports, persistent high blood glucose levels between 20 and 90 min of the glucose tolerance test at 15 weeks post-HF treatment in SAMP8 mice (Fig. 1c). When resveratrol was added to HF, no changes in weight and caloric intake were observed, but a partial reversion in glucose tolerance was observed (Fig. 1c), with a significant decrease in glucose AUC found (Fig. 1d).

Behavioral and Psychoemotional Results

In the novel object recognition test (NORT), we found that SAMP8-HF mice had a lower DI than SAMP8 mice, revealing significant impairments in this task (Fig. 2) induced by metabolic stress. Resveratrol-treated SAMP8 showed significant preference for the novel object than for the old one, indicating the preventive role of resveratrol in memory loss.

Results obtained in the Morris water maze (MWM) test revealed that all animal groups were able to learn during the trial days prior to the test, reducing time of latency to platform by 50 % (Fig. 3a–c). A slight, but significant, impairment was induced by HF in SAMP8 in reference to ND, indicated by a lower distance swum and a reduced number of entries into the platform zone. Observing the results exhibited by SAMP8-HF + RV, an improvement in all parameters measured was determined in reference to SAMP8-HF mice, with increases in time and distance swum and entries into the platform quadrant (Fig. 3d). Moreover, a reduction in border-time swimming has been determined, indicative of less anxious behavior (Fig. 3e). This corroborated the elevated plus maze (EPM) test, where significant reductions in time spent in closed arms were found in HF groups, with a higher ratio in resveratrol-treated animals (Fig. 4a). Other parameters analyzed in EPM demonstrated scarce changes induced by HF or by the addition of resveratrol to the diet. Changes in this test can be associated with motor and locomotion differences among groups (Fig. 4b, c). Results from OF test showed no significant changes in motor activity (Fig. 5a), but HF + RV mice presented lower number of rears, which also indicated less anxiety gated to fear behavior (Fig. 5b).

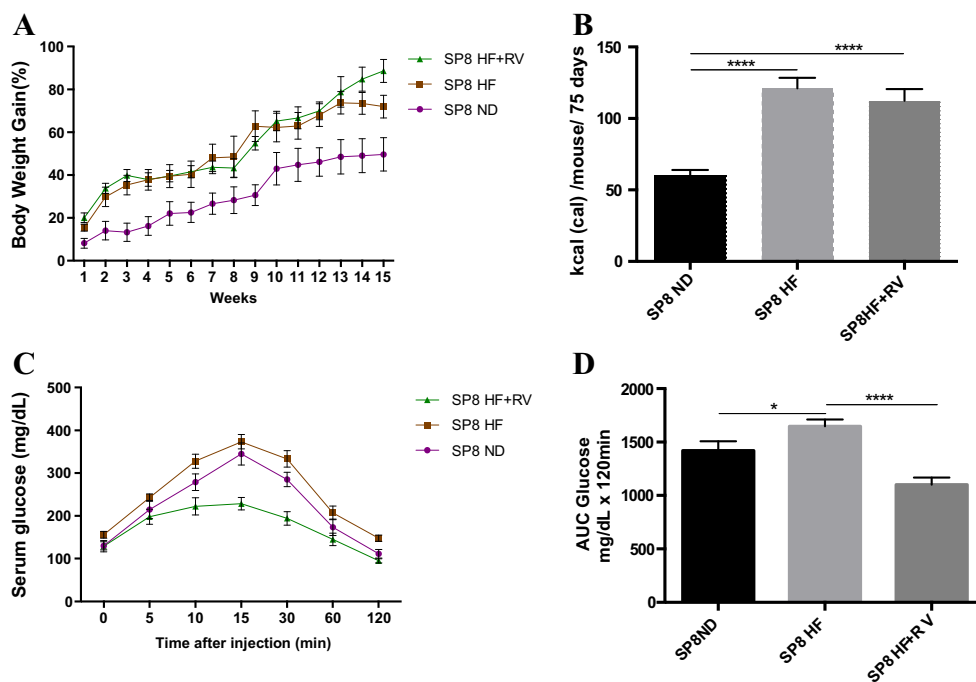
The TCST was employed to study working and social memory. Results demonstrated that HF did not induce changes in social behavior in reference to ND and that resveratrol did not modify any analyzed parameters (data not shown).

High-Fat Diet Induced Changes in Oxidative Markers, Mitochondrial Function, and Wnt Pathway: Effects of Resveratrol

HF induces a significant increase in the gene expression of inflammatory cytokines *TNF-α* and in *IL-6*, which were prevented by a resveratrol-enriched diet (Fig. 6a, b). Also, significant changes in SOD1 were determined in HF-fed mice, $p < 0.001$ (Fig. 6c).

Regulatory axis AMPK-PGC1α-Sirt1 was explored. Sirt1 and PGC1α protein levels were not significantly modified by HF or HF + RV (Fig. 6d–e), although a slight increase was observed for PGC1α. By contrast, HF-reduced pAMPK activation and resveratrol-fed SAMP8-HF showed a degree of activation similar to SAMP8-ND (Fig. 6f). To demonstrate that HF plays a key role in the functionality of mitochondria, OXPHOS chain was studied by Western blot (Fig. 7a).

Fig. 1 Results of body weight, caloric intake, and glucose test in senescence-accelerated prone mouse (SP8). **a** Body weights of mice fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). **b** Average caloric intake per mouse with SP8 ND, HF, and HF + RV. **c** Plasma levels of glucose 1 g/kg intraperitoneal (i.p.) administration. **d** Glucose area under the curve (AUC) after 2-h glucose injection. Data represented observed mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=9$ for each group). * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.0001$



Analysis revealed that SAMP8-HF mice presented significant changes in protein levels in the complex I-NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8 (NDUFB8), $p<0.01$, complex II-succinate dehydrogenase (SDNB), $p<0.05$, and complex IV-MTCQ1 cytochrome c oxidase subunit I, $p<0.001$, indicating HF-induced modifications in the mitochondrial respiratory chain, which can partially explain the increase in OS parameters. The resveratrol-enriched diet significantly increased these mitochondrial complexes and, in addition, increased protein levels in complex V-ATPase, $p<0.001$ (Fig. 7b–f).

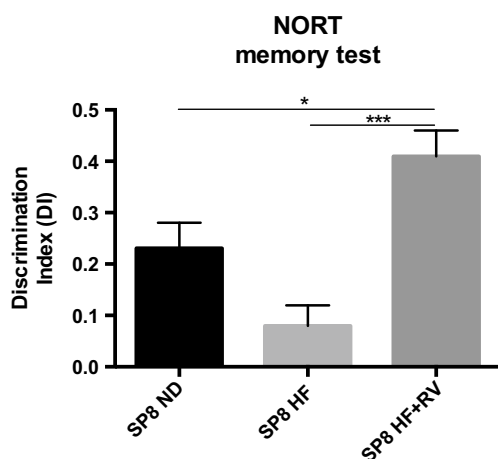


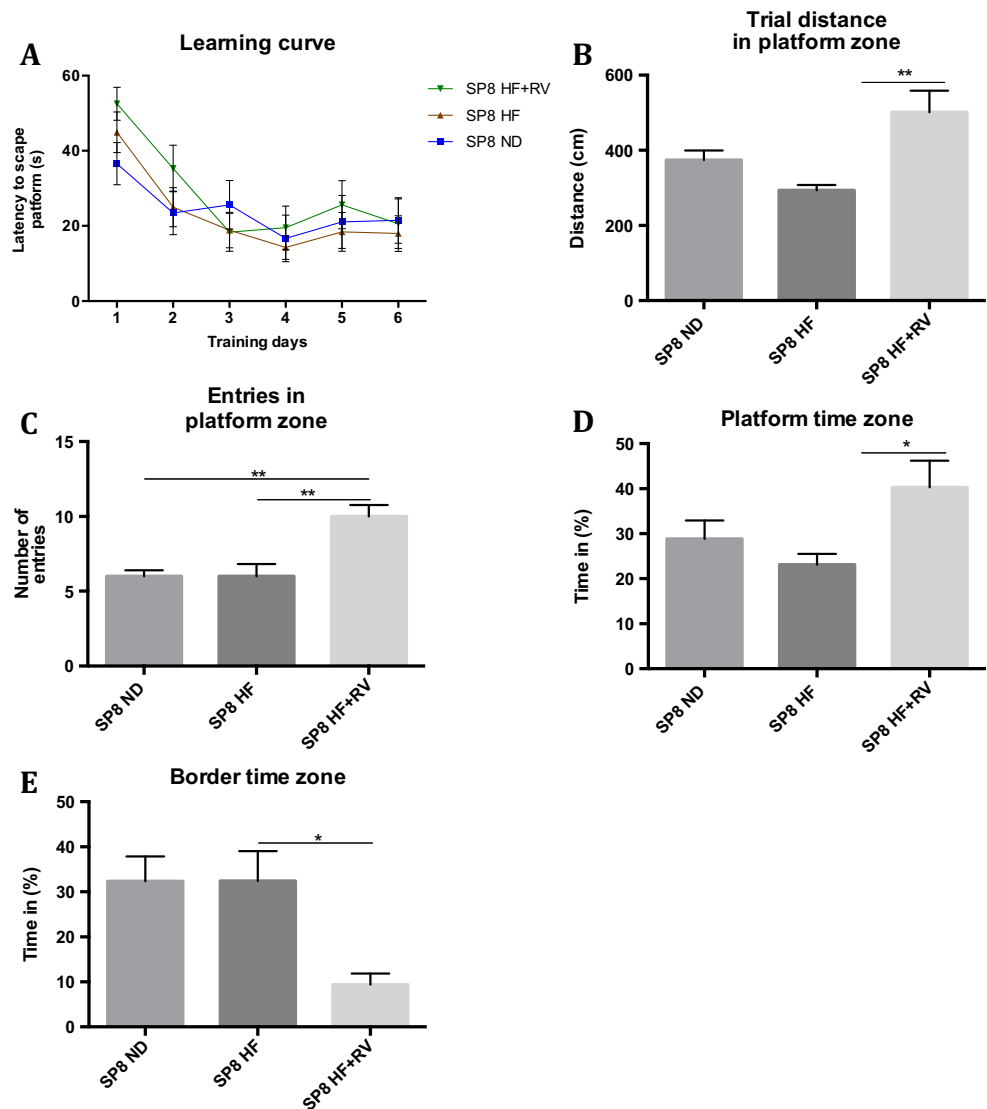
Fig. 2 Results of discrimination index (DI) of novel object recognition test (NORT) in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Data represented observed mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=9$ for each group). * $p<0.05$; *** $p<0.001$

Fusion and fission processes are implicated in mitochondrial efficiency in the cell. We found that the fusion marker, DRP1, did not change along groups (Fig. 8a), OPA1 protein levels diminished in SAMP8-HF mice ($p<0.01$), whereas fission MFN2 protein levels increased in SAMP8-HF mice in reference to SAMP8-ND ($p<0.0001$). Resveratrol-fed animals reversed the decrease in OPA1 ($p<0.01$) and increased the MFN2 levels induced by HF ($p<0.001$) (Fig. 8b, c). Electronic microscopy showed small and round-shaped mitochondria in SAMP8-HF mice in contrast with SAMP8-HF + RV samples (Fig. 9a, b). In addition, an increase in large mitochondria number after animals were treated with resveratrol was determined (Fig. 9c) and reinforced by changes in (VDAC1-porin) protein expression (Fig. 9d).

Participation of Wnt Pathway in the Resveratrol Effect After Metabolic Stress Due to High-Fat Diet

The canonical Wnt/ β -catenin pathway has an important role in neuroprotection. HF was able to increase protein expression of Wnt receptor components, such as LRP6 and in proteins participating in complexes regulated by activation of Wnt mediators, such as axin1, Dvl3, or GSK3 β in SAMP8 mice (Fig. 10a–d). Other participants in Wnt pathway, such as Wnt3a or Naked2, did not modify protein expression (data no shown). In addition, a significant increase in Dickkopf1 (DKK), antagonist of Wnt pathway, was determined in SAMP8-HF (Fig. 10e). The main target of the activation of this β -catenin pathway was found activated in SAMP8-HF + RV ($p<0.05$),

Fig. 3 Results of spatial learning and memory in the Morris water maze (MWM) test in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). **a** Escape latency time to reach the hidden platform during training days. **b** Trail distance in platform zone during 60-s probe trial of MWM test. **c** Number of entries in platform zone during 60-s probe trial of MWM test. **d** Time spent in platform zone during 60-s probe trial of MWM test. **e** Time spent in zone border during 60-s probe trial of MWM test. Data represented as observed mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=9$ for each group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$



accordingly with reduction in GSK3 β (Fig. 10d) but significantly diminished in SAMP8-HF, $p < 0.01$ (Fig. 10f).

Other targets of GSK3 β comprise tau protein phosphorylation. In our experimental model, a significant increase in the degree of phosphorylation in several tau epitopes (Ser⁴⁰⁴, Tyr²⁰⁵, and Ser³⁹⁶ residues) was found in SAMP8-HF. Hyperphosphorylation was significantly prevented in SAMP8-HF + RV mice (Fig. 11a–d).

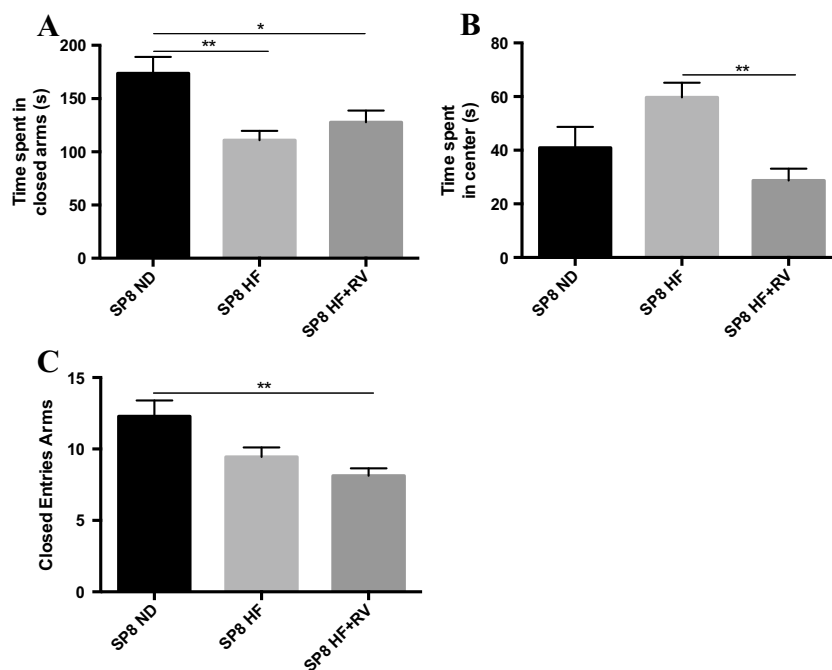
Discussion

Growing evidence supports a link among diabetes, cognitive dysfunction, and aging [44]. Moreover, metabolic mechanism of AD has emerged in recent years [45]. A high level of fat in the diet (60 %) has been demonstrated to induce significant liver and heart alterations and impairment of metabolism in

mice [46, 47]. A HF increased AD pathology in 9 months in a 3xTg-AD mouse fed with 35 % fat with low polyunsaturated fatty acids [48]. It is also demonstrated that diabetes leads neurons into metabolic stress. To this respect, experimental induction of diabetes by HF or streptozotocin resulted in the development of cognitive deficits and in increases in glial fibrillary acidic protein, protein glycation, and amyloid beta in models of senescence or AD [11, 34, 49]. These and other data suggest that aberrant glucose metabolism potentiates the aging phenotype and contributes to early damage central nervous system.

SAMP8 is a mouse strain with a senescence-related cognitive impairment used as a model of sporadicAD [19, 32, 50] with proven alterations in metabolic processes [19, 35]. For example, Mehla et al. [34] demonstrated relationship between glucose metabolism impairment and learning deficits in SAMP8.

Fig. 4 Results of elevated plus maze (EPM) test in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). **a** Time spent in closed arms. **b** Time spent in center. **c** Closed entries into arms. Data represented as observed mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=9$ for each group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



SAMP8-HF mice were conducted to insulin resistance, glucose intolerance, and then to metabolic stress conditions, in a similar way to that shown by previous works [34]. Moreover, here we demonstrate impairment in cognitive scores in SAMP8-HF, in line with the findings reported previously in this paper, under similar metabolic stress conditions in mice, compared with SAMP8. Moreover, a significant preventive effect in cognitive impairment exhibited by SAMP8-HF in resveratrol-treated animals was demonstrated. Increase in DI in NORT and results in the MWM demonstrated an improvement in hippocampal cognition capabilities when animals were fed with HF + RV and that these were lost after HF diet. Furthermore, resveratrol improved learning and memory beyond the scores of SAMP8 fed with ND.

Growing evidences demonstrated that metabolic stress altered biogenesis fusion-fission processes in aging and in

neurodegenerative disorders such as AD, Parkinson's disease, Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. Mitochondrial dynamics properties, such as mitochondrial fission/fusion, trafficking, or biogenesis, play a key role in neuronal function and survival. Enhanced fission causes abnormal mitochondrial organelles that are removed by autophagic processes, while fusion leads to a decrease in mitochondrial number and the formation of larger and round mitochondria, favoring the production of mitochondria energy efficacy. Mitochondrial fusion is tightly regulated by proteins such as OPA1, MFN1, and MFN2, and fission machinery is formed by proteins FIS1 and DRP1. The imbalance between these two processes is critical for mitochondrial function. In neurodegenerative conditions as AD but also in chronological aging, changes in fusion/fission imbalance were reported [18, 51].

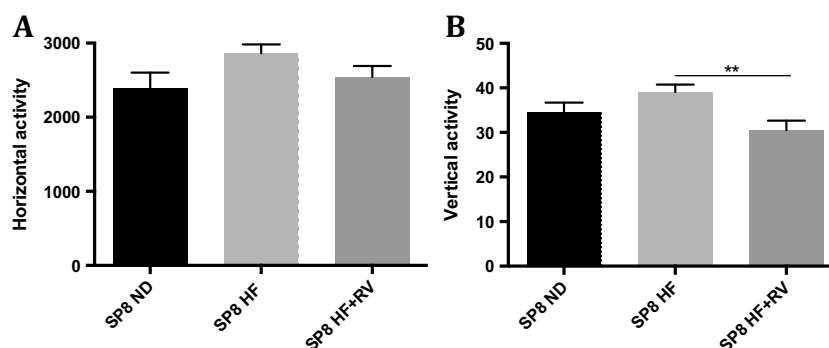


Fig. 5 Results of open-field test (OFT) in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). **a** Horizontal activity

(cm). **b** Vertical activity (number of rears). Data represented observed mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=9$ for each group). ** $p < 0.01$

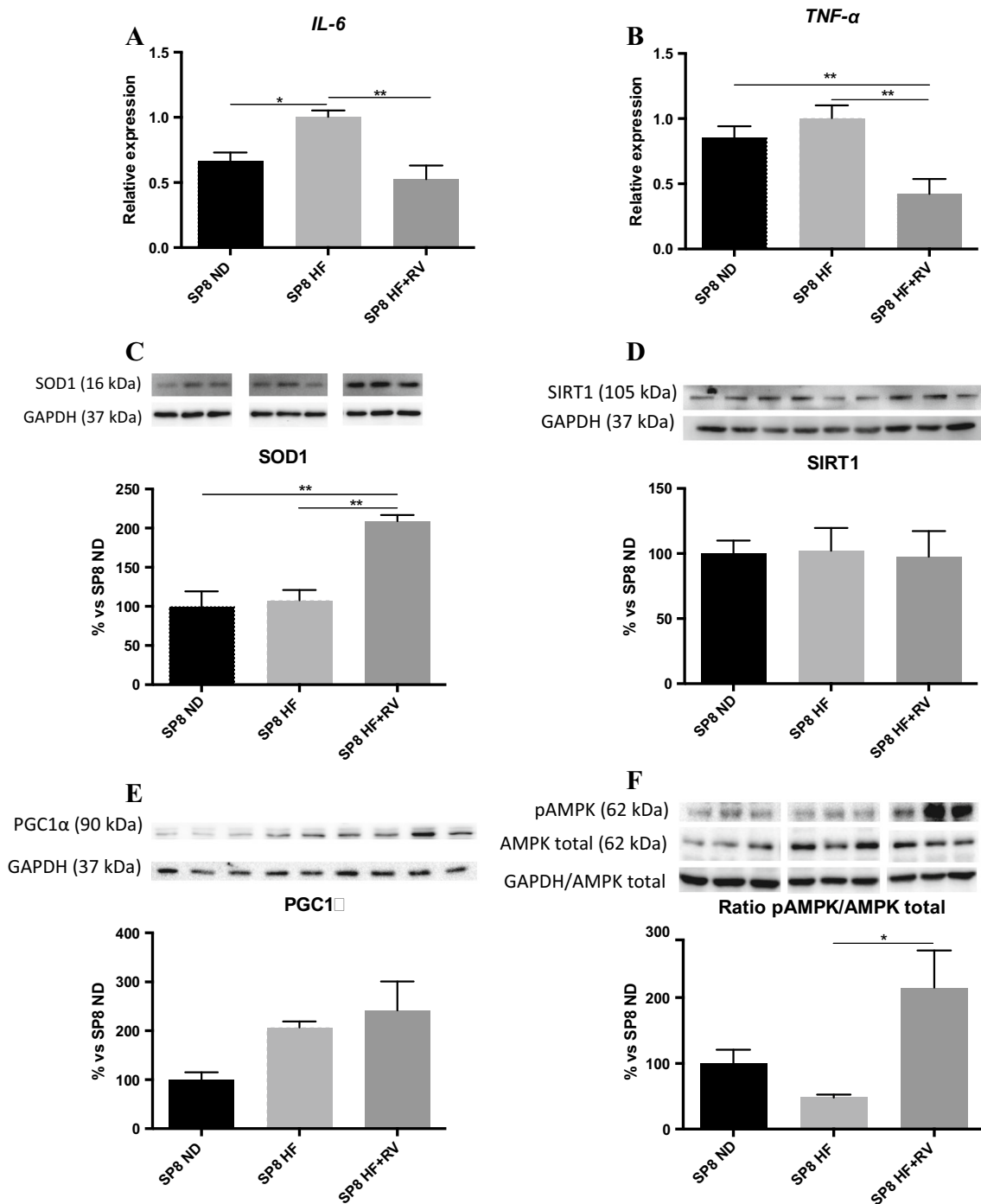


Fig. 6 Representative Western blot and quantifications for pro-inflammatory gene expression for **a** interleukin-6 (IL-6) and **b** tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Gene expression levels

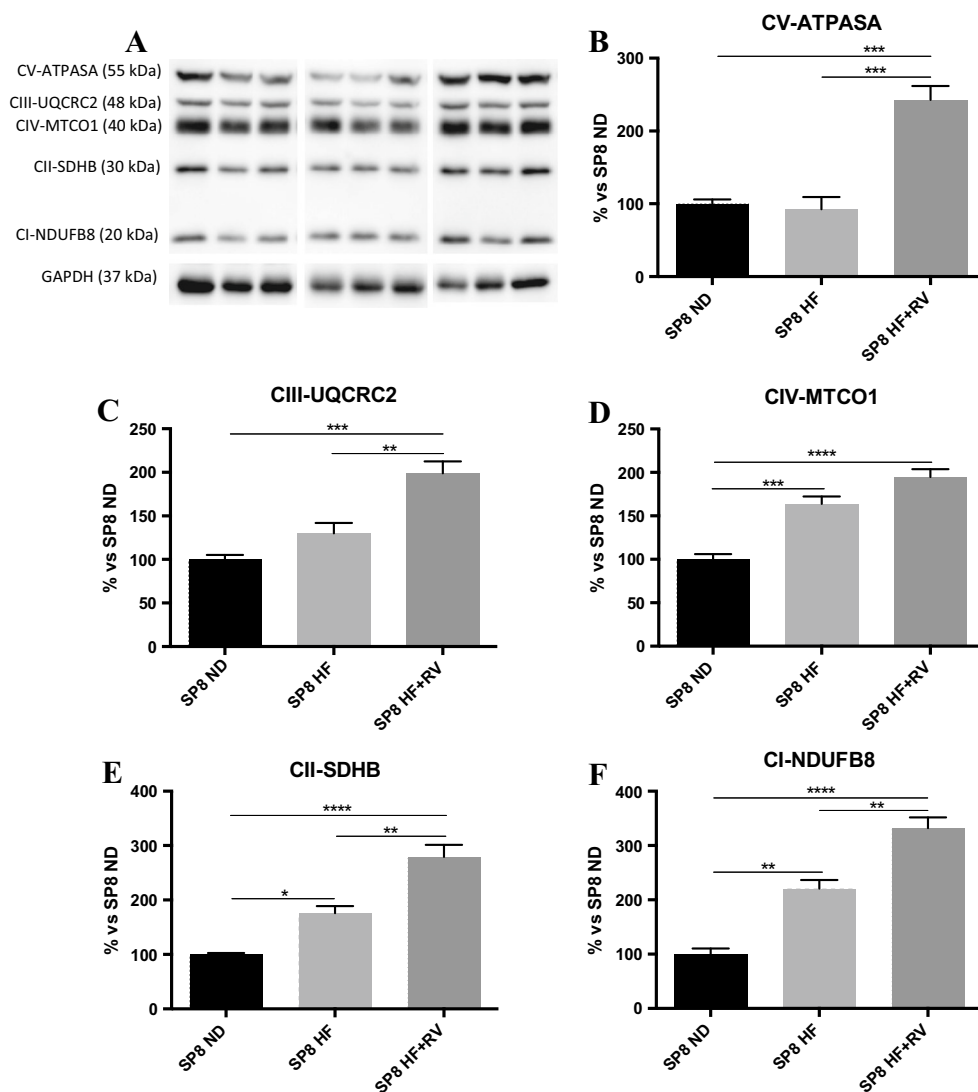
were determined by real-time PCR. **c** SOD1, **d** Sirt 1, **e** PGC- α , and **f** pAMPK/total AMPK, in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Mean \pm standard error of the mean (SEM) performed in triplicate are represented. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

We found that metabolic stress in SAMP8-HF changed the expression of OPA1 and MFN2 but that it did not induce any variation in DRP1. Reduced expression of OPA1 by HF mimics what occurs in patients with AD, whereas increases in MFN2 were a differential hallmark found in our hands in

SAMP8-HF. Resveratrol added to the HF diet increases both in OPA1 and MFN2, thus indicating a potentiation in fusion processes after resveratrol treatment.

Electronic microscopy showed significant differences in mitochondrial number and morphology between SAMP8-

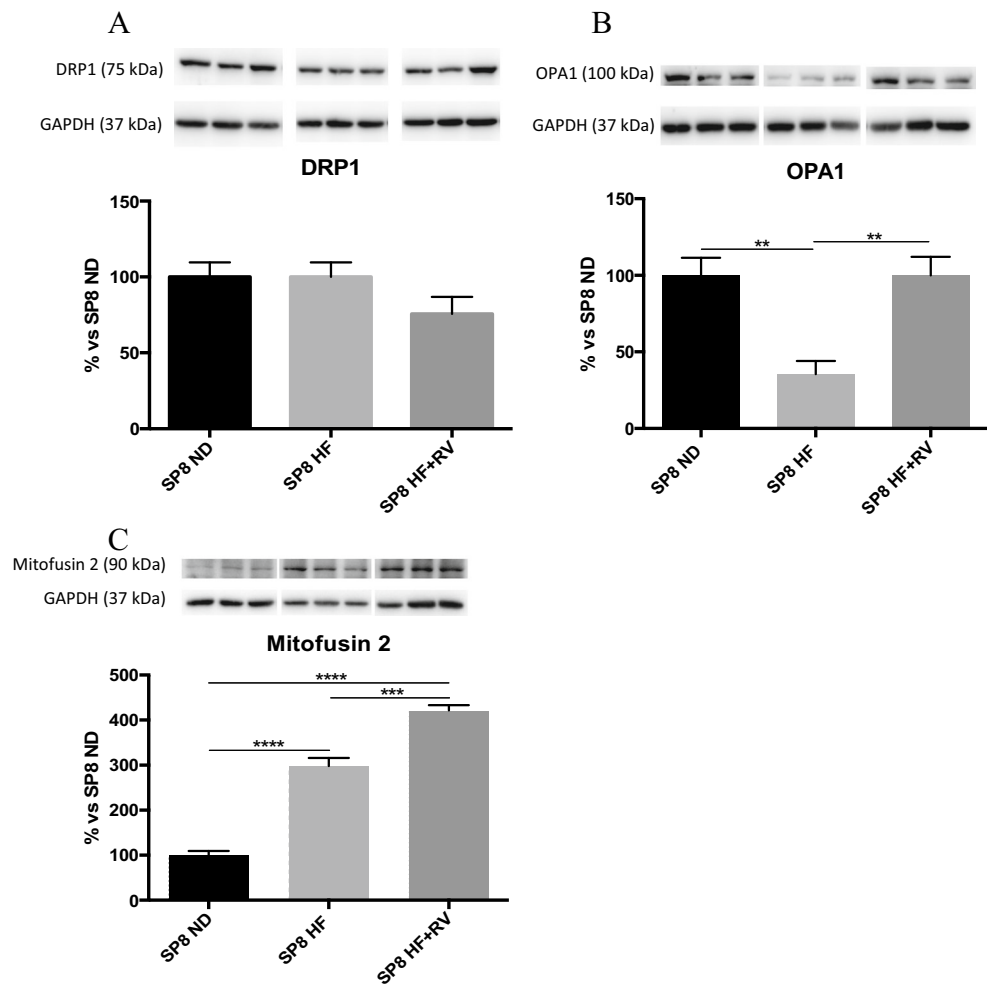
Fig. 7 **a** Representative Western blot for oxidative phosphorylation (OXPHOS) and quantifications for **b** CV-ATPASA, **c** CIII-UQCRC2, **d** CIV-MTCO1, **e** CII-SDHB, and **f** CI-NDUFB8 in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM), and values are adjusted to 100 % for SAMP8 levels with ND. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$



HF and mice treated with resveratrol. In the imaging analysis, we can observe a higher number of small mitochondria in SAMP8-HF than in SAMP8-HF + RV, indicating increases in fusion processes. Accordingly, significant increases in I-NDUFB8, II-SDNB, III-UQCRC2, and V-ATPase complexes were found in resveratrol-treated animals, and in addition, IV-MTCO1 complex was elevated in reference to the control diet, stressing the protective role of resveratrol in mitochondrial functioning. Moreover, SAMP8-HF presented a significant diminution in VDAC1-porin protein expression, indicating a reduction in the mitochondrial biogenesis process. VDCA1-porin belongs to a family of the most abundant proteins in the outer mitochondrial membrane and participates in the transport pathway of numerous metabolites but, in addition is considered, jointly with PGC1 α , as a marker of mitochondrial biogenesis [13]. After a resveratrol-enriched diet, VDAC1-porin levels returned to those of control diet-fed SAMP8, according to an increase in biogenesis activation observed by

electronic microscopy and the increase in OXPHOS capabilities in resveratrol-treated animals. Lagouge and colleagues [52], demonstrated that resveratrol rendered an increase in mitochondrial biogenesis in peripheral tissues from HF-fed mice. The beneficial effects of resveratrol on cognitive impairment are described elsewhere [30, 31] and are nearly, in part, mediated by the Sirt1-PGC1 α -AMPK axis [53]. However, controversy exists because resveratrol activity appears to be dependent on experimental system and tissue; for example, Menzies et al. [54] demonstrated that resveratrol augments mitochondrial mass and complex V content, increasing AMPK activation and Sirt1 protein levels but without PGC1 α modification. We did not find changes in the protein expression of PGC1 α , nor in Sirt1, but AMPK activation was induced in resveratrol-treated animals, as well as changes in mitochondrial dynamics and accordingly the evident and strong changes induced by this polyphenol in the behavior of SAMP8-HF. These molecular and behavior changes found

Fig. 8 Representative Western blot and quantifications for **a** DRP1, **b** OPA, and **c** mitofusin 2 in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM), and values are adjusted to 100 % for SAMP8 levels with ND. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$



in our model fostered the beneficial effects of resveratrol in brain function under metabolic stress.

As is known, impaired energy production by mitochondrion is accompanied by an increase in ROS production, and when a metabolic stress is present, it can be prevented by using a potent antioxidant such as resveratrol. In fact, gene expression experiments demonstrate that resveratrol reduced *IL-6* and *TNF- α* levels in SAMP8-HF treated with resveratrol, jointly with changes in the protein levels of SOD1. Slight, although not significant, increases in *IL-6* and *TNF- α* were observed in SAMP8-HF in reference to SAMP8-ND, indicating that the metabolic stress induced by HF employed was moderate but sufficiently sustained, as a hormetic mechanism, to induce changes in behavior parameters, mitochondrial biogenesis, and function.

It is described that *TNF- α* acts closely with Wnt pathway to control a number of cellular functions, from bone to hematopoiesis [55–57]. Wnt signaling is an important pathway in neurogenesis and in cancer processes, but also in neuroprotection [58]. Because *TNF- α* gene expression levels changed under HF, we delved deeper into altered cellular processes

after the occurrence of this metabolic stress by performing screening in the protein levels of different Wnt signaling elements.

Wnt pathway regulation has been the object of growing interest, aside from its pivotal role in neurogenesis and cancer processes, in neuroprotective participation and its possible importance as a possible target for developing drugs against neurodegenerative diseases ([27, 58]). The canonical Wnt/ β -catenin pathway requires a co-receptor from proteins belonging to the low-density lipoprotein receptor (LDLR) family, such as LRP5 and LRP6. Upon stimulation with Wnt, LRP6 is phosphorylated by kinases such as GSK3 β and subsequently recruitment of axin to the membrane. In the absence or inhibition of Wnt stimulation, activation of GSK3 β prompted degradation of β -catenin (for review, see [59]).

Wnt pathway-specific disturbances in SAMP8 brain have been showed [60]. Here, we demonstrated a significant diminution in active β -catenin in SAMP8-HF, indicating an effective inhibition of Wnt pathway in SAMP8 under metabolic stress. The role of resveratrol in cancer and proliferative cell

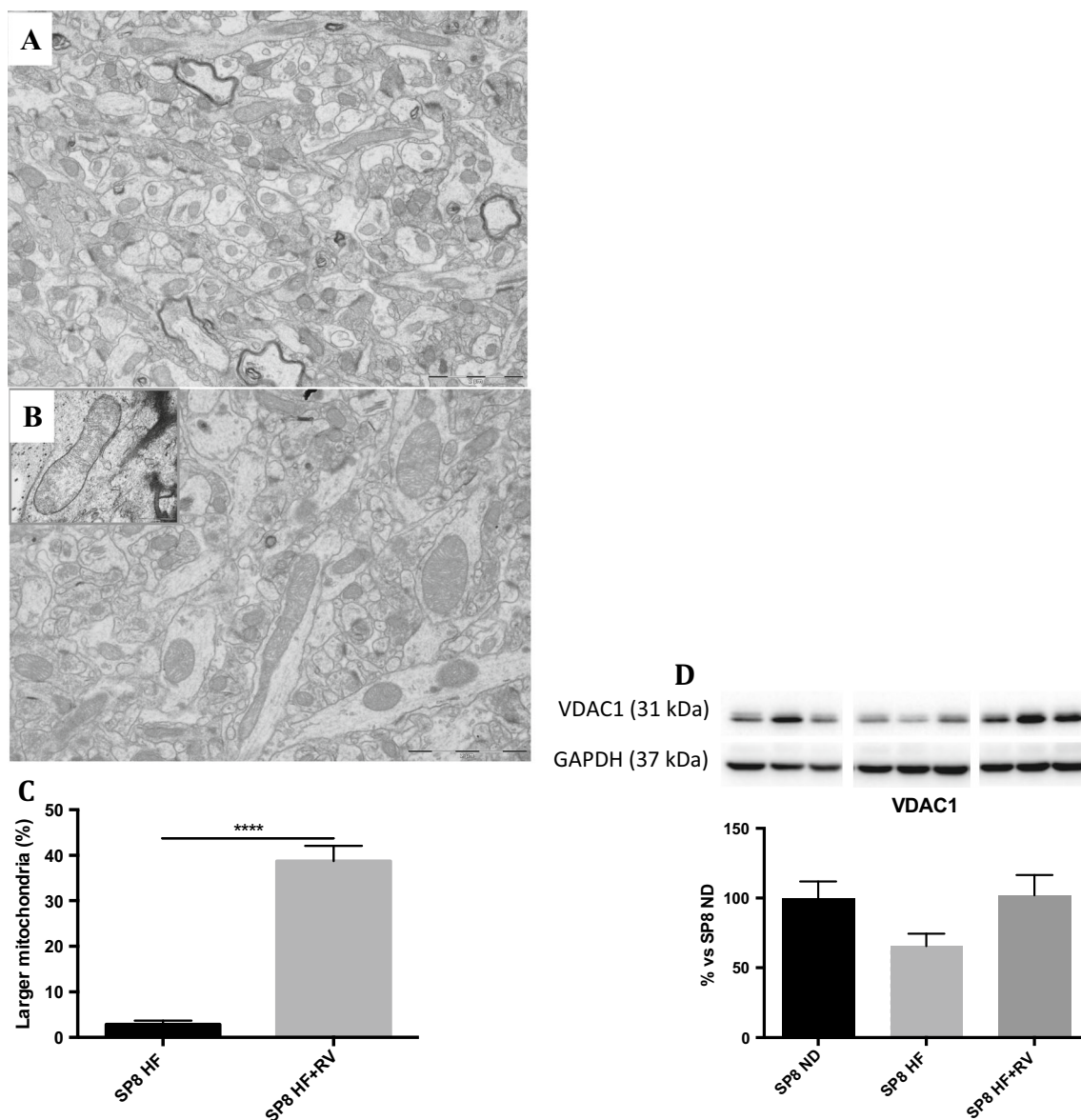


Fig. 9 Electron microscopy images of mitochondria in dentate gyrus of senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) fed with **a** high-fat diet (SP8 HF), *scale bar* 2- μ m, or **b** high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Close examination reveals increased numbers of rounded and small mitochondria in SAMP8 with HF diet. Mitochondria are larger in SAMP8

with HF + RV. *Scale bar* 2 μ m and 500 nm (inset). **c** Bar chart showing relative larger mitochondria content. **d** Representative Western blot and quantifications for VDAC1. *Bars* represent mean \pm standard error of the mean (SEM), and values are adjusted to 100 % for SAMP8 levels with ND. * p < 0.05

mechanisms by inhibiting Wnt pathway has been widely described [61–64]. In our hands, resveratrol is able to recover Wnt system by inducing changes in axin1, Dvl3, and GSK3 β expression and most important increasing active β -catenin levels in SAMP8-HF. The recovery of the β -catenin active form in hippocampus by resveratrol demonstrated a new beneficial role of this polyphenol in brain, through Wnt pathway regulation. Activation of β -catenin by resveratrol can explain also the decrease in *TNF- α* and *IL-6* expression; therefore, this indirect antioxidant effect, through Wnt activation, could play a key role in mitochondrial functioning and neuronal health, as demonstrated by the recovery of some cognitive function in

SAMP8-HF + RV. Conversely, resveratrol also slightly increased DKK, a known inhibitor of Wnt; this can be explained as due to that Wnt signaling can promote the expression of several Wnt pathway components, including Fz, LRP5/6, DKK, or axin [65].

The neuroprotective role of resveratrol treatment of metabolically stressed SAMP8 was also demonstrated by an inhibition in GSK3 β kinase activity and reduced tau hyperphosphorylation and increased total microtubule-associated protein (MAP). Although APP cascades are related with OS as well as with tau hyperphosphorylation, we did not find changes in the amyloid precursor

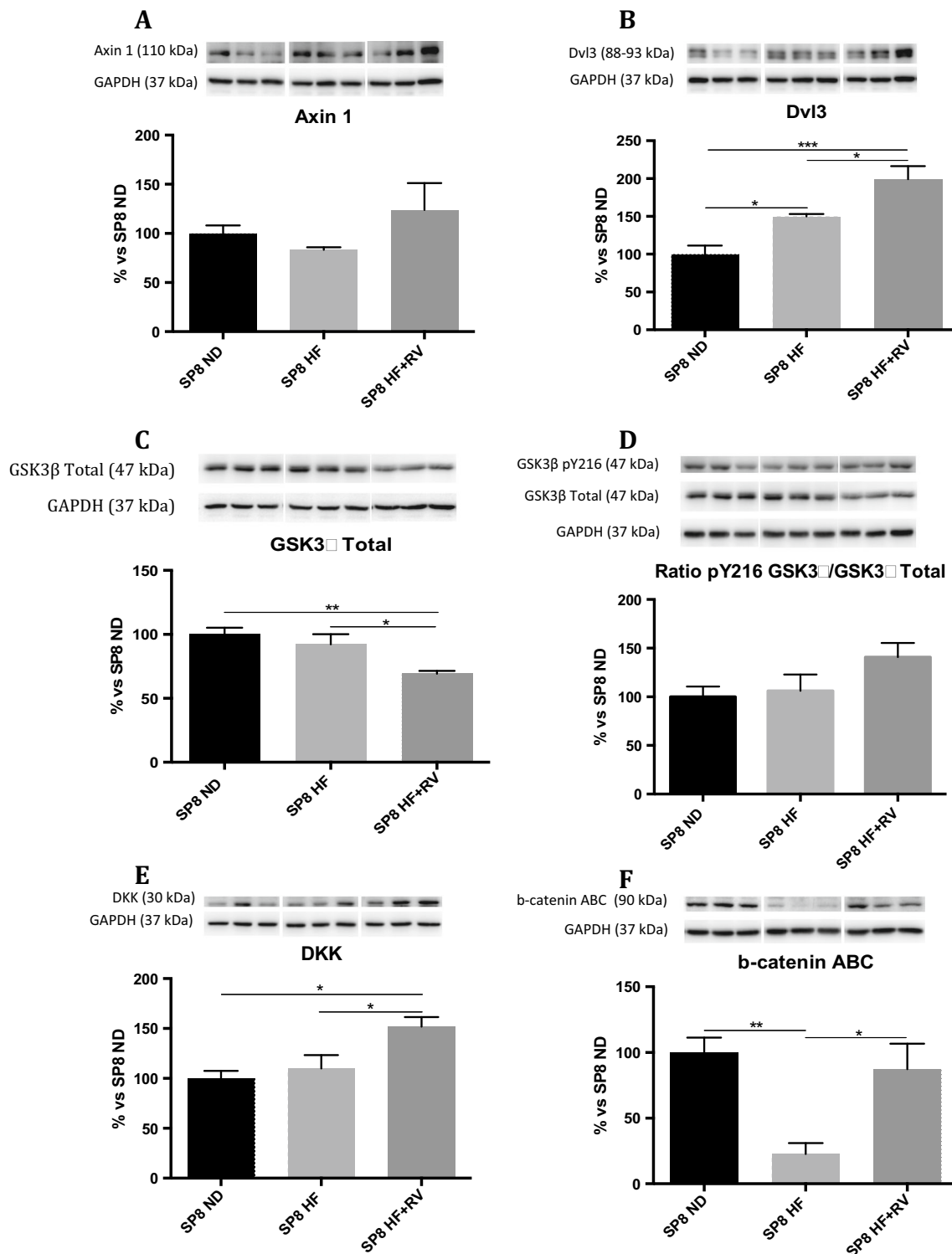


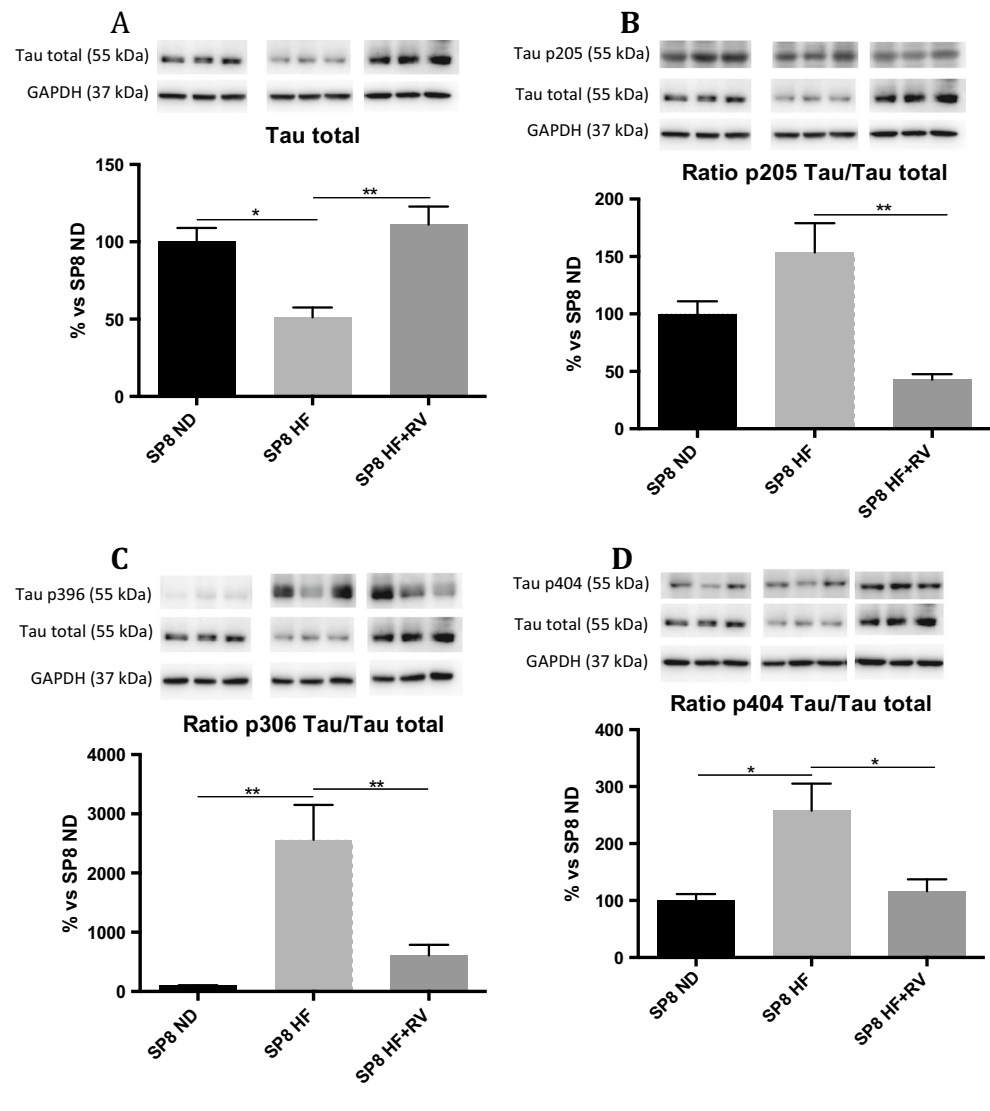
Fig. 10 Results of Wnt pathway in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) in SAMP8 fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Representative Western blot and quantification for **a** axin1, **b** Dvl3, **c** total GSK3β, **d**

p-Y216-GSK3β, **e** DKK, and **f** β-catenin ABC. Bars represent mean ± standard error of the mean (SEM), and values are adjusted to 100 % for SAMP8 levels with ND. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

protein (APP), a hallmark for SAMP8 model, processing pathway nor with HF nor with resveratrol treatment. In this manner, we did not observed changes in *ADAM-10*,

BACE1, or *APP* gene expression (data not shown), as occurs in SAMP8 under pharmacological or not pharmacological interventions [32, 66, 67].

Fig. 11 Representative Western blot and quantification for **a** Tau total, **b** ratio p-Tau (T205)/Tau, **c** ratio p-Tau (Ser306)/Tau, and **d** ratio p-Tau (Ser404)/Tau in senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) in SAMP8 fed with normal diet (SP8 ND), high-fat diet (SP8 HF), or high-fat diet plus resveratrol (SP8 HF + RV). Bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM), and values are adjusted to 100 % for senescence-accelerated prone mouse (SAMP8) levels with ND. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



In conclusion, HF induced, as described, metabolic stress in SAMP8 [34] with impairment in cognitive capabilities, OS increase, and mitochondrial dysfunction (including changes in organelle dynamics). Moreover, to our knowledge for the first time, we showed that HF affected Wnt pathway in hippocampus. Resveratrol, with known antioxidant activities, was able to overcome some of the HF-induced alteration, recovering mitochondrial biogenesis, reducing oxidative stress, and neurodegenerative markers such as tau hyperphosphorylation. In addition, an action on Wnt pathway should be added to the neuroprotective role of this polyphenol in the brain, due to the strong activation of β -catenin.

Acknowledgments We thank Maggie Brunner, M.A., for revising the language and style of the manuscript. This study was supported by grant SAF-2012-39852 from the Ministerio de Educación y Ciencia and FEDER funds. P-A V, CG-F, AC, and MP are affiliated with 2014SGR 525 and CIBERNED.

References

1. Nilsson LG (2003) Memory function in normal aging. *Acta Neurol Scand* 107(Suppl 179):7–13
2. Niccoli T, Partridge L (2012) Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 1122(17):R741–R752
3. Cunnane S, Nugent S, Roy M, Courchesne-Loyer A, Croteau E, Tremblay S, Castellano A, Pifferi F et al (2011) Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition* 27:3–20
4. Hoyer S (1993) Brain oxidative energy and related metabolism, neuronal stress, and Alzheimer's disease: a speculative synthesis. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 6(1):3–13
5. Hoyer S (1996) Oxidative metabolism deficiencies in brains of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 165: 18–24
6. Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, Lassandro R, Atlante A (2013) Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 13(4): 298–311
7. Münch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA et al (1998) Alzheimer's disease-synergistic effects of

- glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm* 105(4–5):439–461
8. Segobin S, La Joie R, Ritz L, Beaunieux H, Desgranges B, Chételat G, Pitel AL, Eustache F (2015) FDG-PET contributions to the pathophysiology of memory impairment. *Neuropsychol Rev* 25(3):326–355
 9. Rapoport SI, Hatanpää K, Brady DR, Chandrasekaran K (1996) Brain energy metabolism, cognitive function and down-regulated oxidative phosphorylation in Alzheimer Disease. *Neurodegeneration* 5(4):473–476
 10. Kwon B, Gamache T, Lee HK, Querfurth HW (2015) Synergistic effects of β -amyloid and ceramide-induced insulin resistance on mitochondrial metabolism in neuronal cells. *Biochim Biophys Acta* 1852(9):1810–1823
 11. Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, Casadesús G, Beas-Zarate C et al (2015) High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta* 1852(9):1687–1699
 12. Reddy PH, Beal FM (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45–53
 13. Pulliam DA, Deepa SS, Liu Y, Hill S, Lin AL, Bhattacharya A, Shi Y, Sloane L et al (2014) Complex IV-deficient *Surf1* ($-/-$) mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem J* 462(2):359–371
 14. Coskun PE, Beal MF, Wallace DC (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29):10726–10731
 15. Lin MT, Simon DK, Ahn CH, Kim LM, Beal MF (2002) High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain. *Hum Mol Genet* 11(2):133–145
 16. Onyango IG, Lu J, Rodova M, Lezi E, Crafter AB, Swerdlow RH (2010) Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim Biophys Acta* 1802:228–234
 17. Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, Casadesus G, Zhu X (2008) Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19318–19323
 18. Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29(28):9090–9103
 19. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842(8):1240–1247
 20. Westermann B (2012) Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 1817(10):1833–1838
 21. Bereiter-Hahn J (2014) Mitochondrial dynamics in aging and disease. *Prog Mol Biol Transl Sci* 127:93–131
 22. Hall AR, Burke N, Dongworth RK, Hausenloy DJ (2014) Mitochondrial fusion and fission proteins: novel therapeutic targets for combating cardiovascular disease. *Br J Pharmacol* 171(8):1890–1906
 23. Rao TP, Kühl M (2010) An updated overview on Wnt signaling pathways a prelude for more. *Circ Res* 106:1798–1806
 24. Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla-Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H et al (2006) Wnt 10B mutations in human obesity. *Diabetologia* 49:678–684
 25. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H et al (2006) Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38(3):320–323
 26. Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, Tsunoda T, Takahashi A, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T et al (2004) Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (*WNT5B*) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 75:832–843
 27. Oliva CA, Vargas JY, Inestrosa NC (2013) Wnts in adult brain: from synaptic plasticity to cognitive deficiencies. *Front Cell Neurosci* 3(7):224
 28. Inestrosa NC, Montecinos-Oliva C, Fuenzalida M (2012) Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:788–807
 29. Toledo EM, Inestrosa NC (2010) Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APP^{swe}/PSEN1^{DeltaE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 15(272–285):228
 30. Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C (2013) Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des* 19(38):6726–6731
 31. Vingtdoux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P (2008) Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 9(Suppl 2):S6
 32. Porquet D, Casadesús G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, Pelegrí C, Sanfeliu C et al (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age* 35(5):1851–1865
 33. Porquet D, Griñán-Ferré C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, Pallàs M (2014) Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 42(4):1209–1220
 34. Mehla J, Chauhan BC, Chauhan NB (2014) Experimental induction of type 2 diabetes in aging-accelerated mice triggered Alzheimer-like pathology and memory deficits. *J Alzheimers Dis* 39(1):145–162
 35. Ohta H, Nishikawa H, Hirai K, Kato K, Miyamoto M (1996) Relationship of impaired brain glucose metabolism to learning deficit in the senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett* 217(1):37–40
 36. Morley JE, Farr SA, Kumar VB, Armbrecht HJ (2012) The SAMP8 mouse: a model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease. *Curr Pharm* 18(8):1123–1130
 37. Pallàs M, Camins A, Smith MA, Perry G, Lee HG, Casadesus G (2008) From aging to Alzheimer's disease: unveiling “the switch” with the senescence-accelerated mouse model (SAMP8). *J Alzheimers Dis* 15(4):615–624
 38. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP (2010) NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech* 3(9–10):525–534
 39. Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behavioral data. Behav Brain Res* 31:47–59
 40. Vorhees CV, Williams MT (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1(2):848–858
 41. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149–167
 42. Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 8(3):385–403
 43. Crawley JN (2004) Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental Retardation and Developmental Disabilities. Res Rev* 10(4):248–258
 44. Mayeda ER, Whitmer RA, Yaffe K (2015) Diabetes and cognition. *Clin Geriatr Med* 31(1):101–115
 45. Verdile G, Keane KN, Cruzat VF, Medic S, Sabale M, Rowles J, Wijesekara N, Martins RN et al (2015) Inflammation and oxidative stress: the molecular connectivity between insulin resistance, obesity, and alzheimer's disease. *Mediators Inflamm. doi:10.1155/2015/105828*

46. Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R (2012) Are sirtuins viable targets for improving health span and lifespan? *Nat Rev Drug Discov* 11(6):443–461
47. Minor RK, Baur JA, Gomes AP, Ward TM, Csiszar A, Mercken EM, Abdelmohsen K, Shin YK et al (2011) SIRT1720 improves survival and healthspan of obese mice. *Sci Rep* 1:70
48. Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F (2010) High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging* 31: 1516–1531
49. Currais A, Prior M, Lo D, Jolival C, Schubert D, Maher P (2012) Diabetes exacerbates amyloid and neurovascular pathology in aging-accelerated mice. *Aging Cell* 11(6):1017–1026
50. López-Ramos JC, Jurado-Parras MT, Sanfeliu C, Acuña-Castroviejo D, Delgado-García JM (2012) Learning capabilities and CA1-prefrontal synaptic plasticity in a mice model of accelerated senescence. *Neurobiol Aging* 33(3):627.e13–627.e26
51. Zhang L, Trushin S, Christensen TA, Bachmeier BV, Gateno B, Schroeder A, Yao J, Itoh K et al (2016) Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 5(6):18725
52. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J et al (2006) Elliott, Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 127:1109–1122
53. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L et al (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 15(5):675–690
54. Menzies KJ, Singh K, Saleem A, Hood DA (2013) Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem* 288(10):6968–6979
55. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC (2011) Glucocorticoids and tumor necrosis factor (TNF) α increase oxidative stress and suppress WNT signaling in osteoblasts. *J Biol Chem* 286(52):44326–44335
56. Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T, Sakai D, Mochida J (2013) A complex interaction between Wnt signaling and TNF- α in nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther* 15(6):R189. doi:10.1186/ar4379
57. Stock M, Böhm C, Scholtyssek C, Englbrecht M, Fürnrohr BG, Klinger P, Gelse K, Gayetskyy S et al (2013) Wnt inhibitory factor 1 deficiency uncouples cartilage and bone destruction in tumor necrosis factor α -mediated experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 65(9):2310–2322. doi:10.1002/art.38054
58. Arrázola MS, Silva-Álvarez C, Inestrosa NC (2015) How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario. *Front Cell Neurosci* 9:166
59. Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149(6):1192–1205
60. Bayod S, Felice P, Andrés P, Rosa P, Camins A, Pallás M, Canudas AM (2015) Downregulation of canonical Wnt signaling in hippocampus of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* 36(2):720–729
61. Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ (2014) Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer* 21:R209–R225
62. Hope C, Kestutis P, Marina P (2008) Low concentrations of resveratrol inhibit Wnt signal throughput in colon-derived cells: Implications for colon cancer prevention. *Mol Nutr Food Res* 52(Suppl 1):S52–S61. doi:10.1002/mnfr.200700448
63. Takahashi-Yanaga F, Kahn M (2010) Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res* 16:3153
64. Zhang P, Li H, Yang B (2014) Biological significance and therapeutic implication of resveratrol-inhibited Wnt, Notch and STAT3 signaling in cervical cancer cells. *Genes Cancer* 5(5–6):154–164
65. Mo S, Cui Z (2012) Regulation of canonical Wnt signaling during development and diseases. *Embryogenesis*. Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech
66. Ambrecht HJ, Siddiqui AM, Green M, Farr SA, Kumar VB, Banks WA, Patrick P, Shah GN et al (2015) Antisense against Amyloid- β protein precursor reverses memory deficits and alters gene expression in neurotropic and insulin-signaling pathways in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis* 46(2):535–548
67. Griñan-Ferre C, Pérez-Cáceres D, Gutiérrez-Zetina SM, Camins A, Palomera-Avalos V, Ortuño-Sahagún D, Rodrigo MT, Pallás M (2015) Environmental enrichment improves behavior, cognition, and brain functional markers in young senescence-accelerated prone mice (SAMP8). *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-015-9210-6

Publicación 2

Metabolic Stress Induces Cognitive Disturbances and Inflammation in Aged Mice: Protective Role of Resveratrol

Palomera-Ávalos V, Griñán-Ferré C, Izquierdo V, Camins A, Sanfeliu C, Mercè Pallàs.

Rejuvenation Research (2017)

RESUMEN

La inflamación y el estrés oxidativo son procesos que tienen un impacto negativo en el organismo, afectando las funciones cognitivas y cerebrales, este efecto es más evidente en la senescencia. El resveratrol es un compuesto que se ha postulado como un potente antioxidante natural con efectos antiinflamatorios y con propiedades rejuvenecedoras.

Para conocer mejor el papel del resveratrol sobre la cognición, inflamación y el estrés oxidativo en el envejecimiento se indujo estrés metabólico con una dieta alta en grasas (HF) en ratones de la cepa C57BL/6J envejecidos (24 meses de edad) y se compararon con ratones controles jóvenes de 8 semanas. La dieta grasa produjo alteraciones en la memoria y cognición de los ratones en comparación con los controles viejos y jóvenes. Estos cambios fueron prevenidos por el resveratrol. Los ratones viejos con HF presentaron un incremento significativo en la expresión de genes de citocinas proinflamatorias (*TNF- α* , *Cxcl10*, *IL-1*, *IL-6*, *Ccl3*), las cuales se vieron disminuidas con el resveratrol. Sin embargo, los marcadores de estrés oxidativo presentaron cambios muy discretos. Además, el resveratrol moduló cambios en vías metabólicas implicadas en la senescencia y el rejuvenecimiento, induciendo incrementos significativos en los complejos CIII-UQCRC2, CIV-MTCO1 y CII-SDHB de la cadena OXPHOS y modificando el eje SIRT1-AMPK-PGC1 α , en donde se obtuvieron incrementos en los niveles de expresión de SIRT1 y se revirtió la fosforilación de AMPK inducida por la HF, actuando el resveratrol como un activador directo tanto de SIRT1 como de AMPK.

Además, el resveratrol también demostró cambios en las marcas epigenéticas que dependen del estrés oxidativo, disminuyendo el porcentaje de los niveles de metilación global (5mC) y de los niveles de expresión de la enzima metiltransferasa *Dnmt3b*, el resveratrol también redujo la expresión del gen de la deacetilasa *Hdac2*.

En general, los resultados mostraron la importancia del papel integrador de los diferentes mecanismos celulares en los efectos nocivos de la edad en la cognición y el papel beneficioso del resveratrol. Este trabajo muestra una gamma amplia de procesos modificados en la vejez y por el estrés metabólico, ponderando la importancia de cada uno y el papel del resveratrol como una posible estrategia para contribuir al envejecimiento saludable.

Metabolic Stress Induces Cognitive Disturbances and Inflammation in Aged Mice: Protective Role of Resveratrol

Veronica Palomera-Ávalos,¹ Christian Griñán-Ferré,¹ Vanesa Izquierdo,¹ Antonio Camins,¹ Coral Sanfeliu,² and Mercè Pallàs¹

Abstract

Inflammation and oxidative stress (OS) are key points in age progression. Both processes impact negatively in cognition and in brain functions. Resveratrol (RV) has been postulated as a potent antioxidant natural compound, with rejuvenating properties. Inducing a metabolic stress by high-fat (HF) diet in aged C56/BL6 (24 months) led to cognitive disturbances compared with control age mated and with young mice. These changes were prevented by RV. Molecular determinations demonstrated a significant increase in some inflammatory parameters (*TNF- α* , *Cxcl10*, *IL-1*, *IL-6*, and *Ccl3*) in old mice, but slight changes in OS machinery. RV mainly induced the recovery of the metabolically stressed animals. The study of key markers involved in senescence and rejuvenation (mitochondrial biogenesis and Sirt1-AMPK-PGC1- α) demonstrated that RV is also able to modulate the changes in these cellular metabolic pathways. Moreover, changes of epigenetic marks (methylation and acetylation) that are depending on OS were demonstrated. On the whole, results showed the importance of integrative role of different cellular mechanisms in the deleterious effects of age in cognition and the beneficial role of RV. The work presented in this study showed a wide range of processes modified in old age and by metabolic stress, weighting the importance of each one and the role of RV as a possible strategy for fighting against.

Keywords: aging, neurodegeneration, behavior, cognition, metabolic stress, mitochondrial dynamics, resveratrol

Introduction

AN INCREASED AGED population comprises the social landscape in the XXI century. It is estimated that between the years 2012 and 2050, the world population aged 60 and over will nearly double from 2015 to 2050, growing by 56%, reaching nearly 2.1 billion.¹ In addition, “oldest-old” persons (people aged 80 years and over) are growing even faster than the number of old individuals. The expansion in aged population will exert an impact on the economic burden of the care and treatment of age-related diseases. Thus, a challenge in facing the aging progress is to reduce the impact of aging on health. In this respect, diet and the many bioactive substances present in food represent a novel target for interventions that may promote healthy brain aging.

Emerging evidence suggests that aside from oxidative stress (OS) and the loss of homeostatic processes with age, there are several cellular processes that may serve as a po-

tential avenue for reducing the incidence of debilitating diseases in age and to halt the progression of cognitive decline associated with aging. Identifying these processes and their weight in the progression of aging is basic knowledge in considering them as possible targets to act on specific targets for ameliorating the universally harmful processes associated with aging, driving strategies toward healthy aging.

OS and inflammation are the basis of aging theories,² and another key to cell dysfunction in aging lies in the mitochondria. Aging cells cope less efficiently with metabolism deregulations. Metabolic stress is the hypermetabolic catabolic response to severe injury or disease, and the modern notion of metabolic stress also includes disturbances in proteostasis and the activation of signaling pathways that mediate cellular stress.³ Metabolic stress has been demonstrated to induce a number of cellular process impairments such as mitochondrial changes, reduced metabolic rate, radical oxygen species (ROS) produced by mitochondria,⁴

¹Pharmacology Section, Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry, Institute of Neuroscience, University of Barcelona, Barcelona, Spain.

²Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC, and IDIBAPS, Barcelona, Spain.

and finally, the inflammation process, which can impact on the health of individuals, including the central nervous system (CNS).⁵ Feeding mice with a high-fat (HF) diet induced glucose metabolism disturbances with increases in weight and insulin resistance.⁶ In APP/PS1 mice, in an extended model of Alzheimer's disease (AD), HF produced cognitive disturbances, jointly with changes in the insulin pathway, an increase in tau kinase activity and tau hyperphosphorylation, and changes in amyloid beta production, demonstrating the role of insulin resistance in AD.⁷ Metabolic stress increases cognitive impairment in SAMP8, a murine model of senescence. In this model, in addition to OS and inflammation, the implication of the Wnt pathway has been related with changes in the hallmarks of AD characteristics in these animals.⁸

Diet is an important component of healthy brain aging, and the consumption of a HF diet is known to increase the risk of AD. In addition, there is evidence that nutritional stimuli can modify epigenetic mechanisms, such as DNA methylation.⁹ DNA methylation/demethylation plays a crucial role in gene regulation and could also be responsible for the presentation of senescence. For example, being fed a chronic HF diet mice (from weaning to >15 weeks of age) altered the patterns of DNA methylation in the brain,¹⁰ and the OS and inflammation that increase by HF diet are thought to be important contributors of DNA hypermethylation. However, contradicting this is the fact that global DNA hypomethylation has been found in aging brains.^{11,12} Although there are other reports on AD-brain global DNA methylation changes in the opposite direction, differences are likely due to that the authors studied different brain regions and used different methylation detection techniques.¹³

NeuroD6 is a member of the neurogenic bHLH NeuroD family, which are proteins involved in the development and differentiation of the CNS, mediating neurogenic processes. Learning and memory processes have been related with progenitor cell proliferation and hippocampal neurogenesis. Increasing evidences support the relationship between adult hippocampal neurogenesis and learning.^{14,15} Moreover, it is also known that neurogenesis processes are impaired with physiological aging.^{16,17} It is noteworthy that recently, new role has been described for NeuroD6 as a regulator of ROS homeostasis through the triggering of an antioxidant response coordinated with the expression of key mitochondrial regulators, such as PGC-1 α and SIRT1, resulting in low ROS levels.¹⁸

Resveratrol is known to extend life span.¹⁹ This polyphenol has attracted wide attention because of its antioxidant and anti-inflammatory effects.^{20,21} Resveratrol increases AMPK activity and improves insulin sensitivity.²² AMPK is an energy sensor that regulates energy homeostasis and metabolic stress. By affecting glucose and lipid metabolism, the energy balance is closely related with obesity and type 2 diabetes. Activation of AMPK is responsible for metabolic changes through phosphorylation of downstream substrates, such as Acetyl-CoA Carboxylase and Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3), which are directly related with fatty acid oxidation and glycogen synthesis, respectively.²³

The goal of this work was to pinpoint the importance of metabolic stress in physiologically aged animals regarding cognition and determining the molecular changes underlying the loss of cognitive capabilities, disclaiming noncrucial

processes in old animals, and focusing on new possibilities of the beneficial effect of resveratrol in the oldest.

Methods

Animals

Male C57BL/6J mice 22 months of age were randomized in four experimental groups and following 8 weeks of treatment were euthanized under anesthesia. The normal diet (ND; $n=9$) group had *ad libitum* access to a standard chow diet (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet; Harlan Teklad, Madison, WI) and tap water; Resveratrol group (RV; $n=9$) had access to standard chow diet enriched with the polyphenol (1 g/kg, w/w). The HF ($n=11$) group was fed a diet consisting of a (AIN-93G) diet modified to provide 60% of calories from fat (HF: carbohydrate:protein:fat ratio of 16:23:61%). Finally an HF diet containing 1 g/kg w/w, resveratrol (HF+RV; $n=9$). Resveratrol chow (both ND and HF) was formulated to provide daily doses of ~160 mg/kg to the mice. In addition, a fifth group of young (8 weeks) mice were added ($n=12$) to have a young cohort. Mice were treated according to European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedures established by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya, Spain. Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in this study.

Glucose curve

The intraperitoneal (i.p.) glucose tolerance test was performed following 8 weeks of HF diet feeding, as described previously.²⁴ In brief, mice were fasted overnight for 16 hours. The test was performed in a quiet room, preheated to +30°C. The tip of the mouse's tail was cut with the heparin-soaked (Heparina Rovi, 5000 IU/mL; Rovi S.A., Madrid, Spain) scissors 30 minutes before a 1 g/kg i.p. glucose injection (diluted in H₂O). Blood glucose levels were measured 0, 5, 15, 30, 60, and 120 minutes after the glucose injection with the Ascensia ELITE blood glucose meter (Bayer Diagnostics Europe, Ltd., Dublin, Ireland).

Novel object recognition test

The test was conducted in a 90°, 2-arm, 25-cm long 20-cm high maze.²⁵ Light intensity in the middle of the field was 30 lux. The objects to be discriminated were plastic figures (object A, 5.25-cm high and object B, 4.75-cm high). First, the mice were individually habituated to the apparatus for 10 minutes for 3 days. On day 4, they were submitted to a 10-minute acquisition trial (first trial) during which they were placed in the maze in the presence of two identical novel objects (A+A or B+B) that was placed at the end of each arm. A 10-minute retention trial (second trial) occurred 2 hours later. During this second trial, objects A and B were placed in the maze, and the times that the animal took to explore the new object (tn) and the old object (to) were recorded. A discrimination index (DI) was defined as (tn-to)/(tn+to). To avoid object preference biases, objects A and B were counterbalanced so that one half of the animals in each experimental group were first exposed to object A and then to object B, whereas the remaining one half of the animals first saw object B, whereupon object A was presented. The

maze, the surface, and the objects were cleaned with 70° ethanol between the animals' trials to eliminate olfactory cues.

Morris water maze test

An open circular pool (100 cm in diameter and 50 cm in height) was filled halfway with water,²⁶ and the water temperature was maintained at 22°C ± 1. Two principal perpendicular axes were defined; thus, the water surface was divided into four quadrants (NE, SE, SW, and NW), and five starting points were set (NE, E, SE, S, and SW). Four visual clues were placed on the walls of the tank (N, E, S, and W). Nontoxic white latex paint was added to make the water opaque, and a white escape platform was submerged 1 cm below the water level (approximately in the middle of one of the quadrants).

The animals' swimming paths were recorded by a video camera mounted above the center of the pool, and the data were analyzed with SMART[®] version 3.0 statistical software. The learning phase consisted of 6 days of trials for each mouse. The animals were submitted to five trials each day starting from the positions established (in random order) and without a resting phase between each trial and the subsequent one. At each trial, the mouse was placed gently into the water, facing the wall of the pool, and allowed to swim for 60 seconds. If not able to locate the platform in the latter time period, the mouse was guided to the platform by the investigator. Animals were left on the platform each time for 30 seconds to allow spatial orientation.

The parameters measured were latency time in finding the platform, time spent in each quadrant, and distance swum for each trial; the mean was calculated for each trial day. A memory test was performed at the end of the learning days, in which the platform was removed, and the time spent by each mouse in each quadrant was measured.

Open field test

The open field test (OFT) apparatus was constructed of white plywood (50 × 50 × 25 cm).²⁷ Red lines were drawn to divide the floor into 25-cm squares. Behavior was scored with SMART version 3.0 software, and each trial was recorded for later analysis, utilizing a camera fixed to the

ceiling at a height of 2.1 m situated above the apparatus. Mice were placed at the center, or at one of the four corners, of the open field and allowed to explore the apparatus for 5 minutes. After the 5-minute test, the mice were returned to their home cages, and the open field was cleaned with 70% ethyl alcohol and allowed to dry between tests. To assess the animals' habituation process to the novelty of the arena, the mice were exposed to the apparatus for 5 minutes on 2 consecutive days. The behaviors scored included Line Crossing, Center Entries, Center Stay Duration, Rearing, Defecation, and Urination. Each animal was then given a score for total locomotor activity, which was calculated as the sum of total distance, line crosses, and number of rears.

Brain isolation and Western blot analysis

Mice were euthanized 1 day after the last Morris water maze (MWM) trial was conducted and brain quickly removed from the skull. Hippocampus was dissected and frozen in powdered dry ice and maintained at -80°C for further use. Tissue samples were homogenized in lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitors (Cocktail II; Sigma), and cytosol and nuclear fractions were obtained as described elsewhere. Protein concentration was determined by the Bradford method. Twenty micrograms of protein was separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (8%–15%) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% nonfat milk in Tris-Buffered Saline solution containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 hour at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T and 5% Bovine Serum Albumin as follows: OXPHOS cocktail (1:500; MitoSciences), total GSK-3β (1:1000; Cell Signaling), p-Ser9 GSK-3β (1:1000; Cell Signaling), Dvl3 (1:1000; Cell Signaling), Dickkopf1 (1:500; Santa Cruz), β-catenin ABC (1:1000; Millipore), nuclear factor-kappa beta (NF-κB) (1:1000; Cell Signaling), Nrf1 (1:500; Santa Cruz), p-AMPK and total AMPK (1:2000; Cell Signaling), PGC-1α (1:500; Santa Cruz), DRP1 (1:1000; Abcam), OPA1 (1:1000; BD Transduction Laboratories[™]), Bax (1:1000; Millipore), Mitofusin 1 (1:1000; Millipore), Catalase (1:1000;

TABLE 1. QRT-PCR PRIMER SEQUENCES USED WITH SYBR GREEN SUPERMIX

Primers	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (3'-5')
<i>TNF-α</i>	TCGGGGTGATCGGTCCCCAA	TGGTTTGCTACGACGTGGGCT
<i>Cxcl10</i>	GGCTAGTCCTAATTGCCCTTGG	TTGTCTCAGGACCATGGCTTG
<i>IL-1</i>	ACAGAAATATCAACCAACAAGTGATATTCTC	GATTCYYYCCTTTGAGGCCCA
<i>IL-6</i>	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>Ccl3</i>	ACTGCCTGCTGCTTCTCCTACA	AGGAAATGACACCTGGCTGG
<i>iNOS</i>	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	GAAGCGTTTCGGGATCTGAA
<i>Cox2</i>	TGACCCCCAAGGCTCAAATA	CCCAGGTCCTCGCTTATGATC
<i>Aldh2</i>	GCAGGCGTACACAGAAGTGA	TGAGCTTCATCCCCTACCCA
<i>Neurod6</i>	TGCGACACTCAGCCTGAAAA	TCTGGGATTCCGGCATTACG
<i>Sirt1</i>	AACACACACAAAAATCCAGCA	TGCAACCTCTCCAAGGTAT
<i>Dnmt3b</i>	TGCCAGACCTTGGAAACCTC	GCTGGCACCTCTTCTTCTAT
<i>Hdac1</i>	TCACCGAATCCGCATGACTC	TCTGGGCGAATAGAACGCAG
<i>Hdac2</i>	CTATCCCGCTCTGTGCCCT	GAGGCTTCATGGGATGACCC
<i>β-Actin</i>	CAACGAGCGGTTCCGAT	GCCACAGGTTCCATACCCA

qRT-PCR, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

Cell Signaling), and GAPDH (1:2000; Millipore). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Immunoreactive proteins were visualized utilizing an Enhanced ChemiLuminescence-based Detection Kit (ECL Kit; Millipore), and digital images were acquired using a ChemiDoc XRS+System (Bio-Rad). Band intensities were quantified by densitometric analysis using Image Lab software (Bio-Rad), and values were normalized to GAPDH.

Global DNA methylation quantification

For global DNA, methylation was performed according to the manufacturer's instructions, first using the FitAmp™ Blood and Cultured Cell DNA Extraction Kit, which is designed for rapid isolation of pure genomic DNA from a small amount of blood or mammalian cells. The second part was carried out using the MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, NY). Briefly, methylated DNA was detected utilizing capture and detection antibody to 5-mC and then quantified colorimetrically by reading absorbance at 450 nm using the Microplate Photometer. The absolute amount of methylated DNA (proportional to the optical density [OD] intensity) was measured and was quantified using a standard curve plotting OD values versus five serial dilutions of control methylated DNA (0.5–10 ng).

RNA extraction and gene expression determination

Total RNA isolation was carried out by means of Trizol reagent following the manufacturer's instructions. RNA content in the samples was measured at 260 nm, and sample purity was determined by the A260/280 ratio in a NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Samples were also tested in an Agilent 2100B Bioanalyzer (Agilent Technologies) to determine the RNA integrity number. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as follows: 2 µg of messenger RNA (mRNA) was reverse-transcribed using the High Capacity (complementary DNA) cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (qPCR) was utilized to quantify the mRNA expression of inflammatory genes interleukin 6 and 1 (*IL-6* and *IL-1*), tumor necrosis factor alpha (*TNF-α*), C-X-C motif chemokine (*Cxcl10*), C-C motif ligand 3 (*Ccl3*), Aldehyde dehydrogenase 2 (*Aldh2*), inducible Nitric Oxide Synthase (*iNOS*), Cyclooxygenase 2 (*Cox2*), and aldehyde oxidase 1 (*Aox1*) and epigenetic enzyme genes DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha (*Dnmt3a*), DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta (*Dnmt3b*), Histone deacetylase 1 (*Hdac1*), Histone deacetylase 2 (*Hdac2*), Sirtuin 1 (*Sirt1*), and Neuronal differentiation 6 (*Neurod6*). Normalization of expression levels was performed with actin for SYBR Green and TATA-binding protein (*Tbp*) for TaqMan.

TABLE 2. qRT-PCR PRIMER SEQUENCES USED WITH TAQMAN PROBE

Primers	Probes
<i>Dnmt3a</i>	Mm00432881_m1
<i>Tbp</i>	Mm00446971_m1

qRT-PCR, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.

The primers used are presented in Tables 1 and 2. Real-time PCR was performed on the StepOnePlus Detection System (Applied Biosystems) using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Each reaction mixture contained 7.5 µL of cDNA, whose concentration was 2 µg, 0.75 µL of each primer (whose concentration was 100 nM), and 7.5 µL of SYBR Green PCR Master Mix (2X).

Data were analyzed utilizing the comparative Cycle threshold method ($\Delta\Delta C_t$), where the actin transcript level was used to normalize differences in sample loading and preparation. Each sample ($n=4-5$) was analyzed in

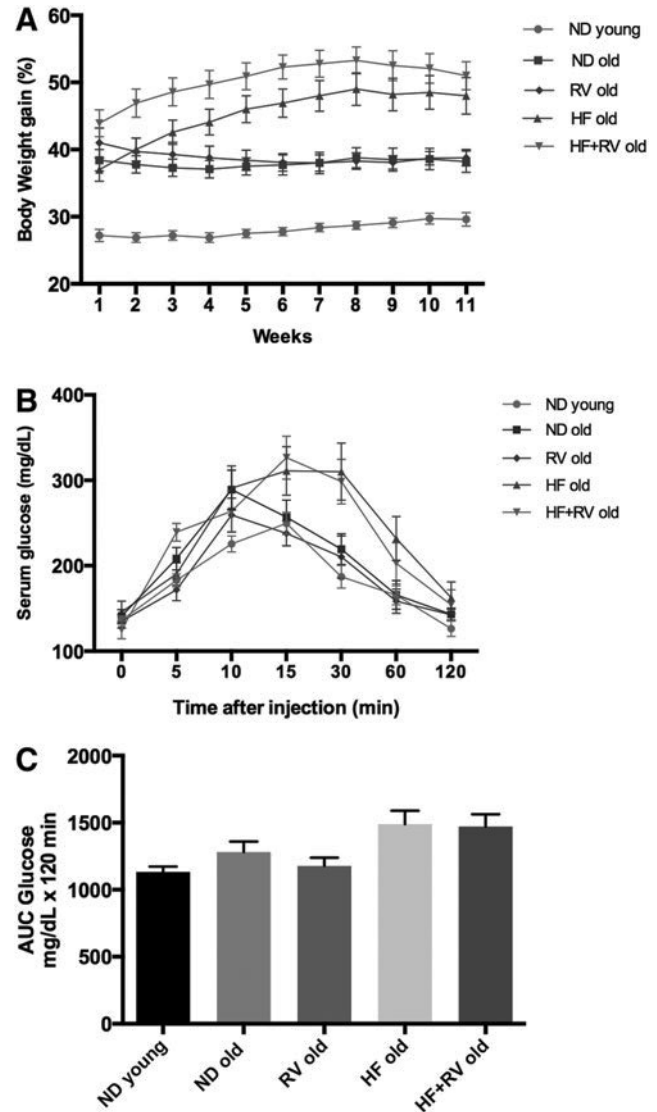


FIG. 1. Results of body weight, caloric intake, and glucose test in C57BL/6J mice. **(A)** Body weights of mice fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). **(B)** Plasma levels of glucose 1 g/kg i.p. administration. **(C)** Glucose AUC after 2 hours glucose injection. Data represented observed mean \pm SEM. For compared groups, we did ANOVA One way. AUC, area under the curve; HF, high fat; i.p., intraperitoneal; ND, normal diet; RV, resveratrol; SEM, standard error of the mean.

triplicate, and results represented the n -fold difference of transcript levels among different samples.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. The trapezoidal rule was used to determine area under the curve. Means were compared with two-way analysis of variance and *post hoc* analysis. Comparisons were performed for young/ND old/RV old and ND old/HF old/HF+RV old. Statistical significance was considered when p -values were <0.05 . Statistical outliers were performed out with the Grubbs test and were removed from analysis.

Results

Weight evolution and glucose tolerance test

Mouse groups under HF diet exhibited exponential increase in body weight (BW) for up to 8 weeks (Fig. 1A). This gain was absent in ND old animals and was slightly present in young animals (Fig. 1A). Persistent high-blood glucose levels between 20 and 90 minutes of glucose tolerance test at 8 weeks post HF diet treatment in mice indicated systemic failure to reduce blood glucose, implying sustained insulin resistance induced by HF diet during

8 weeks (Fig. 1B). When RV was added to diet (ND and HF), no changes were observed in BW.

Cognitive studies: learning and memory

Results obtained in the OFT indicated that the HF groups exhibited a significant increase in time spent in the center zone with respect to ND group old (Fig. 2A), paralleling the time spent in border zone (Fig. 2B); RV increased, in a non-significant manner, the time spent in center open field compared with ND old (Fig. 2A); and no differences were observed in locomotor activity (Fig. 2C). In the novel object recognition test (NORT), we found that mice fed with HF diet had a lower DI with respect to ND old (Fig. 2D), demonstrating that SAMP8 fed with HF diet exhibited impaired memory capabilities compared with old SAMP8 fed with ND or HF-RV.

The results obtained in spatial learning acquisition and retention in the MWM test are illustrated in Figure 3A and Table 3. All mouse groups were able to learn along the trial days, although young animals accomplished this faster than old animals. Results obtained in MWM memory test were very variable across the different parameters studied, probably because the advanced age in addition to the weight gain in HF animals reduced the reliability of this test under our experimental condition. Therefore, despite a trend to lower

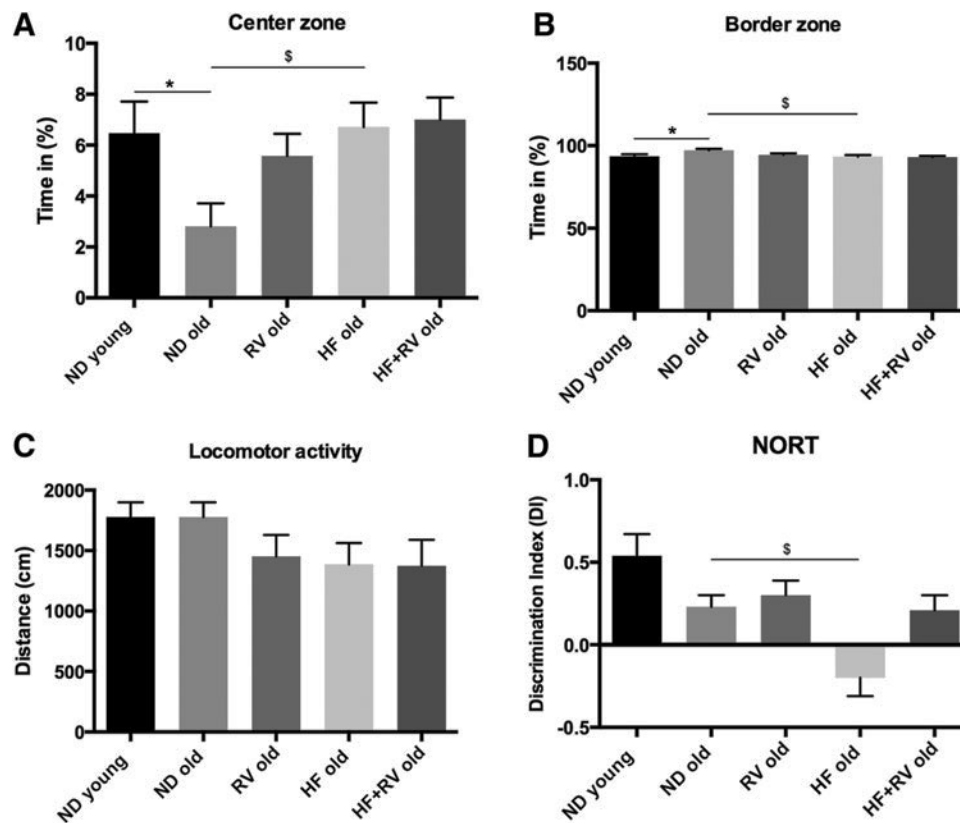


FIG. 2. Results of OFT and the NORT in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). (A) Time spent in center zone in the OFT. (B) Time spent in border zone in the OFT. (C) Locomotor activity in the OFT. (D) Discrimination index in the NORT. Data represented observed mean \pm SEM. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$. §Significant differences between ND old groups versus HF and HF+RV groups, $p < 0.05$. NORT, novel object recognition test; OFT, open field test.

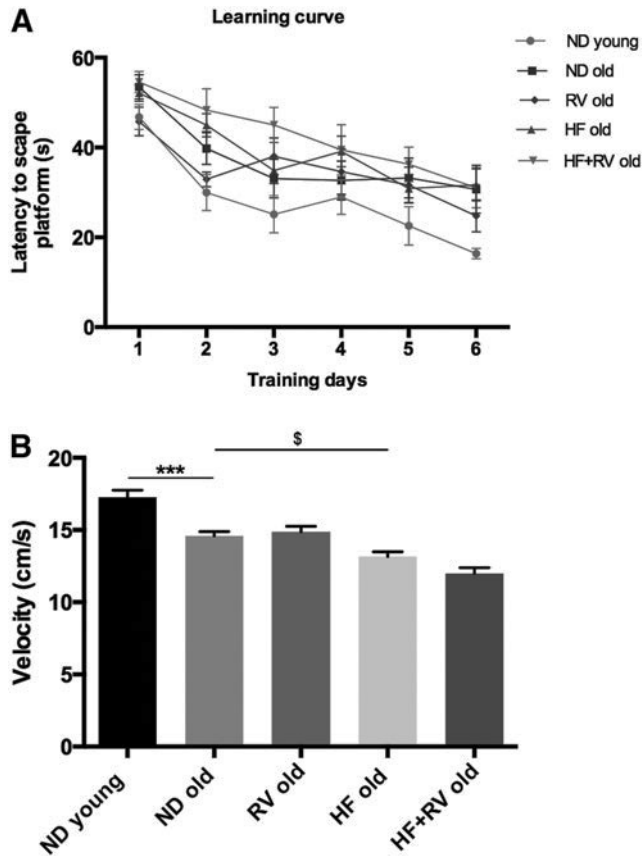


FIG. 3. Results of spatial learning and memory in the Morris water maze in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). **(A)** Escape latency time to reach the hidden platform during training days. **(B)** Velocity. Data represented observed mean \pm SEM. For compared groups we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. §Significant differences between ND old groups versus HF and HF+RV groups, $p < 0.05$.

performance by HF old, no significant memory differences were obtained (from 20% to 24%–27% time in platform; Table 3). The most robust result was swimming velocity (Fig. 3B). This parameter revealed a significant decrease in swim velocity in old animals with respect to

young mice and also demonstrated global amelioration in RV-fed animals.

Molecular and biochemical changes induced by HF in old mice: effects of resveratrol

HF induces a significant increase in the gene expression of inflammatory cytokines *TNF- α* , *Cxcl10*, *IL-1*, *IL-6*, and *Ccl3* in old mice in reference to ND. RV induced significant reduction in the expression of these cytokines in HF-fed animals, but no change was determined in ND-fed old mice after RV administration (Fig. 4A–E). Thus, the preventive effect of RV appears only under metabolic stress induced by HF, but not under ND conditions. It is noteworthy that only *TNF- α* and *Ccl3* were increased in ND old animals, whereas the remaining cytokines determined did not change in old compared with young animals.

We found statistical differences in *iNOS* gene expression between ND and HF (Fig. 5A). However, RV administration did not modify *iNOS* gene expression in any experimental groups, although a nonsignificant decrease can be observed in HF-RV animals (Fig. 5A). *Aox1* (data not shown), *Cox2*, or *Aldh2* gene expression did not demonstrate significant changes in young, ND, or HF mice. RV was able to increase in *Aldh2* ND old mice in a significant manner (Fig. 5B). NF- κ B is a protein complex that is involved in cellular responses to OS in cytokines, among others. Subsequently, gene expression as an OS effector was studied. We did not find statistical differences between ND and HF, but RV was able to reduce the active subunit of this transcriptional factor significantly in ND-RV, and there was a nonsignificant trend to diminish this in HF-RV in comparison with HF (Fig. 5C). In contrast, catalase (CAT) levels were studied; we found statistical differences between ND and HF, and a marginal reversion was observed in RV-fed animals (Fig. 5D). These results reinforced those obtained with *iNOS*, indicating weak changes in the level of OS induced by HF in old compared with young animals. Finally, cytoplasmic and nuclear protein levels for nuclear factor erythroid 2-related factor 1 (Nrf1) were determined, but no significant changes were observed (Fig. 5E–F).

To determine whether HF affects mitochondrial respiratory chain protein elements, OXPHOS was performed by Western blot (Fig. 6A). Analysis revealed that no significant changes in OXPHOS components took place in the HF group; however, a significant increase in CIII-UQCRC2, CIV-MTCO1, and CII-SDHB complexes was found in RV-treated animals (Fig. 6C–E). Accordingly, with slight

TABLE 3. PARAMETERS MEASURED IN THE MORRIS WATER MAZE IN C57BL/6J YOUNG AND OLD FED WITH NORMAL DIET (ND YOUNG $n=12$ AND ND OLD $n=9$), RESVERATROL (RV OLD $n=9$), HIGH-FAT DIET (HF OLD $n=11$), OR HIGH-FAT DIET PLUS RESVERATROL (HF+RV OLD $n=9$)

	ND young	ND old	HF old	HF+RV old	RV old
Latency to platform (first day)	43.81 \pm 1.11	47.53 \pm 1.37	48.17 \pm 0.94	46.67 \pm 1.67	42.46 \pm 1.59
Latency to platform (last day)	23.17 \pm 1.00	28.07 \pm 1.30	30.71 \pm 0.64	29.03 \pm 0.98	29.60 \pm 0.85
Distance in zone platform (%)	27 \pm 1.48	27 \pm 1.65	21 \pm 1.44	24 \pm 3.30	26 \pm 3.15
Time in zone platform (%)	26 \pm 2.16	25 \pm 2.74	20 \pm 1.59	25 \pm 4.05	25 \pm 3.22
Entries in zone platform	5 \pm 0.67	4 \pm 0.68	3 \pm 0.48	4 \pm 0.5	3 \pm 0.31
Velocity (cm/s)	17.27 \pm 0.48	14.59 \pm 0.29	13.16 \pm 0.32	11.99 \pm 0.40	14.85 \pm 0.41

Results are expressed as a mean \pm standard error of the mean. HF, high fat; ND, normal diet; RV, resveratrol.

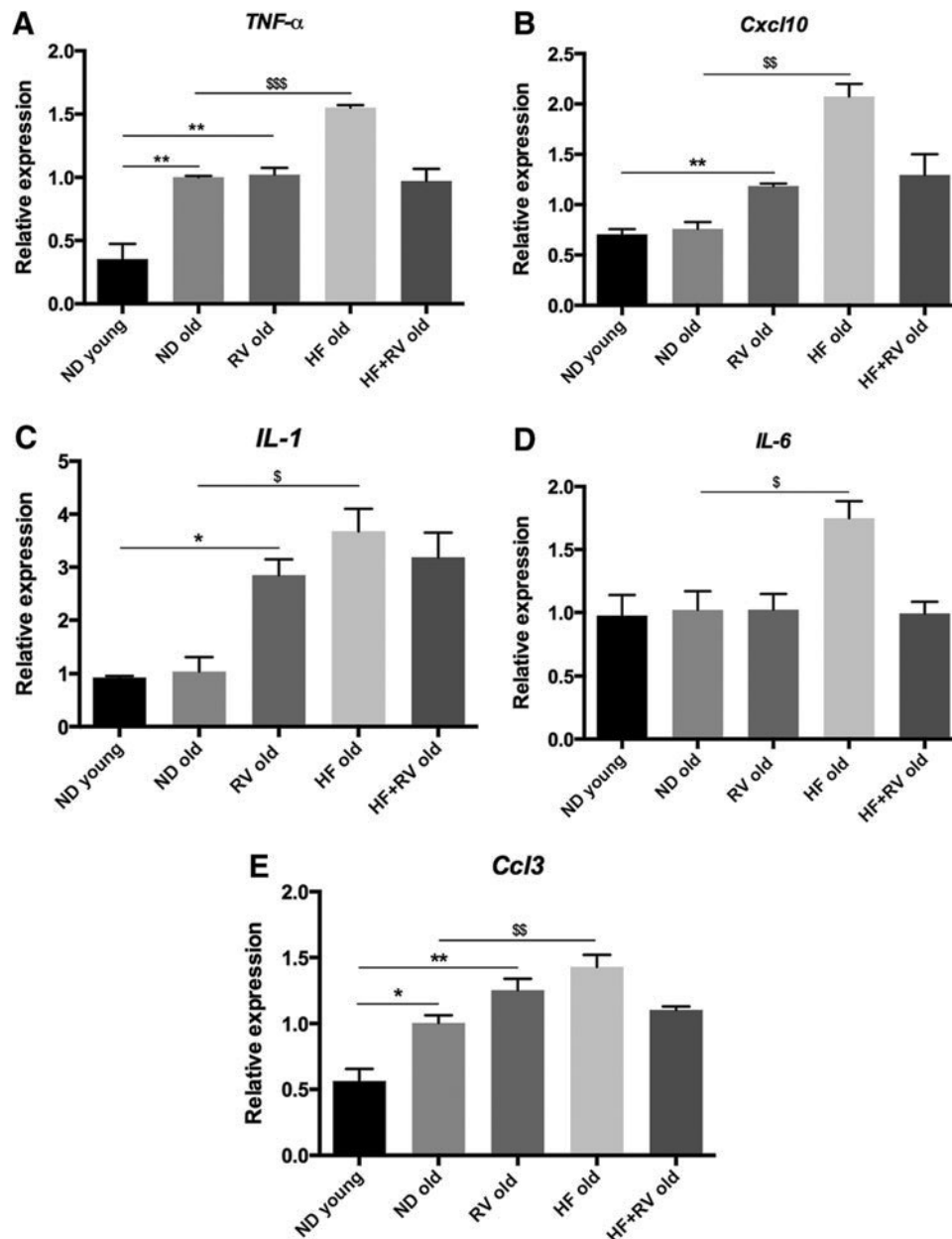


FIG. 4. Pro-inflammatory gene expression for (A) *TNF- α* ; (B) *Cxcl10*; (C) *IL-1*; (D) *IL-6*; and (E) *Ccl3* in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). Gene expression levels were determined by reverse transcription PCR. Mean \pm SEM performed in triplicate is represented. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$. ** $p < 0.01$. \$Significant differences between ND old groups versus HF and HF+RV groups, $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$.

changes in mitochondrial function, no changes were determined in fission or fusion processes through OPA1, DRP1, and Mitofusin 1 proteins (Fig. 6G–I).

NeuroD6 expression demonstrated a diminution in old animals, and RV recovered the expression of this enzyme to young mice levels (Fig. 7A). In addition, *Sirt1* gene expression levels presented significant increase in ND-RV in relation to ND, but this profile did not occur under HF diet (Fig. 7B). In contrast, PGC-1 α increased in HF with reference to ND, while RV dietary supplementation recovered PGC-1 α protein levels in ND, but not in HF-fed animals (Fig. 7C).

In reference to AMPK signaling, we found an increase in pAMPK levels in old animals. The increase in phosphorylation levels was higher in HF group in reference to ND. RV administration decreased pAMPK levels, achieving a profile similar to that of ND mice (Fig. 7D). Moreover, the proapoptotic protein Bax was analyzed; no changes were observed in protein levels by RV treatment (Fig. 7E).

Wnt pathway can be modulated by metabolic stress. GSK-3 β is one of the effectors of this pathway. RV was able to increase the inactive form of GSK-3 β (pSer9) protein levels, which reached significance in HF-fed animals

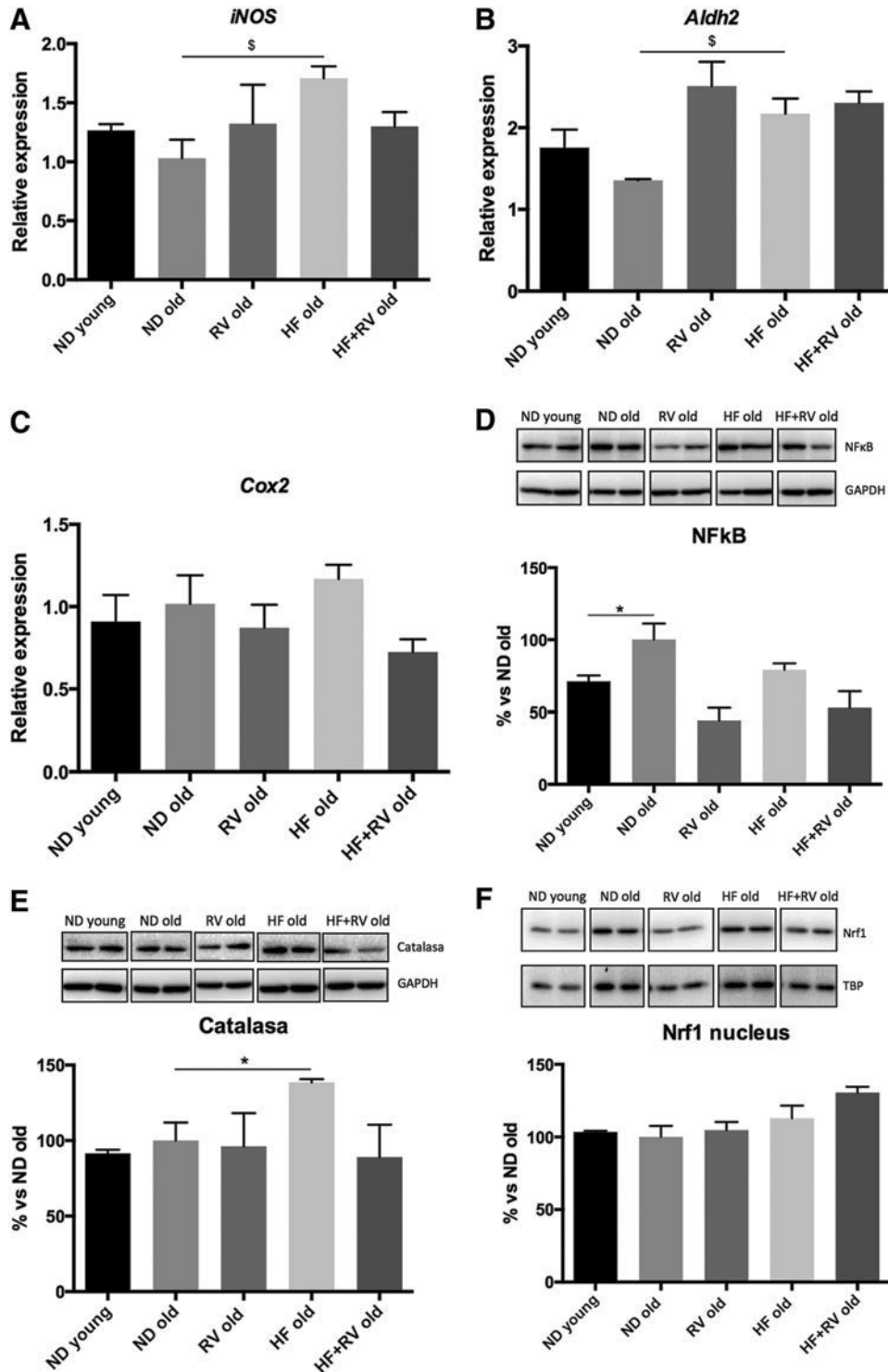


FIG. 5. Oxidative stress markers in young and old mice C57BL/6J. Gene expression levels were determined by reverse transcription PCR. (A) *iNOS*, (B) *Aldh2*, (C) *Cox2*, representative Western blot and quantification for (D) NFkB, (E) Catalase, (F) Nrf1 nucleus, and (G) Nrf1 cytoplasm. Mean \pm SEM performed in triplicate is represented in PCR; for Western blot the values are adjusted to 100% for levels C57BL/6J old with Normal Diet. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$. §Significant differences between ND old groups versus HF and HF+RV groups, $p < 0.05$.

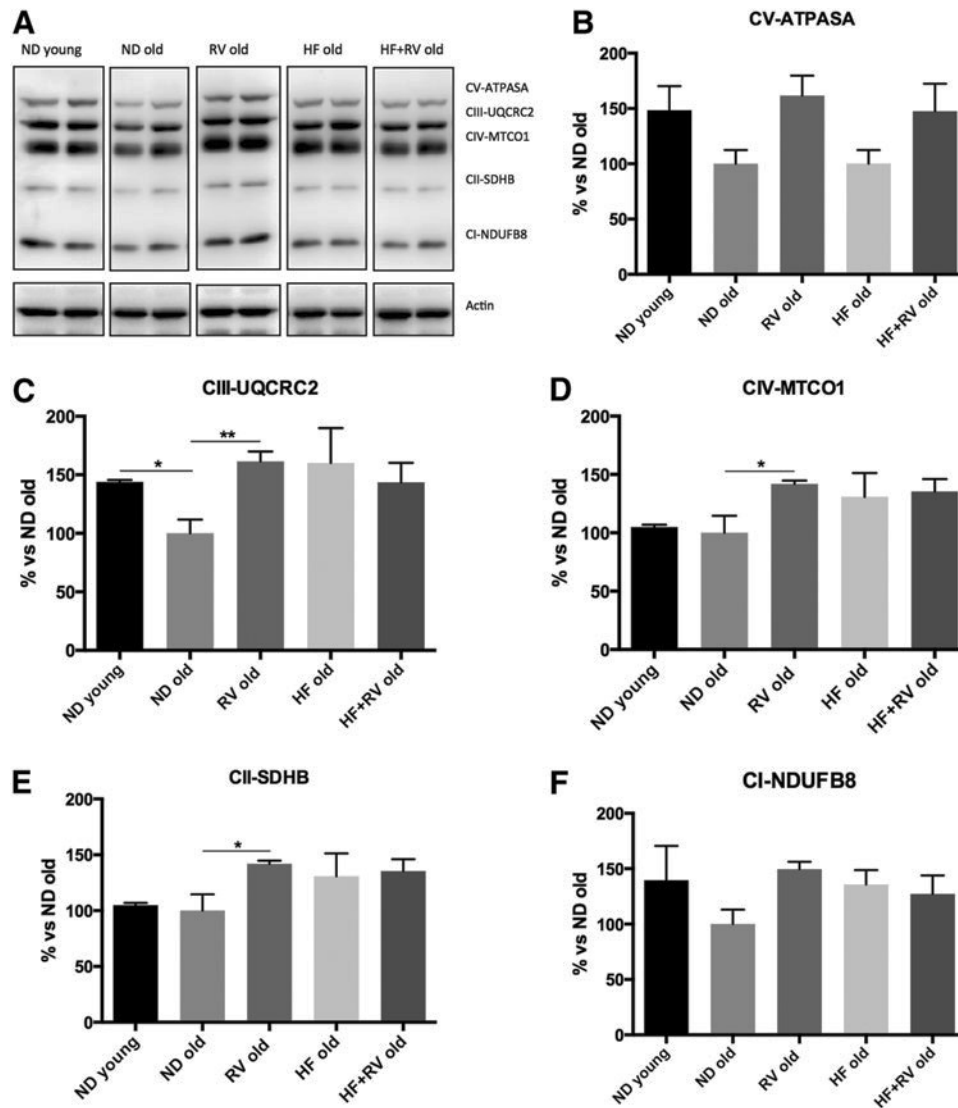


FIG. 6. (A) Representative Western blot OXPHOS and quantifications for (B) CV-ATPASA, (C) CIII-UQCRC2, (D) CIV-MTCO1, (E) CII-SDHB, (F) CI-NDUFB8, (G) OPA1, (H) Mitofusin1, and (I) DRP1 in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). Bars represent mean \pm SEM, and values are adjusted to 100% for levels C57BL/6J old with Normal Diet. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. §Significant differences between ND old groups versus HF and HF+RV groups, $p < 0.05$.

(Fig. 8A). β -catenin, a target of this kinase through Wnt pathway, was activated in RV-fed animals (both ND and HF diet) (Fig. 8B). In contrast, no changes were observed in DKK or Dvl3 protein levels in the experimental groups of interest (Fig. 8C, D).

Aging and HF were described to induce changes in epigenetic hallmarks. The levels of DNA methylation, DNA Methyltransferases (DNMT), histone demethylases, and Histone DeAcetylases (HDAC), were determined by RT-PCR in all groups (Fig. 9A–E). Global methylation was studied measuring 5 mC levels; we observed that RV reduced 5 mC levels in ND mice (Fig. 9A). DNMT did not exhibit changes with age or diet (Fig. 9B, C). Only a reduction in *Dnmt3b* in the RV group with respect to the ND group was shown in Figure 9C. In *Hdac1* expression levels,

there were no significant results (Fig. 9D). Conversely, *Hdac2* showed an increase in gene expression in old ND animals in reference to young mice, and RV was able to revert gene expression to young mouse levels (Fig. 9E).

Discussion

Reductions in specific cognitive abilities, such as mental speed, executive function, and episodic memory, are commonly experienced in aging.²⁸ The excessive production of ROS is associated with inflammation,²⁹ and aged rodents exhibited exaggerated neuroinflammation and memory deficits in response to OS.³⁰ We found a clear inflammatory landscape in hippocampus in old in comparison with young mice, which could be the consequence of the OS condition

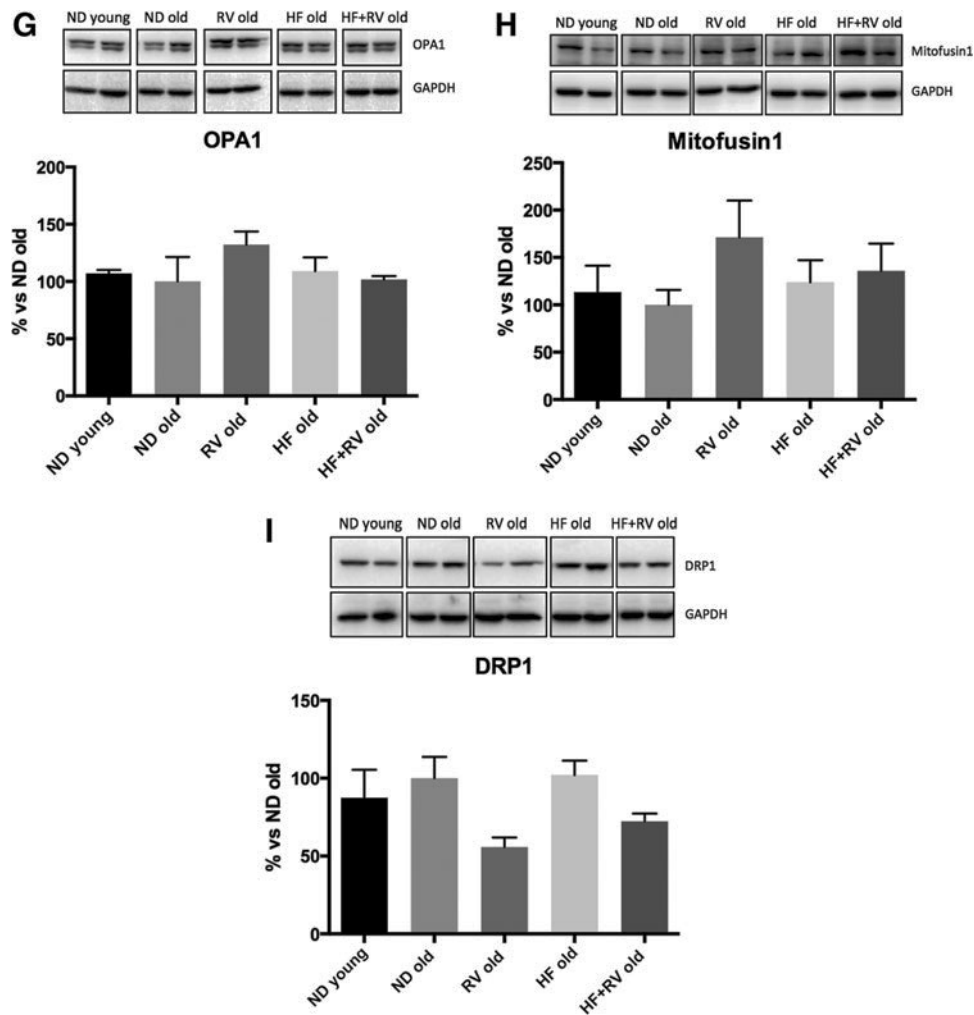


FIG. 6. (Continued)

in aged animals, finally rendering cognitive impairment. Furthermore, old mice showed a decrease in Neurod6 and PGC-1alpha, which are described as physiological energetic sensors.

In reference to behavior parameters, in the NORT test, a drop was demonstrated in DI values obtained in HF-fed mice after NORT in comparison with young and old animals. RV was able to prevent cognition impairment in HF-fed mice. MWM results reinforced the effect of RV, but did not evidence significant changes among untreated animals, probably due to the physical condition of aged animals. OFT evaluates motor activity, but also assesses disinhibition behavior based on the aversion of mice to open spaces. HF induced disinhibition behavior in reference to ND-fed mice that was reversed by RV. Dementia can be gated to this disinhibition, and AD models have shown increased disinhibition.^{31,32} Thus metabolic stress induced by HF led to behavior and cognitive disturbances in C57BL/6J old mice that were prevented by RV.

However, enzymes related with OS (iNOS, CAT, COX2) did not exhibit significant differences between young and old animals, although in a number of parameters measured, distinct tendencies can be observed, indicating that at older ages, a standby point in oxidative markers appears to be

achieved in this strain. Accordingly, no significant changes were found in Nrf1 described as a transcription factor that controls the basal and induced expression, regulating the physiological and pathophysiological outcomes of oxidant exposure.

Because we studied aged animals, based on an impaired condition, it should be feasible to hypothesize that aging reduced the possibility that HF delivered a high degree of metabolic-stress impairment, consequently high OS, as reported by several authors in different animal models at younger ages.^{7,8,23}

Inducing metabolic stress in the 24-month-old C57BL/6J strategy exhibited significant changes in several oxidative markers, including iNOS and CAT, but none were found in Aox1, Aldh2, Cox2, or Nrf1. RV did not induce effective changes in oxidant parameters, except for Aldh2, an enzyme implicated in detoxifying aldehydes that accumulate through metabolism.^{33,34} It is suggested that Aldh2 dysfunction may contribute to a variety of human diseases, including cardiovascular diseases, diabetes, neurodegenerative diseases, stroke, and cancer. The high degree of dispersion did not allow us to determine changes in *iNOS* or CAT expression in RV-fed mice.

Despite the weak OS process present in our model, pro-inflammatory activity, a process tightly bound to OS,²³ was

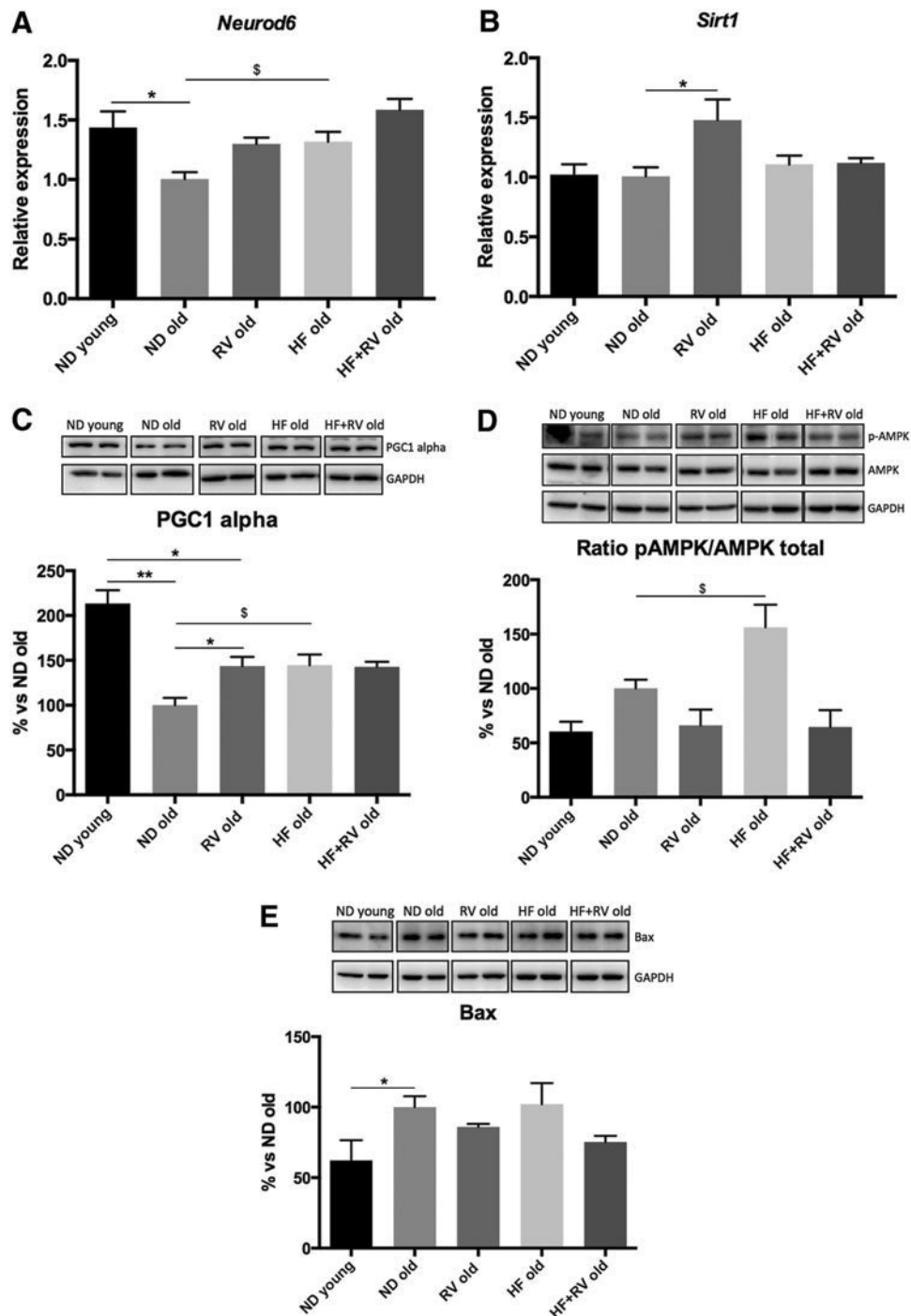


FIG. 7. Gene expression for (A) *Neurod6* and (B) *Sirt1* and representative Western blot and quantifications for (C) PGC-1 alpha, (D) Ratio pAMPK/AMPK total, (E) Bax in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). Mean \pm SEM performed in triplicate is represented in PCR; for Western blot the values are adjusted to 100% for levels C57BL/6J old with ND. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. \S Significant differences between ND old groups versus HF and HF+RV groups, $p < 0.05$.

demonstrated in aged animals. Inflammation comprises a defensive response to a number of insults, including an oxidative environment.³⁵ Therefore, the presence of an inflammatory response confirmed an oxidative process in the hippocampus of HF-fed mice. Moreover, the inflammatory

process determined might be based on the cognitive decline demonstrated by NORT test in old animals and to a higher degree in metabolically stressed C57BL/6J with respect to young ND mice. This supports that inflammation was induced by OS. RV, an antioxidant that is a well-known and

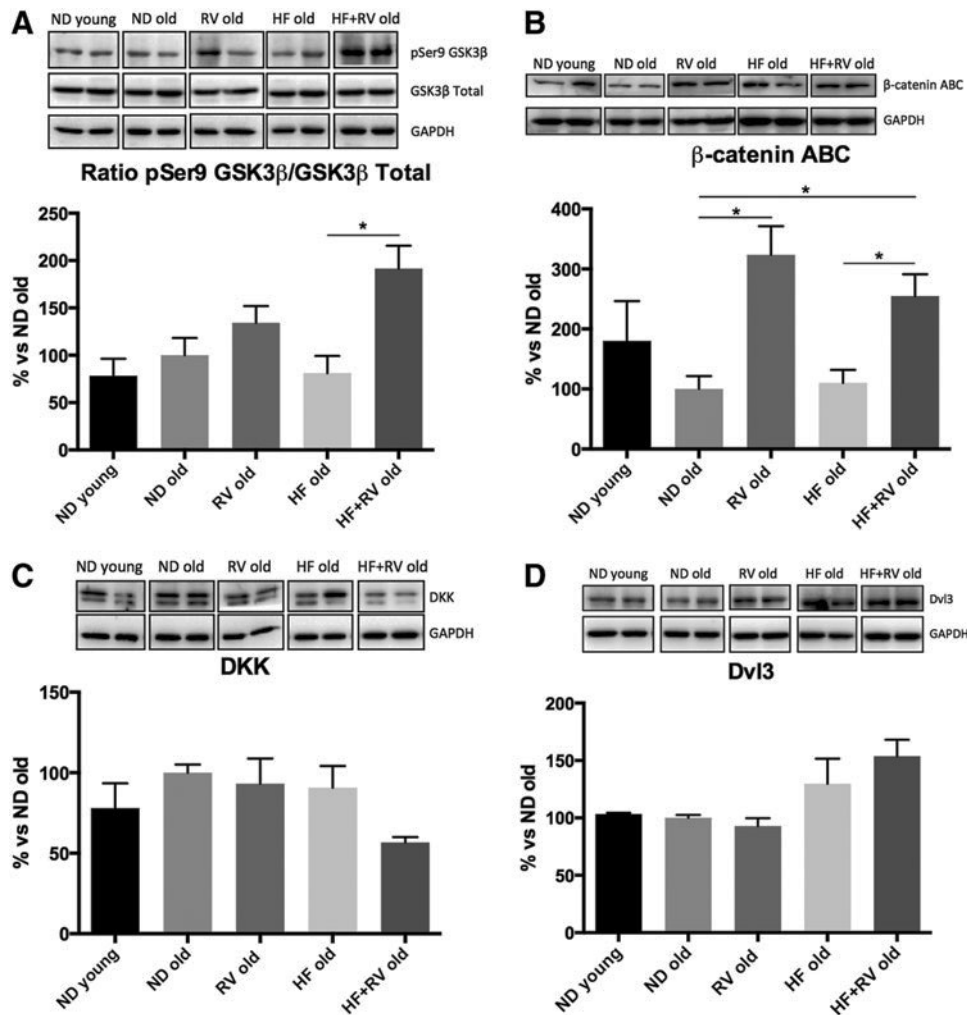


FIG. 8. Representative Western blot and quantifications for (A) Ratio p-Ser9-GSK3 β /GSK3 β , (B) β -catenin ABC, (C) DKK, and (D) Dvl3 in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). In Western blot, bars represent mean \pm SEM, and values are adjusted to 100% for levels C57BL/6J old with ND. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$.

well-characterized compound,³⁶ was able to prevent increases in the majority of the inflammation markers evaluated in this study. Therefore, the effect of RV on the inflammation process was demonstrated by a reduction in the gene expression of a number of pro-inflammatory cytokines (*TNF- α* , *Cxcl-10*, *IL-1*, *IL-6*, and *Ccl3*).

Metabolic stress induced by HF has been described as affecting the mitochondrial respiratory chain.^{8,23} When OXPHOS chain protein elements were studied, we did not find changes in the HF compared with the ND group. However, we found changes in CII-SDHB, CIII-UQCRC2, and CIV-MTCO1 complexes in RV treatment. These results agree with those obtained in previous works^{8,37} and demonstrated that RV exerts consistent action on mitochondrial function.

The influence of metabolic stress and the effect of the polyphenol RV, inducing significant changes in mitochondrial function, were reinforced through Sirt1-AMPK-PGC-1 α axis alteration. AMPK is a sensor key that controls

PGC-1 α activity. Results in these cellular components exhibited significant changes among young animals, old mice, and HF-fed mice. Thus, we can conclude that, although no changes in OXPHOS protein content were determined, there was mitochondrial dysfunction in aged animals. These changes were more marked in HF diet animals than in ND mice. RV was able to revert AMPK phosphorylation and achieve young animal phosphorylation levels. It was demonstrated that RV can act as a direct activator of AMPK.^{22,38} In our hands, apart from the antioxidant role of RV, we also demonstrated the ability of RV to act on AMPK-PGC-1 α axis activation and on its correlation with improvement in cognition.

SIRT1 plays a role in metabolic rate; it may be implicated in the regulation of neuronal survival³⁹ and its over-expression in the extended life span⁴⁰ induced general cognitive enhancement and protected against AD pathology in mice.⁴¹ Sirtuins are a family of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylases that are implicated in a

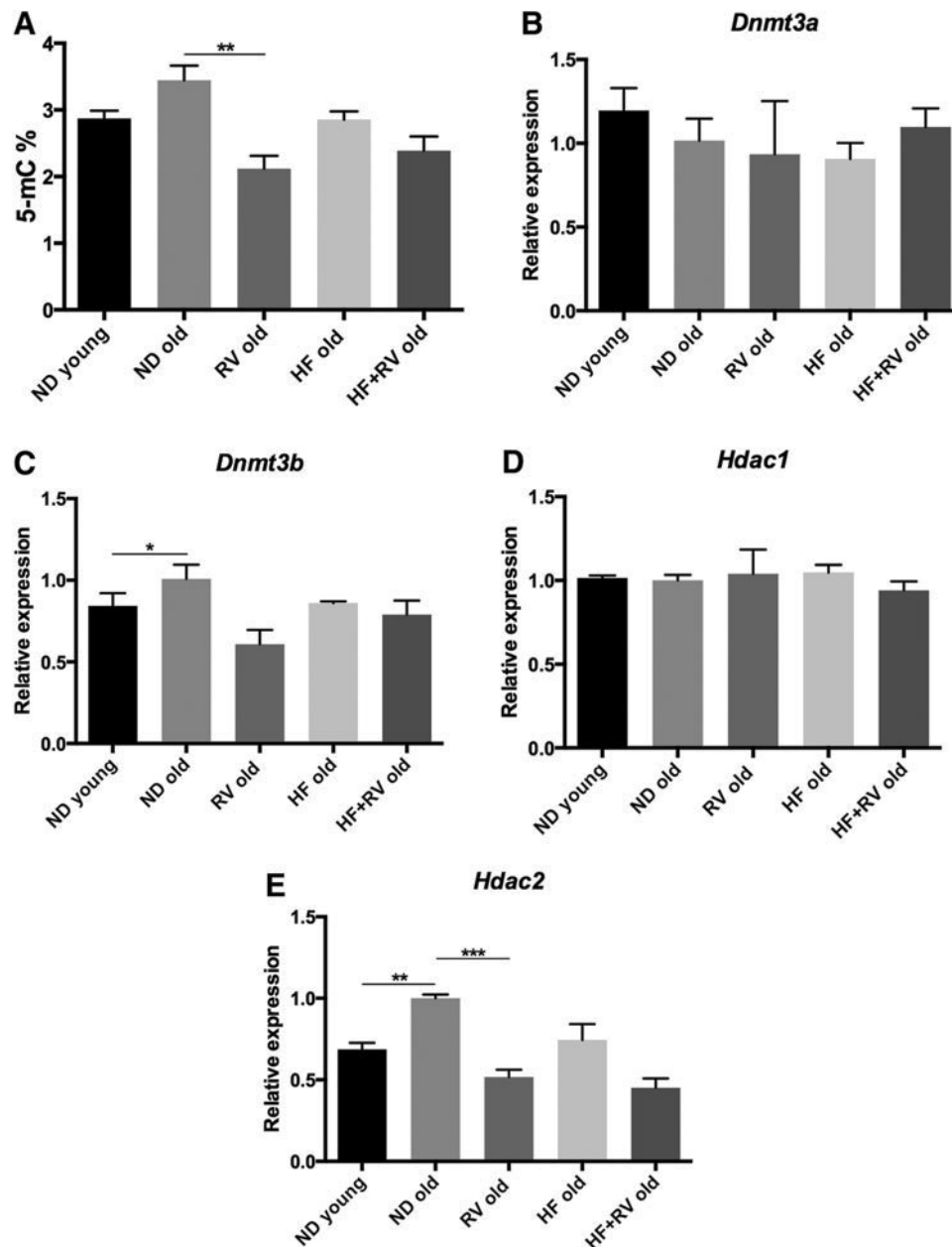


FIG. 9. (A) Global 5-methylated cytosine and gene expression for (B) *Dnmt3a*; (C) *Dnmt3b*; (D) *Hdac1*; and (E) *Hdac2* in C57BL/6J young and old fed with normal diet (ND young $n=12$ and ND old $n=9$), resveratrol (RV old $n=9$), high-fat diet (HF old $n=11$), or high-fat diet plus resveratrol (HF+RV old $n=9$). Gene expression levels were determined by reverse transcription PCR. Mean \pm SEM performed in triplicate are represented. For compared groups, we did ANOVA One way. *Significant differences between ND old groups versus ND young and RV groups, $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

number of physiological and pathological processes, as the control of glucose and in lipid metabolism, cancer, genomic stability, and DNA repair. In reference to the third pillar of the metabolic sensor, Sirt1-AMPK-PGC-1 α , we found an increase in the protein levels of SIRT1 solely in RV-fed aged animals, but not in the remainder of the experimental groups. This uniquely indicates that there were no alterations in protein expression, but does not discard changes in its activity, as will be expected by changes in AMPK phosphorylation levels, which indicate the activation levels of this kinase through LKB deacetylation.^{42,43} In this re-

spect, RV is also described as an activator of SIRT1 and as being able to modify cellular response through AMPK activation.⁴²

Consequently, optimal control of OS and the action on SIRT1 and AMPK tandem by RV produced a significant reduction in inflammation processes in old and in metabolically stressed old mice.

Recently, workers at the Chiamarello laboratory have launched the idea of the concept of NeuroD6-PGC-1 α -SIRT1 as a neuroprotective axis that may be critical in coordinating mitochondrial functioning and the antioxidant

reserve, affording cellular resilience to OS. In their work, these authors demonstrated that NeuroD6 is implicated in maintaining mitochondrial mass, intracellular ATP levels, and the expression of specific subunits of respiratory complexes under conditions of OS.¹⁸ NeuroD6 is able to maintain PGC-1 α and also *Sirt1* expression, among other mitochondrial factors implicated in proliferation and OS. Moreover, NeuroD6 plays an intracellular ROS scavenger role in cells. In old animals, there was a diminution of NeuroD6 gene expression that RV is able to prevent, and this correlated with the effects observed for mitochondrial functioning, such as PGC-1 α and AMPK levels, oxidative markers (*Mcp1*), Wnt pathway (catenin), and Bax.

Recent studies have suggested that epigenetic mechanisms play an important role in the initiation and development of senescence. The methylation of DNA comprises one of the end points for epigenetic effectors and was commonly related with OS and inflammation processes in aging.¹⁰ It was recently reported that Dnmt3b plays a role in cognitive decline in subjects with mild cognitive impairment.^{18,44,45} In this study, methylation levels in old animals were increased and normalized to young animal values by RV. In contrast, we found weak changes in DNA methylation enzymes that achieved a spurious significance among experimental groups. Histone deacetylases have been implicated in memory and cognition, and concretely, HDAC2 plays a central role in coupling lysine acetylation with synaptic plasticity.⁴⁶ Results demonstrated an increase in *Hdac2* gene expression in old animals compared with younger ones, and notably, RV was able to reduce this deacetylase expression in both groups of old mice. In addition to cytosolic deacetylase activity, as we previously pointed out, SIRT1 is also an enzyme participating in histone deacetylation and then in the epigenetic control of gene expression,⁴⁷ and RV was able to increase *Sirt1* expression in RV-fed old mice.

Therefore, epigenetic markers strongly depend on the inflammatory response, which was present in the C57BL/6J cohorts studied herein. RV was able to modify 5 mC and Dnmt3b levels in ND old animals, indicating that an antioxidant intervention, such as RV, produces an anti-inflammatory effect and could modify epigenetic patterns as described by other authors.^{48–50}

Because several findings suggested that OS resulted in an imbalance between DNA methylation and demethylation and histone acetylation and deacetylation associated with the activation of transcription factors when RV modifies OS may modify the expression of antioxidant enzymes, rendering a low oxidative level, and the expression of pro-inflammatory cytokines, controlling inflammatory processes under specific experimental conditions such as those demonstrated in the present work. Taking into account the effects on several cellular mechanisms for fighting against aging, the effect of RV on senescence and on metabolic stress during aging might be explained by a diminution in OS, which rebounds in the improvement of the inflammation process, energetic imbalance control, and finally, in epigenetic changes.

In conclusion, we demonstrated how RV induced a coordinated network of defense mechanisms against metabolic stress in the older animals, namely, it protects against old age frailty, promoting neuronal rejuvenation. Therefore, it is warranted to pursue on the study of RV brain neuroprotec-

tive mechanisms to identify a feasible target to be addressed for healthy aging.

Acknowledgments

This study was supported by Spanish MINECO (SAF-2016-33307) and the European Regional Development Fund. CG-F and M-P belong to 2014SGR 525 and CS to 014SGR625 from AGAUR, Catalonia. The authors thank Maggie Brunner, MD, for reviewing the language and style of the article.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. World Population Ageing 2015 (ST/ESA/SER.A/390). 2015. Available at www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf
2. Petersen KS, Smith C. Ageing-associated oxidative stress and inflammation are alleviated by products from grapes. *Oxid Med Cell Longev* 2016. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1155/2016/6236309.
3. De Felice FG, Lourenco MV. Brain metabolic stress and neuroinflammation at the basis of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2015;7:94.
4. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014;1842:1240–1247.
5. Hagberg H, Mallard C. Effect of inflammation on central nervous system development and vulnerability. *Curr Opin Neurol* 2005;18:117–123.
6. Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, Carlson GC, Browne CA, Kazi H, Bang S, Choi BR, Chen Y, McMullen MF, Kim SF. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis* 2014;67:79–87.
7. Petrov D, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, Casadesús G, Beas-Zarate C, Carro E, Ferrer I, Vazquez-Carrera M, Folch J, Camins A. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:1687–1699.
8. Palomera-Avalos V, Griñán-Ferré C, Puigoriol-Illamola D, Camins A, Sanfeliu C, Canudas AM, Pallàs M. Resveratrol protects SAMP8 brain under metabolic stress: Focus on mitochondrial function and Wnt pathway. *Mol Neurobiol* 2016. [Epub ahead of print]; DOI:10.1007/s12035-016-9770-0.
9. Farias N, Ho N, Butler S, Delaney L, Morrison J, Shahrzad S. The effects of folic acid on global DNA methylation and colonosphere formation in colon cancer cell lines. *J Nutr Biochem* 2015;26:818–826.
10. Vucetic Z, Kimmel J, Reyes TM. Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of μ -opioid receptor in the brain. *Neuropsychopharmacology* 2011;36:1199–1206.
11. Gu X, Sun J, Li S, Wu X, Li L. Oxidative stress induces DNA demethylation and histone acetylation in SH-SY5Y cells: Potential epigenetic mechanisms in gene transcription in A β production. *Neurobiol Aging* 2012;34:1069–1079.

12. Sanchez-Mut JV, Graff J. Epigenetic Alterations in Alzheimer's Disease. *Front Behav Neurosci* 2015;9:347.
13. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Aging Res Rev* 2003;2:245–261.
14. Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 2006;26:5888–5893.
15. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 1999;2:260–265.
16. Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH. Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:780–785.
17. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 2005;25:8680–8685.
18. Uittenbogaard U, Baxter KK, Chiaramello A. The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 confers tolerance to oxidative stress by triggering an antioxidant response and sustaining the mitochondrial biomass. *ASN Neuro* 2010;2:e00034.
19. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006;127:1109–1122.
20. Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C. Resveratrol: New avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des* 2013;19: 6726–6731.
21. Porquet D, Griñán-Ferré C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, Pallàs M. Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 2014;42:1209–1220.
22. Fullerton MD, Steinberg GR. SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol. *Diabetes* 2010;59:551–553.
23. Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS. Resveratrol attenuates obesity-associated peripheral and central inflammation and improves memory deficit in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2012;61:1444–1454.
24. Ayala JE, Samuel VT, Morton GJ, Obici S, Croniger CM, Shulman GI, Wasserman DH, McGuinness OP; NIH Mouse Metabolic Phenotyping Center Consortium. Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech* 2010;3:525–534.
25. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988;31:47–59.
26. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 2006;1:848–858.
27. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 1934;8:385–403.
28. Fjell AM, McEvoy L, Holland D, Dale AM, Walhovd KB, for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol* 2014;117:20–40.
29. Fischer R, Maier O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: Role of TNF. *Oxid Med Cell Long* 2015. [Epub ahead of print]; DOI: 10.1155/2015/610813.
30. Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. *FASEB J* 2005;19: 1329–1331.
31. Prior M, Chiruta C, Currais A, Goldberg J, Ramsey J, Dargusch R, Maher PA, Schubert D. Back to the future with phenotypic screening. *ACS Chem Neurosci* 2014;5: 503–513.
32. Currais A, Goldberg J, Farrokhi C, Chang M, Prior M, Dargusch R, Daugherty D, Armando A, Quehenberger O, Maher P, Schubert D. A comprehensive multiomics approach toward understanding the relationship between aging and dementia. *Aging* 2015;7:937–955.
33. Ohta S, Ohsawa I, Kamino K, Ando F, Shimokata H. Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1011:36–44.
34. Chen CH, Batista-Ferreira JB, Gross ER, Mochly-Rosen D. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: New therapeutic opportunities. *Physiol Rev* 2014;94:1–34.
35. Kriz J. Inflammation in ischemic brain injury: Timing is important. *Crit Rev Neurobiol* 2006;18:145–157.
36. Tung BT, Rodríguez-Bies E, Talero E, Gamero-Estévez E, Motilva V, Navas P, López-Lluch G. Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Exp Gerontol* 2015; 64:1–7.
37. De Oliveira MR, Nabavi SF, Manayi A, Daglia M, Hajheydari Z, Nabavi SM. Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta* 2016;1860:727–745.
38. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couter D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-caloric diet. *Nature* 2006; 444:16.
39. Cardinale A, de Stefano MC, Mollinari C, Racaniello M, Garaci E, Merlo D. Biochemical characterization of sirtuin 6 in the brain and its involvement in oxidative stress response. *Neurochem Res* 2015;40:59–69.
40. Duan W. Sirtuins: From metabolic regulation to brain aging. *Front Aging Neurosci* 2013;5:36.
41. Corpas R, Revilla S, Ursulet S, Castro-Freire M, Kaliman P, Petegnief V, Giménez-Llort L, Sarkis C, Pallàs M, Sanfeliu C. SIRT1 overexpression in mouse hippocampus induces cognitive enhancement through proteostatic and neurotrophic mechanisms. *Mol Neurobiol* 2016; [Epub ahead of print], DOI: 10.1007/s12035-016-0087-9.
42. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y. AMPK and SIRT1: A long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E751–E760.
43. Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab* 2012;15:675–690.

44. Chouliaras L, Kenis G, Visser PJ, Scheltens P, Tsolaki M, Jones RW, Kehoe PG, Graff C, Girtler NG, Wallin ÅK, Rikkert MO, Spuru L, Elias-Sonnenschein LS, Ramakers IH, Pishva E, van Os J, Steinbusch HW, Verhey FR, van den Hove DL, Rutten BP. DNMT3A moderates cognitive decline in subjects with mild cognitive impairment: Replicated evidence from two mild cognitive impairment cohorts. *Epigenomics* 2015;7:533–537.
45. Córdova-Palomera A, Fatjó-Vilas M, Kebir O, Gastó C, Krebs MO, Fañanás L. Polymorphic variation in the epigenetic gene DNMT3B modulates the environmental impact on cognitive ability: A twin study. *Eur Psychiatry* 2015; 30:303–308.
46. Penney J, Tsai LH. Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci Signal* 2014;7:re12.
47. Heyward FD, Gilliam D, Coleman MA, Gavin CF, Wang J, Kaas G, Trieu R, Lewis XJ, Moulden J, Sweatt JD. Obesity weighs down memory through a mechanism involving the neuroepigenetic dysregulation of Sirt1. *J Neurosci* 2016;36: 1324–1335.
48. Junien C. Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. *J Inherit Metab Dis* 2006;29: 359–365.
49. Farghali H, Canová NK, Lekic N. Resveratrol and related compounds as antioxidants with an allosteric mechanism of action in epigenetic drug targets. *Physiol Res* 2013;62: 1–13.
50. Sezgin Z, Dincer Y. Alzheimer's disease and epigenetic diet. *Neurochem Int* 2014;78:105–116.

Address correspondence to:

Mercè Pallàs

Pharmacology Section

Department of Pharmacology, Toxicology

and Therapeutic Chemistry

Institute of Neuroscience

University of Barcelona

Avinguda Joan XXIII s/n

Barcelona 08028

Spain

E-mail: pallas@ub.edu

Received: September 22, 2016

Accepted: November 21, 2016

Publicación 3

Resveratrol Modulates Response Against An Acute Inflammatory Stimuli In Aged Mouse Brain

Palomera-Ávalos V, Griñán-Ferré C, Izquierdo V, Camins A, Sanfeliu C,
Canudas AM, Pallàs M.

Experimental Gerontology

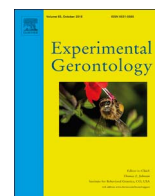
(Aceptado; Noviembre 2017)

RESUMEN

Con la edad, la capacidad del organismo para luchar contra estímulos nocivos disminuye y éste se vuelve más susceptible a infecciones y enfermedades. Durante el proceso de envejecimiento hay un cambio en el cerebro hacia un estado pro-inflamatorio que conduce a un aumento crónico en la activación de las células microgliales. El objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto del resveratrol en ratones viejos haciendo que aumentaran las defensas en el cerebro contra el lipopolisacárido (LPS).

Los resultados mostraron que la inyección aguda de LPS indujo un efecto fuerte pro-inflamatorio en el hipocampo de ratones C57BL/6J de 24 meses de edad, aumentando la expresión génica de Interleucina-6 (*IL-6*), el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF- α*), *IL-1 β* , la quimiocina 10 con motivo CXC (*Cxcl10*) y el interferón gamma (*IFN- γ*). Las proteínas estudiadas en el estrés oxidativo no mostraron cambios importantes, aunque el factor de transcripción NRF2 se incrementó de manera significativa en los ratones controles con resveratrol, además se observó un incremento en la expresión del gen *mt1* que es controlado por el factor de transcripción NRF1 en animales tratados con LPS. Por otro lado, los marcadores de estrés del Retículo Endoplasmático (ER) mostraron cambios significativos en ratones tratados con resveratrol, tanto en el control como después del tratamiento con LPS, específicamente en la fosforilación de la proteína de factor de iniciación eucariótica 2 alfa (*eIF2 α*), la proteína de unión chaperona (BiP) y el factor de transcripción activador 4 (ATF4).

Además, el resveratrol inhibió la ruta de diana de la rapamicina (mTOR) reduciendo también los niveles de fosforilación de la proteína p70S6K1, este efecto podría estar relacionado con la fosforilación de eIF2 α y el aumento en la expresión de los genes pro-inflamatorios mencionados anteriormente como respuesta a la dosis aguda con LPS en ratones viejos. En conclusión, el tratamiento con resveratrol indujo un mayor mecanismo de resiliencia en animales envejecidos cuando se enfrentaron a un estímulo inflamatorio agudo.



Resveratrol modulates response against acute inflammatory stimuli in aged mouse brain

V. Palomera-Ávalos^a, C. Griñán-Ferré^a, V. Izquierdo^a, A. Camins^a, C. Sanfeliu^b, A.M. Canudas^a, M. Pallàs^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry (Pharmacology Section), Institute of Neuroscience, CIBERNED, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB), CSIC, and IDIBAPS, 08036 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Section Editor: Christian Humpel

Keywords:

Inflammation

Cytokines

eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2)

mTOR

iNOS

Aging

ABSTRACT

With upcoming age, the capability to fight against harmful stimuli decreases and the organism becomes more susceptible to infections and diseases. Here, the objective was to demonstrate the effect of dietary resveratrol in aged mice in potentiating brain defenses against LipoPolySaccharide (LPS). Acute LPS injection induced a strong proinflammatory effect in 24-months-old C57/BL6 mice hippocampi, increasing InterLeukin (*IL*)-6, Tumor Necrosis Factor-alpha (*Tnf-α*), *IL-1β*, and C-X-C motif chemokine (*Cxcl10*) gene expression levels. Resveratrol induced higher expression in those cytokines regarding to LPS. Oxidative Stress (OS) markers showed not significant changes after LPS or resveratrol, although for resveratrol treated groups a slight increment in most of the parameters studies was observed, reaching signification for NF-κB protein levels and iNOS expression. However, Endoplasmic Reticulum (ER) stress markers demonstrated significant changes in resveratrol-treated mice after LPS treatment, specifically in eIF2α, BIP, and ATF4. Moreover, as described, resveratrol is able to inhibit the mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) pathway and this effect could be linked to (eIF2α) phosphorylation and the increase in the expression of the previously mentioned proinflammatory genes as a response to LPS treatment in aged animals. In conclusion, resveratrol treatment induced a different cellular response in aged animals when they encountered acute inflammatory stimuli.

1. Introduction

Aging is a progressive process that is strongly associated with activation of inflammatory mechanisms. With upcoming age, the organism's capability to fight against harmful stimuli decreases, becomes more susceptible to infections and diseases. Chronic low-grade inflammation is present in aged organisms and is related to the loss in efficacy of homeostatic mechanisms and with a decrease in resilience (Mattsson et al., 2016; Faye et al., 2017; Sampedro-Piquero et al., 2017). Age-related changes in immune homeostasis are characterized by the activation of several key inflammatory mediators, including Nuclear Factor-kappa Beta (NF-κB) and cytokines, among others. This inflammatory landscape, which characterizes advanced age, is termed inflammaging (Franceschi et al., 2000a,b; Cevenini et al., 2013). This phenomenon is caused by a continuous antigenic load and stress. Inflammaging has been also related to changes associated with age, such as genotoxic and oxidative events and gut microbiota composition (Kim et al., 2016). In addition to inflammation, aging is strongly associated

with Oxidative Stress (OS) in general and with Endoplasmic Reticulum (ER) stress in particular.

It is accepted that the main traits of the harmful event gated to aging include the incapacity to confront this event with a variety of stressors and with the inflammaging characteristics defined previously (Franceschi et al., 2000a,b; Leon et al., 2017). The persistence of inflammatory stimuli over time, as occurs in old individuals, favors susceptibility to age-related diseases. This means that with upcoming age, there is a higher probability of developing an inflammatory pathogenesis, such as atherosclerosis, Alzheimer Disease (AD), and diabetes (Negash et al., 2013; Mattsson et al., 2016). In line with this perspective, several paradoxes of healthy centenarians, such as increased levels in plasma cytokines, are illustrative and explain longevity in the absence of disease (Franceschi et al., 2000a,b; Paolisso et al., 2000).

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a polyphenol contained in plant species and it is especially enriched in red fruits (Pallàs et al., 2013). Resveratrol possesses known antioxidant, anti-inflammatory, and other beneficial effects in several systems, including the brain. The

* Corresponding author.

E-mail address: pallas@ub.edu (M. Pallàs).

<https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.11.014>

Received 17 June 2017; Received in revised form 16 November 2017; Accepted 21 November 2017

Available online 24 November 2017

0531-5565/ © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

pleiotropic action is recognized of resveratrol in cardiovascular and neurodegenerative diseases and other inflammatory conditions (Abraham and Johnson, 2009). Calabrese et al. (2010) also classified resveratrol as a hormetic modulator in disease conditions, including inflammation, infection, or neurodegenerative processes.

Resveratrol is of particular interest in the modulation of diseases with an inflammatory component because several studies found it to inhibit the production of Reactive Oxygen Species (ROS) by neutrophils, monocytes, and macrophages (Rotondo et al., 1998; Abraham and Johnson, 2009), as well as the activation of several transcription factors including NF- κ B and Activator Protein-1 (AP-1).

However, little is known about the preconditioning effects of resveratrol against acute insults (Calabrese et al., 2010). The endotoxin LipoPolySaccharide (LPS) is a major component of the outer membranes of Gram-negative bacteria and a chief member of pathogen-associated molecular patterns (Kallapura et al., 2014), which are largely responsible for the majority of the toxic inflammatory reactions described by means of ROS and Reactive Nitrogen Species (RNS); it is also widely used as an immunostimulatory tool to induce systemic inflammation and sepsis. LPS, through a cascade mechanism, stimulates Toll-Like Receptor 4 (TLR4) which acts on NF- κ B, leading to cytokine and interferon activation pathways, which are the main inflammation mediators (Lu et al., 2008). Moreover, LPS through activation of TLR4 is reported to activate ER stress (Masson et al., 2015) that, at the same time, regulates the translation and transcription of proteins related with inflammation and OS, such as eukaryotic Initiation Factor 2 α (eIF2 α) (Toshchakov et al., 2016).

In this study, we investigated changes in cellular response related to dietary resveratrol with respect to acute LPS insult by measuring the protein expression levels of inflammaging markers such as cytokines, NF- κ B, levels of OS, and ER stress markers in aged mice.

2. Animals and treatment

Male C57BL/6J mice 22 months of age were randomized in two experimental groups and, following 8 weeks of treatment, were euthanized under anesthesia. The normal diet (ND; $n = 9$) group had ad libitum access to a standard chow diet (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet; Harlan Teklad, Madison, WI, USA) and tap water; ResVeratrol group (RV; $n = 9$) had access to standard chow diet enriched with the polyphenol (1 g/kg, W/W). Resveratrol chow was formulated to provide daily doses of approximately 160 mg/kg to the mice.

The mice were treated according to European Community Council (ECC) Directive 86/609/EEC and the procedures established by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya, Spain. Every effort was made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in this study.

LPS extracted from *Escherichia coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich, USA) was dissolved in distilled water. The LPS solution was injected intraperitoneally (i.p.) at a dose of 100 μ g/kg. After treatment with RV and ND, the mice were separated in four groups: ND-saline solution; RV-saline solution; ND-LPS; and RV-LPS. Immediately after the injections, the mice were placed in their home cages, where they remained during 3 h until euthanize.

3. Brain isolation and Western blot analysis

Mice were euthanized 3 h after the LPS or saline solution injection and the brain was quickly removed from the skull. Hippocampus was dissected and frozen in powdered dry ice and maintained at -80°C for further use. Tissue samples were homogenized in lysis buffer containing phosphatase and protease inhibitors (Cocktail II; Sigma), and cytosol and nuclear fractions were obtained as described elsewhere. Protein concentration was determined by the Bradford method. Twenty micrograms of protein were separated by Sodium Dodecyl Sulfate-

Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (8–15%) and transferred onto PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% non-fat milk in Tris-Buffered Saline solution containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in TBS-T and 5% Bovine Serum Albumin (BSA) as follows: NF- κ B (1:1000; Cell Signaling); NRF1 (1:500; Santa Cruz); NRF2 (1:1000; Cell Signaling), CATalase (1:1000; Cell Signaling); SOD1 (1:1000; Novus Biologicals); GPX1 (1:1000; Novus Biologicals); IRF3 (1:1000; Novus Biological); BIP (1:1000; Cell Signaling); ATF4 (1:1000; Cell Signaling); phospho-eIF2 α (Ser51) (1:1000, Cell Signaling); total eIF2 α (1:1000; Cell Signaling); mTOR (1:1000; Cell Signaling); total p70S6K1 (1:500; Santa Cruz); phospho-p70S6K1 (1:500; Santa Cruz), Tubulina (1:5000; Cell Signaling) and GAPDH (1:5000; Millipore). Membranes were then washed and incubated with secondary antibodies for 1 h at room temperature. Immunoreactive proteins were visualized utilizing an Enhanced ChemiLuminescence-based detection kit (ECL kit; Millipore) and digital images were acquired employing a ChemiDoc XRS + System (Bio-Rad). Band intensities were quantified by densitometric analysis using Image Lab software (Bio-Rad) and values were normalized to Tubulina and GAPDH.

4. RNA extraction and gene expression determination

Total RNA isolation was carried out by means of Trizol reagent following the manufacturer's instructions. RNA content in the samples was measured at 260 nm, and sample purity was determined by the A260/280 ratio in a NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Samples were also tested in an Agilent 2100B Bioanalyzer (Agilent Technologies) to determine the RNA integrity number. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed as follows: 2 μ g of messenger RNA (mRNA) was reverse-transcribed using the High Capacity (complementary DNA) cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR (qPCR) was utilized to quantify the messenger RNA (mRNA) expression of inflammatory genes InterLeukin 6 and 1 (*Il-6* and *Il-1 β*), Tumor Necrosis Factor alpha (*Tnf- α*), Interferon (INF) gamma (*Ifn- γ*), C-X-C motif chemokine (*Cxcl10*), Aldehyde dehydrogenase 2 (*Aldh2*), inducible Nitric Oxide Synthase (*iNOS*), Cyclooxygenase 2 (*Cox2*), and Hemoxygenase 1 (*Hmox1*), Toll-Like Receptor (*Tlr4*), Metallothionein-1 (*Mt1*), Quinone oxidoreductase-1 (*Nqo1*), and Glutathione S-transferase-1 (*Gstp1*). Normalization of expression levels was performed with actin for SYBR Green and TATA-binding protein (*Tbp*) and *Gapdh* for TaqMan.

The primers used are presented in Table 1. Real-time PCR was performed on the Step One Plus Detection System (Applied Biosystems) employing the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Each reaction mixture contained 7.5 μ L of complementary DNA (cDNA), containing 2 μ g, 0.75 μ L of each primer (whose concentration was 100 nM), and 7.5 μ L of SYBR Green PCR Master Mix (2 \times).

Data were analyzed utilizing the comparative Cycle threshold (Ct) method ($\Delta\Delta\text{Ct}$), where the actin transcript level was employed to normalize differences in sample loading and preparation. Each sample ($n = 4-5$) was analyzed in triplicate, and results represented the n -fold difference of transcript levels among different samples.

5. Statistical analysis

Data are expressed as means \pm Standard error of the mean (SEM). Means were compared with two-way ANalysis Of VAriance (ANOVA) and post-hoc analysis. Statistical significance was considered when p values were < 0.05 . Statistical outliers were carried out with the Grubbs' test and were removed from analysis.

Table 1
Primers and probes used in qPCR studies.

Target SYBER Green	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>Il-6</i>	ATCCAGTTGCCTTCTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
<i>Il-1β</i>	ACAGAATATCAACCAACAAGTGATATTCTC	GATTCCYYCCTTTGAGGCCCA
<i>Tnf-α</i>	TCGGGGTGATCGGTCCCCAA	TGGTTTGCTACGACGTGGGCT
<i>Ifn-γ</i>	CCTTCTTCAGCAACAGCAAGGCG	CTTGGCGCTGGACCTGTGGG
<i>Cxcl10</i>	GGCTAGTCCTAATTGCCCTTGG	TTGTCTCAGGACCATGGCTTG
<i>Aldh2</i>	GCAGGCGTACACAGAAGTGA	TGAGCTTCATCCCTACCCA
<i>iNOS</i>	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	GAAGCGTTTCGGGATCTGAA
<i>Cox2</i>	TGACCCCAAGGCTCAAATA	CCCAGGTCTCTGCTTATGATC
<i>Tlr4</i>	GGTCAAGGAACAGAAGCAG	AGCCTCTCGGATGATGTTG

Target Taqman	Reference
<i>Hmox1</i>	Mm00516005_m1
<i>Mt1</i>	Mm00496660_g1
<i>Nqo1</i>	Mm01253561_m1
<i>Gstp1</i>	Mm04213618_gH
<i>Tbp</i>	Mm00446971_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1

6. Results

6.1. LPS inflammatory pathway and resveratrol effects on aged mice hippocampi

In part, LPS acts by stimulating Toll-Like Receptor 4 (TLR4), inducing the release of critical proinflammatory cytokines that are necessary to activate potent immune responses (Lu et al., 2008). Short-term exposure to LPS (3 h) induced a significant decrease in *Tlr4* gene expression in resveratrol-treated mice hippocampi (Fig. 1A).

Moreover, short-term LPS induced an increase in the gene expression of inflammatory cytokines *Il-6*, *Tnf-α*, *Cxcl-10*, and *Il-1β* in aged mice hippocampus fed with resveratrol (Fig. 1B–E). Only *Tnf-α* and *Cxcl-10* presented a significant increase after LPS injection without resveratrol fed old mice. *Ifn-γ* expression exhibited statistically significant changes after LPS in RV fed group (Fig. 1F). Increased NF-κB protein levels were determined in LPS-RV mice in reference to RV, but no changes were found in ND groups (Fig. 1G). We also evaluated IRF3, a transcription factor gated to IFN-γ signaling, but its levels were not modified among experimental groups (Fig. 1H).

6.2. LPS oxidative stress and resveratrol effects on aged mice hippocampi

We observed slightly increased gene expression in *iNOS*, *Cox2*, *Hmox1*, and *Aldh2* in the ND-LPS and RV-LPS groups (Fig. 2A–D); these increases reached significance only in *iNOS* determination (Fig. 2A). However, we did not find statistical differences in the protein levels of oxidative enzymes SOD1, CATalase (CAT), and Glutathione Peroxidase-1 (GPX-1) in RV fed animals or 3 h after LPS injection (Fig. 2E–G).

On the other hand, we studied NRF1 and NRF2 as transcription factors implicated in OS signaling (Fig. 3A and B). We observed significant changes for NRF2 protein levels between saline and RV-saline group, but not in LPS treated mice groups. By contrast, NRF1 did not exhibit significant changes in saline animals, but a significant increase in NRF1 levels in RV-LPS-treated in reference to RV mice was found. Gene expression of antioxidant enzymes activated by NRF1 and NRF2 were studied. We observed increased expression in *mt1* (Fig. 3C), controlled by NRF1 in ND animals treated with LPS, but not for *nqo1* and *gstp1* (data not shown).

6.3. Effect of LPS on endoplasmic reticulum stress on aged mice hippocampi. Role of resveratrol treatment

To determine whether LPS affects ER stress, phospho-eIF2α, BIP and ATF4 protein levels were performed by Western blot (Fig. 4). Analysis revealed a significant increase for phospho-eIF2α protein levels in the RV-LPS group in comparison with LPS (Fig. 4A and B). BIP demonstrated a significant increase in RV diet in LPS-treated animals, whereas ATF-4 expression was significantly reduced in RV-treated mice under both saline and LPS conditions (Fig. 4C and D). (See Fig. 5.)

We determined the state of the mechanistic Target of Rapamycin mTOR pathway that can be modified by resveratrol. Polyphenol-treated groups showed a significant diminution in mTOR levels after LPS treatment, which corresponds to a significant reduction in phospho-p70S6K (Fig. 4E and F).

7. Discussion

The present assessment was undertaken to evaluate the effect of dietary resveratrol in aged mice, how this effect might potentiate brain defenses against inflammatory insults, and the preventive/therapeutic implications of resveratrol in senescence.

It is known that with upcoming age, individuals have been exposed to stress stimuli, activating stress response-induced gene expression, while the related pathways of maintenance and repair are enhanced, this phenomena denominated hormesis (Rattan, 2001; Calabrese et al., 2015). The hypothesis that we present here is that the presence of resveratrol may condition the acute response to a harmful stimuli by enhancing these defense mechanisms in aged mice.

Endotoxins (LPS) derive from Gram-negative bacteria and comprise the basis for developing Gram-negative shock (Galanos and Freudenberg, 1993). LPS binds the CD14/TLR4/MD2 receptor complex in monocytes, dendritic cells, and macrophages, among others, and is able to deliver an inflammatory response in the brain (Kallapura et al., 2014; Dominiak et al., 2017). Receptor activation promotes the secretion of proinflammatory cytokines, such as TNF-α or several IL, Nitric Oxide (NO), and eicosanoids. As part of the cellular stress response, superoxide is one of the major ROS species induced by LPS in various TLR-expressing cell types (Kaneko et al., 2012).

As expected, LPS injection induces a rapid and strong proinflammatory effect in 24-months-old C57/BL6 mice hippocampi, with an increase in *Il-6*, *Tnf-α*, *Il-1β*, and *Cxcl10* expression levels. Tateda et al.,

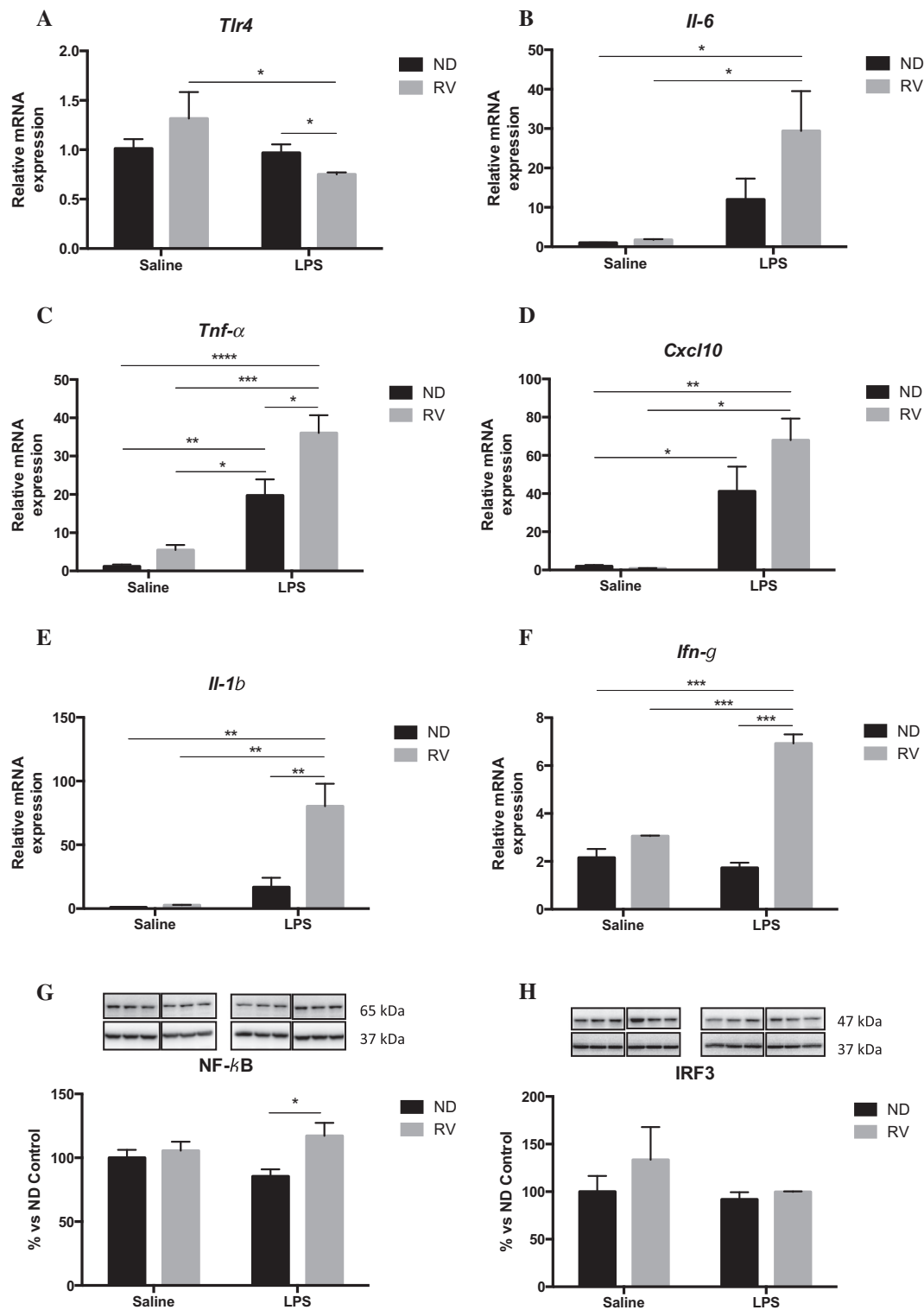


Fig. 1. Gene expression for A, *Tlr4* B, *Il-6* C, *Tnf-α*; D, *Cxcl-10* and E, *Il-1β* F, *Ifn-γ*; and representative Western blot and quantification for G, NF-κB and H, IRF3 in 24-month old C57BL/6J under normal diet (ND) or Resveratrol (RV) and treated with saline or LPS. Gene expression levels were determined by real-time PCR and protein levels by standard for Western blot methodology. Mean ± Standard error of the mean (SEM) performed in triplicate are represented. *p < 0.05; **p < 0.01, ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

1996 observed differences in the levels of proinflammatory cytokines (*Tnf-α*, *If-1β*, *If-6*, and *Ifn-γ*) after i.p. injection of 100 μg per mouse of LPS in younger (6–7-weeks-old) and aged (98–102-weeks-old) mice. Cytokine peak values were significantly higher in older than younger mice. Age-related differences in levels of TNF-α after LPS exposure have also been described by Campbell et al. (2014), these differences probably are due to major sensitivity to inflammatory stimuli due to the age

(Escames et al., 2006). These results indicate that aged mice are more sensitive to high doses of LPS than younger mice. On the other hand, Utsuyama and Hirokawa (2002) studied the effect of LPS on the levels of various cytokine receptors (IL-1RI, IL-6R, TNF-α, IFN-γ) in the brain and compared younger and older mice. These authors found that the magnitude and pattern of cytokine receptor mRNA after LPS stimulation (30 μg or 300 μg) also varied according to the receptor site type,

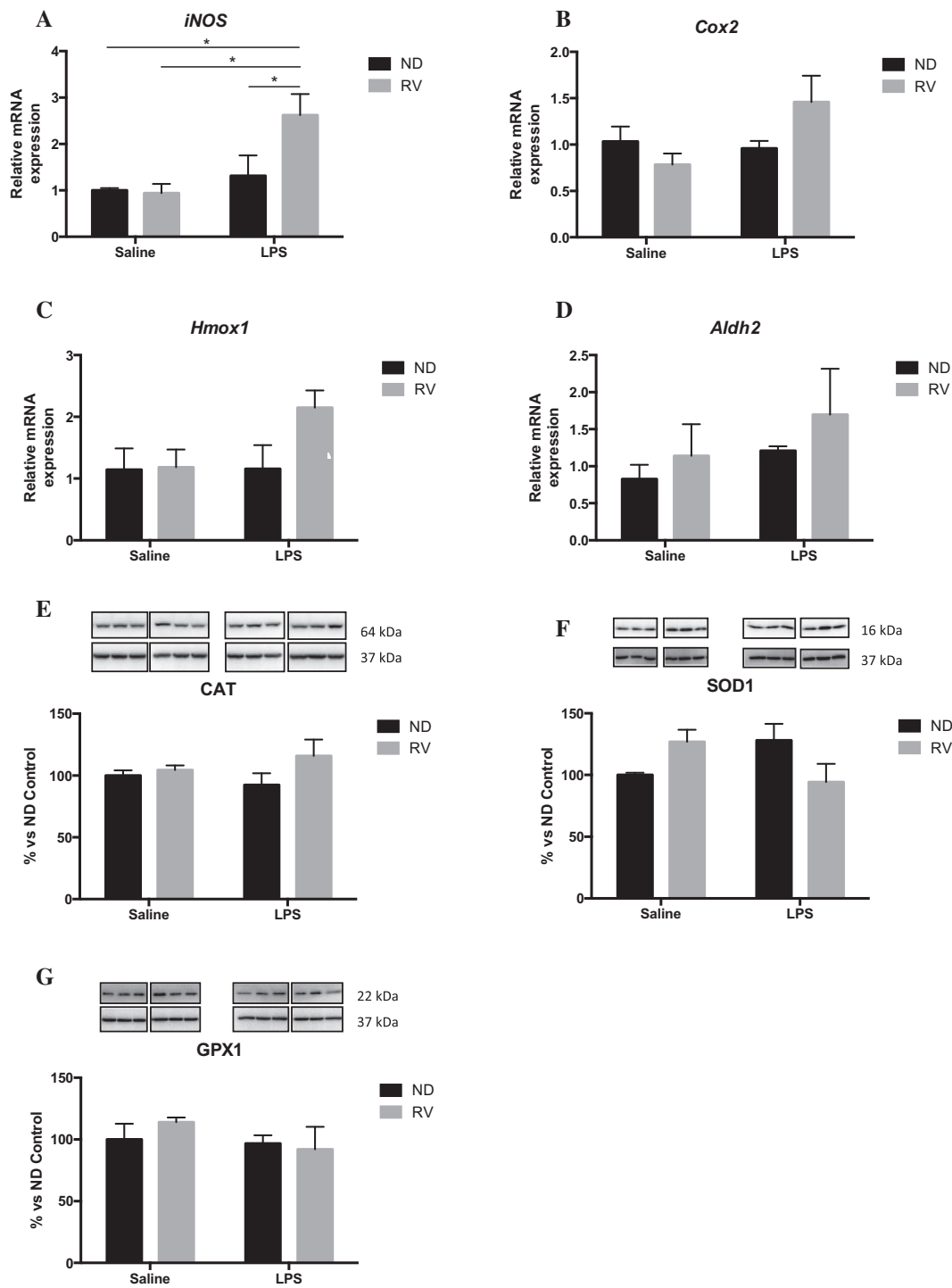


Fig. 2. Oxidative Stress markers in C57BL/6J mice fed normal diet (ND) or Resveratrol (RV) and treated with saline or LPS. Gene expression levels were determined by real-time PCR. A, *iNOS*, B, *Cox2*, C, *Hmox1*, D, *Aldh2*. Representative Western blot and quantification for E, CAT, F, SOD1, G, GPX1. Mean \pm Standard error of the mean (SEM) performed in triplicate are represented. *p < 0.05.

and observed that mRNA for some cytokine receptors were higher in older than in younger mice after LPS stimulation.

In this regard, results in *Il-1 β* expression were different from those obtained by Abraham and Johnson (2009), who found a diminution on this cytokine after LPS-injected mice were treated with resveratrol; this could be explained by the different mouse strain (BALB/c mice) and the LPS dose, 1 μ g vs. the 100 μ g used here. Moreover, these authors only explored one of the cytokines, whereas we studied additional

proinflammatory cytokines; here, the results were consistent with an increase in the inflammaging response obtained in resveratrol-treated mice after LPS administration.

In reference to the neuroprotective role of resveratrol under a proinflammatory stimulus such as LPS, we found that 4-weeks resveratrol-treated old mice revealed an increase in the expression levels for all of the previously mentioned cytokines compared to ND group, indicating a possible preconditioning response induced by chronic dietary

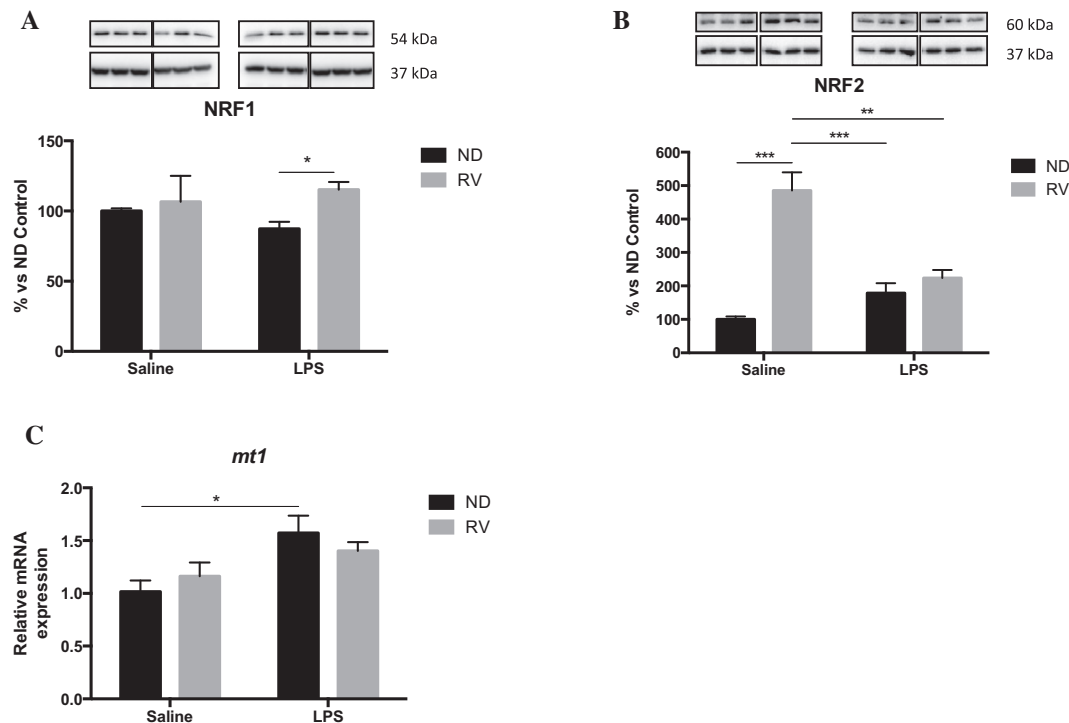


Fig. 3. Representative Western blot and quantifications for A, NRF1; B, NRF2; and gene expression for C, *mt1* in 24-month old C57BL/6J under normal diet (ND) or Resveratrol (RV) and treated with saline or LPS. Protein levels were determined by standard for Western blot methodology and gene expression levels by real-time PCR. Bars represent mean \pm Standard error of the mean (SEM). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

resveratrol administration on repair mechanisms activated by LPS in mice. This was a surprising finding that merited deep analytical focus on some of the pathways associated with the pharmacological activities described for resveratrol and related with LPS activities that we developed in specific determinations on OS and ER stress markers and the mTOR pathway.

Little is known about OS induced by LPS (Dominiak et al., 2017; Le Sage et al., 2017) and, in this regard, results demonstrated that OS produced by acute LPS injection is not significant in the hippocampi of aged mice; subsequently, resveratrol did not exhibit significant effects. Campbell et al. (2014) did not find significant changes in the indices of oxidative or nitrosylative damage in proteins studies induced by LPS treatment 3 h prior to sacrifice. The authors indicated that these indices would not be expected to be rapidly responsive to acute inflammation, and that progressive overall damage to proteins should be expected.

Following OS phenomena, transcriptional regulatory factor NF- κ B, a central participant in modulating the expression of many of the immunoregulatory mediators involved in OS, therefore in sepsis, and NRF1, a transcription factor implicated in the expression of genes encoding antioxidant enzymes, demonstrated to be increased in resveratrol treated animals after LPS injection. Accordingly, as mentioned, discrete changes in oxidative markers, such as *Cox2*, *Hmx1*, *Aldh2*, CAT, SOD, and GPX, were determined in our model but, although the tendencies were consistent, none reached significance after LPS treatment. Not with standing this, NRF2 increased expression in resveratrol-treated mice, but not after LPS treatment. Therefore, according to the results of our study, it cannot be discarded that acute LPS will induce OS at the long term and resveratrol can exert beneficial activity.

Of note, LPS induced a significant increase *iNOS* gene expression in resveratrol-treated mice which is under NF- κ B transcription factor. It is commonly accepted that elevation of NO \cdot can mediate kinase activation that phosphorylates the alpha subunit of eIF2 α , which plays a critical role in regulating gene expression (Tong et al., 2011). Phosphorylation

of eIF2 α reduces protein synthesis, but increases the transcription of specific genes in response to stressors (Liu et al., 2007; Woo et al., 2009; Nakayama et al., 2010). Accordingly, phospho-eIF2 α levels were found increased in resveratrol-fed animals after LPS injection. It is noteworthy that eIF2 α is also related to the activation pathway for LPS, through the TLR4 receptor (Toshchakov et al., 2016). Moreover, the activation of eIF2 α kinases, such as PKR-like ER Kinase (PERK), can be initiated by mitogens or stressors (Donnelly et al., 2013). In a recent work, it was demonstrated that eIF2 signaling is required for the infection-specific activation of NF- κ B and for proinflammatory gene expression. Shrestha et al. (2012) found a clear link between this factor and the increase in cytokine gene transcription, considering cytokines as defense mechanisms, as well as other genes expressed under eIF2 α control after OS, osmotic stress, or ER stress.

Phospho-70S6K and eIF4E-Binding Protein (4E-BP) are two major substrates of mTOR and are key regulators of protein synthesis by targeting eIF4B, eIF4E, and eukaryotic translation Elongation Factor 4 (eEF4). Results showed slightly reduced mTOR level, which are in concordance with a decrease in S6K phosphorylation, demonstrating a regulation of resveratrol in mTOR pathways that can be potentiated by its activity on fine-tuning the cellular response vs. stressor such as LPS.

Phospho-eIF2 signaling is linked to infection-induced cytokine expression (Shrestha et al., 2012), and pretreatment with resveratrol potentiates the phosphorylation of this factor, increasing the defense response against LPS in old mice that, as already described, possess less capability to face stress conditions. It can be suggested that in the senescence environment, resveratrol acts by means of activating pleiotropic cascades, favoring higher responses against harmful stimuli in mice. This could comprise the key point for the resveratrol-induced response to LPS in the brains of aged mice.

On the other hand, it was demonstrated that resveratrol is able to act on mTOR pathway, inhibiting the phosphorylation of mTOR targets S6K1 and eIF4E-BP1 (Villa-Cuesta et al., 2011). In this manner, it was

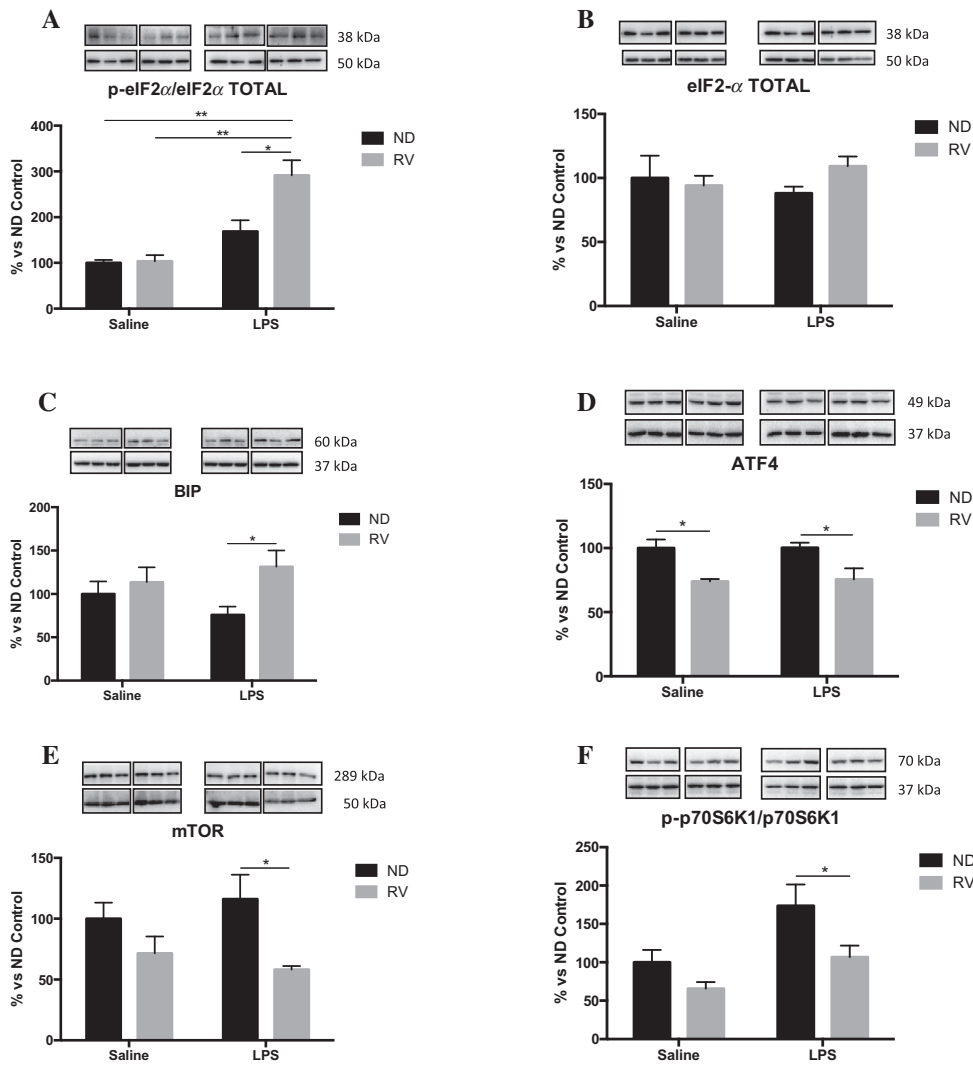


Fig. 4. Representative Western blot and quantifications for A, ratio p-eIF2α/eIF2α, B, total eIF2α. C, BIP. D, ATF4. E, mTOR. F, Ratio p-p70S6K1/p70S6K1 in 24-month old C57BL/6J under normal diet (ND) or Resveratrol (RV) and treated with saline or LPS. In Western blot bars represent mean ± Standard error of the mean (SEM). *p < 0.05; **p < 0.01.

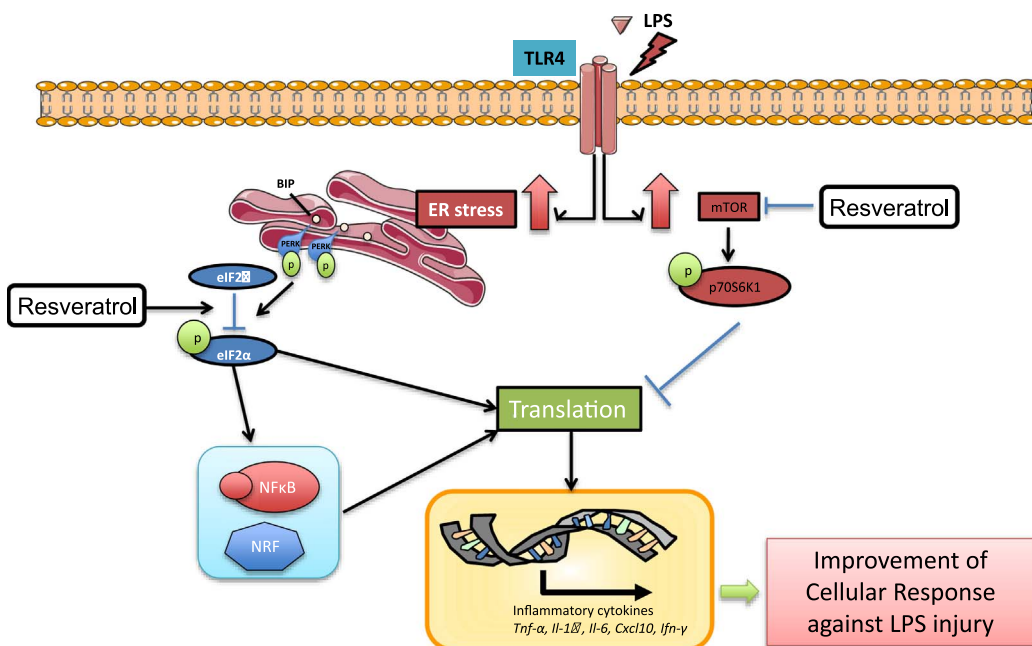


Fig. 5. Representative cartoon with the action of resveratrol in aged mice in front of acute LPS proinflammatory stimuli.

described that resveratrol is able to reduce downstream mTOR signaling. We found diminution in the phosphorylation of S6K1, an mTOR target, induced by resveratrol both in LPS and control groups, demonstrating the feasibility of the treatment to inhibit mTOR signaling.

Because mTOR decreases the translation of mRNA that are upregulated by phospho-eIF2 α (Gandin et al., 2016), resveratrol treatment was able to reduce mTOR signaling, improving the specific translation induced by phospho-eIF2 α , as demonstrated by the increased transcription of cytokines after the inflammatory LPS stimuli. These findings support the inhibitory effect of resveratrol on mTOR kinase activity and point to this kinase as the cornerstone of proactive response with regard to LPS treatment in resveratrol-treated animals vs. control. In this way, resveratrol induced changes in mTOR pathway which predisposes mice to possess best cellular defense performance when confronted with acute inflammatory insults, this occurring in mice that, due to the age, exhibited a reduced capability to face cellular damage.

Taking into account that the inflammatory response is delivered to face an infection, resveratrol increases this response in a hormetic mechanism described for this polyphenol under other circumstances (Oliva et al., 2013; Blagosklonny, 2011; Martins et al., 2011; Chirumbolo, 2011). The neuroprotective effect of resveratrol vs. LPS treatment has also been analyzed by other authors. They found that resveratrol mitigates LPS-mediated microglial inflammation (Capiralla et al., 2012; Dragone et al., 2014), reduced depressive-like behavior (Ge et al., 2015), and attenuated LPS-induced cognitive impairment (Chen et al., 2017). However, this issue merits more studies in brain.

Here, we focused on the role of long-term resveratrol treatment as a tool to increase brain defenses in aged animals against acute LPS proinflammatory stimuli. Results indicated an improvement of cellular response against LPS injury cellular modulation response in aged brain. The beneficial effects induced by resveratrol against LPS insult, which can be useful in infection or in any other situation that requires an activation of inflammatory defenses to fight against a possibly harmful stimulus. Because loss of cellular response against injuries is one of the signs of senescence (Sampedro-Piquero et al., 2017) results supported the acquisition of broad knowledge on the anti-aging properties of resveratrol.

Acknowledgments

This study was supported by Spanish MINECO (SAF2016-77703, CSD2010-00045), and the European Regional Development Fund. We thank Maggie Brunner, M.A., for reviewing the language and style of the manuscript.

References

- Abraham, J., Johnson, R.W., 2009. Consuming a diet supplemented with resveratrol reduced infection-related neuroinflammation and deficits in working memory in aged mice. *Rejuvenation Res.* 12 (6), 445–453.
- Blagosklonny, M.V., 2011. Hormesis does not make sense except in the light of TOR-driven aging. *Aging (Albany NY)* 3 (11), 1051–1062.
- Calabrese, E.J., Mattson, M.P., Calabrese, V., 2010. Resveratrol commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum. Exp. Toxicol.* 29 (12), 980–1015.
- Calabrese, E.J., Dhawan, G., Kapoor, R., Iavicoli, I., Calabrese, V., 2015. What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology*. 16 (6), 693–707.
- Campbell, A., Sharman, E., Bondy, S.C., 2014. Age-related differences in the response of the brain to dietary melatonin. *Age (Dordr)* 36 (1), 49–55.
- Capiralla, H., Vingtdoux, V., Zhao, H., Sankowski, R., Al-Abed, Y., Davies, P., Marambaud, P., 2012. Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J. Neurochem.* 120 (3), 461–472.
- Cevenini, E., Monti, D., Franceschi, C., 2013. Inflamm-aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16 (1), 14–20.
- Chen, Y.Y., Zhang, L., Shi, D.L., Song, X.H., Shen, Y.L., Zheng, M.Z., Wang, L.L., 2017. Resveratrol attenuates subacute systemic inflammation-induced spatial memory impairment via inhibition of astrocyte activation and enhancement of synaptophysin expression in the hippocampus. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 47 (1), 17–24.
- Chirumbolo, S., 2011. Hormesis, resveratrol and plant-derived polyphenols: some comments. *Hum. Exp. Toxicol.* 30 (12), 2027–2030.
- Dominiak, A., Wilkaniec, A., Ješko, H., Czapski, G.A., Lenkiewicz, A.M., Kurek, E., Wroczyński, P., Adamczyk, A., 2017. Selol, an organic selenium donor, prevents lipopolysaccharide-induced oxidative stress and inflammatory reaction in the rat brain. *Neurochem. Int.* S0197-0186 (16), 30331–X.
- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., Samali, A., 2013. The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (19), 3493–3511.
- Dragone, T., Cianciulli, A., Calvello, R., Porro, C., Trotta, T., Panaro, M.A., 2014. Resveratrol counteracts lipopolysaccharide-mediated microglial inflammation by modulating a SOCS-1 dependent signaling pathway. *Toxicol. in Vitro* 28 (6), 1126–1135.
- Escames, G., López, L.C., Ortiz, F., Ros, E., Acuña-Castroviejo, D., 2006. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 41 (11), 1165–1167.
- Faye, C., McGowan, J.C., Denny, C.A., David, D.J., 2017. Neurobiological mechanisms of stress resilience and implications for the aged population. *Curr. Neuropharmacol.* <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X15666170818095105>.
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., De Benedictis, G., 2000a. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908, 244–254.
- Franceschi, C., Valensin, S., Bonafè, M., Paolisso, G., Yashin, A.I., Monti, D., De Benedictis, G., 2000b. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. *Exp. Gerontol.* 35 (6–7), 879–896.
- Galanos, C., Freudenberg, M.A., 1993. Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action. *Mediat. Inflamm.* 2 (7), S11–S16.
- Gandin, V., Masvidal, L., Cargnello, M., Gyenis, L., McLaughlan, S., Cai, Y., Tenkerian, C., Morita, M., Balanathan, P., Jean-Jean, O., Stambolic, V., Trost, M., Furic, L., Larose, L., Koromilas, A.E., Asano, K., Litchfield, D., Larsson, O., Topisirovic, I., 2016. mTORC1 and CK2 coordinate ternary and eIF4F complex assembly. *Nat. Commun.* 7, 11127.
- Ge, L., Liu, L., Liu, H., Liu, S., Xue, H., Wang, X., Yuan, L., Wang, Z., Liu, D., 2015. Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 768, 49–57.
- Kallapura, G., Pumford, N.R., Hernandez-Velasco, X., Hargis, B.M., Tellez, G., 2014. Mechanisms involved in lipopolysaccharide derived ROS and RNS oxidative stress and septic shock. *J. Microbiol. Res. Rev.* 2 (1), 6–11.
- Kaneko, Y.S., Ota, A., Nakashima, A., Mori, K., Nagatsu, I., Nagatsu, T., 2012. Regulation of oxidative stress in long-lived lipopolysaccharide-activated microglia. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39 (7), 599–607.
- Kim, K.A., Jeong, J.J., Yoo, S.Y., Kim, D.H., 2016. Gut microbiota lipopolysaccharide accelerates inflamm-aging in mice. *BMC Microbiol.* 16, 9.
- Le Sage, F., Meilhac, O., Gonthier, M.P., 2017. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces pro-inflammatory adipokine secretion and oxidative stress by regulating Toll-like receptor-mediated signaling pathways and redox enzymes in adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* S0303-7207 (17) (30109-0).
- Leon, J., Moreno, A.J., Garay, B.I., Chalkley, R.J., Burlingame, A.L., Wang, D., Dubal, D.B., 2017. Peripheral elevation of a Klotho fragment enhances brain function and resilience in young, aging, and α -synuclein transgenic mice. *Cell Rep.* 20 (6), 1360–1371.
- Liu, S., Suragani, R.N., Wang, F., Han, A., Zhao, W., Andrews, N.C., Chen, J.J., 2007. The function of heme-regulated eIF2 α kinase in murine iron homeostasis and macrophage maturation. *J. Clin. Invest.* 117, 3296–3305.
- Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42 (2), 145–151.
- Martins, I., Galluzzi, L., Kroemer, G., 2011. Hormesis, cell death and aging. *Aging (Albany NY)* 3 (9), 821–828.
- Masson, G.S., Nair, A.R., Dange, R.B., Silva-Soares, P.P., Michelini, L.C., Francis, J., 2015. Toll-like receptor 4 promotes autonomic dysfunction, inflammation and microglia activation in the hypothalamic paraventricular nucleus: role of endoplasmic reticulum stress. *PLoS One* 10 (3), e0122850.
- Mattsson, N., Schott, J.M., Hardy, J., Turner, M.R., Zetterberg, H., 2016. Selective vulnerability in neurodegeneration: insights from clinical variants of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87 (9), 1000–1004.
- Nakayama, Y., Endo, M., Tsukano, H., Mori, M., Oike, Y., Gotoh, T., 2010. Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J. Biochem.* 147, 471–483.
- Negash, S., Xie, S., Davatzikos, C., Clark, C.M., Trojanowski, J.Q., Shaw, L.M., Wolk, D.A., Arnold, S.E., 2013. Cognitive and functional resilience despite molecular evidence of Alzheimer's disease pathology. *Alzheimers Dement.* 9 (3), e89–95.
- Oliva, A., Della Ragione, F., Borriello, A., Bencivenga, D., Caldarelli, I., Tramontano, A., Borgia, A., Pirozzi, A.V., 2013. Resveratrol and cancer treatment: is hormesis a yet unsolved matter? *Curr. Pharm. Des.* 19 (30), 5384–5393.
- Pallàs, M., Porquet, D., Vicente, A., Sanfeliu, C., 2013. Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des.* 19 (38), 6726–6731.
- Paolisso, G., Barbieri, M., Bonafè, M., Franceschi, C., 2000. Metabolic age modelling: the lesson from centenarians. *Eur. J. Clin. Invest.* 30 (10), 888–894.
- Rattan, S.I., 2001. Applying hormesis in aging research and therapy. *Hum Exp Toxicol.* 20 (6), 281–285 discussion 293–294.
- Rotondo, S., Rajtar, G., Manarini, S., Celardo, A., Rotilio, D., de Gaetano, G., Evangelista, V., Cerletti, C., 1998. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound,

- on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br. J. Pharmacol.* 123, 1691–1699.
- Sampedro-Piquero, P., Álvarez-Suárez, P., Begega, A., 2017. Coping with stress during aging: the importance of a resilient brain. *Curr. Neuropharmacol.* <http://dx.doi.org/10.2174/1570159X15666170915141610>.
- Shrestha, N., Bahnan, W., Wiley, D.J., Barber, G., Felds, K.A., Schesser, K., 2012. Eukaryotic initiation factor 2 (eIF2) signaling regulates proinflammatory cytokine expression and bacterial invasion. *J. Biol. Chem.* 287 (34), 28738–28744.
- Tateda, K., Matsumoto, T., Miyazaki, S., Yamaguchi, K., 1996. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect. Immun.* 64 (3), 769–774.
- Tong, L., Heim, R.A., Wu, S., 2011. Nitric oxide: a regulator of eukaryotic initiation factor 2 kinases. *Free Radic Biol Med* 50 (12), 1717–1725.
- Toshchakov, V., Jones, B.W., Lentschat, A., Silva, A., Perera, P., Thoma, S.K., Cody, M.J., Shuling, Z., Williams, R.G., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., Vogel, S.N., 2016. TLR2 and TLR4 agonists stimulate unique repertoires of host resistance genes in murine macrophages: interferon- β -dependent signaling in TLR4-mediated responses. *Innate Immun.* 9 (3), 169–175.
- Utsuyama, M., Hirokawa, K., 2002. Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice. *Exp. Gerontol.* 37, 411–420.
- Villa-Cuesta, E., Boylan, J.M., Tatar, M., Gruppuso, P.A., 2011. Resveratrol inhibits protein translation in hepatic cells. *PLoS One* 6 (12), e29513.
- Woo, C.W., Cui, D., Arellano, J., Dorweiler, B., Harding, H., Fitzgerald, K.A., Ron, D., Tabas, I., 2009. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by Toll-like receptor signaling. *Nat. Cell Biol.* 11, 1473–1480.

4. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Debido al aumento en la esperanza de vida en los últimos años, la población mundial está siendo más longeva provocando a su vez aumento de enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento patológico, como por ejemplo, la Enfermedad de Alzheimer. Estas se han convertido en un problema de salud pública y en una carga económica importante para la sociedad. Por este motivo, la investigación sobre el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas se ha ido incrementando con el tiempo. Aún así, actualmente no hay terapias efectivas para la prevención o el manejo de estas patologías. Por tanto, es importante encontrar estrategias que conlleven beneficios terapéuticos para los pacientes. Dado que el envejecimiento es el principal factor de riesgo para los trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad, interferir en los mecanismos o vías moleculares relacionadas con dicho proceso, puede ser una vía para desarrollar nuevas terapias. Asimismo, es importante destacar que se han presentado diferentes hipótesis que han relacionado la EA con factores ambiental que incrementan su riesgo, algunos de ellos pueden actuar desde etapas tempranas de la vida o interactuar con otros factores genéticos.

La obesidad y el consumo de una dieta alta en grasas son factores de riesgo que están estrechamente ligados a varios trastornos como la diabetes tipo II, el síndrome metabólico, enfermedades del corazón y contribuyen a los procesos neurodegenerativos como la EA, además aumentan el deterioro cognitivo. El consumo de dietas ricas en grasa como las dietas occidentales "Western diets" está aumentando en todo el mundo y contribuye a una población con sobrepeso y obesidad. La obesidad que se define por un aumento en el tejido adiposo, se asocia con efectos sobre la función cognitiva incluyendo el deterioro de la memoria (Elias y col., 2005; Waldstein y Katzel, 2006; Bruce-

Keller y col., 2009; Kanoski y Davidson, 2011). Ser obeso también se considera un factor de riesgo para desarrollar demencia más tarde en la vida y aumenta el riesgo de EA (Beydoun y col., 2008; Fitzpatrick y col., 2009; Hassing y col., 2009; Naderali y col., 2009; Xu y col., 2011; Gustafson, 2012). Estudios experimentales muestran que las dietas ricas en grasa perjudican el aprendizaje y la memoria en roedores (Kanoski y Davidson, 2011; Valladolid-Acebes y col., 2011; Heyward y col., 2012; Arnold y col., 2014; Boitard y col., 2014; Tucsek y col., 2014; Sobesky y col., 2014; Freeman y col., 2014) y empeoran los déficit de memoria en los modelos murinos de EA (Maesako y col., 2012; Barron y col., 2013; Knight y col., 2014, Vandal y col., 2014; Dimitri y col., 2015; Khotari col., 2016; Martins col., 2017). Estos datos sugieren una fuerte asociación entre la obesidad y la disfunción cognitiva.

Con la alta prevalencia de obesidad, y el aumento de las enfermedades neurodegenerativas se ha incrementado el estudio de biomoléculas activas presentes en plantas para proponerlas como nuevas alternativas que contribuyan a disminuir los efectos del envejecimiento y obtener una mejor calidad de vida. Uno de los compuestos más ampliamente estudiados por sus efectos beneficiosos para la salud es el resveratrol, el cual está presente en varias plantas como la vid que produce el fruto de la uva (Baur y col., 2006; Fernández-Quintela y col., 2016). Se ha demostrado que el resveratrol tiene un efecto antidiabético (Oyenihi y col., 2016) y mejora la función mitocondrial, además de que protege frente a diversas enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 (Lagouge y col., 2006; de Oliveira col., 2016).

Esta tesis se llevó a cabo con el objetivo principal de investigar los diferentes mecanismos que están implicados en la neurodegeneración inducidos por una dieta alta en grasas en dos modelos de ratón; el primero es el modelo SAMP8

que presenta senescencia acelerada y marcadores similares a la EA, y el segundo ratones C57BL/6J de 24 meses, por tanto envejecidos fisiológicamente normal. Además, se evaluó cómo el resveratrol ejerce un efecto neuroprotector en el cerebro de estos ratones. Para este fin se analizaron diferentes mecanismos moleculares relacionados con la neurodegeneración y el envejecimiento y también se analizaron los estados conductuales y cognitivos de los ratones.

Para llevar a cabo el estudio se han utilizado ratones macho de la cepa SAMP8 de 9 meses de edad y ratones machos C57BL/6J envejecidos con 22 meses de edad.

Resveratrol como protector del cerebro de ratones SAMP8 bajo estrés metabólico

Se ha establecido que la obesidad resultante del consumo de una dieta alta en grasas está relacionada con el deterioro cognitivo (Elias, 2003). En particular las funciones de aprendizaje y memoria que dependen de la integridad del hipocampo son las que se ven más afectadas (Grundy, 2005; Kothari, 2016). Estudios previos mostraron que el resveratrol consumido a una dosis de 160 mg/kg/día por ratones SAMP8 tuvo efectos beneficiosos mejorando los parámetros cognitivos y reduciendo los marcadores de envejecimiento y EA (Porquet y col., 2013).

En este sentido, se planteó para la primera parte del proyecto realizar 3 grupos experimentales con dieta grasa y resveratrol suplementados en el pienso de los animales durante 15 semanas. Los grupos fueron los siguientes: el primero fue alimentado con dieta normal (ND: carbohidratos:proteínas:grasas; ratio: 64:19:17%), el segundo con dieta alta en grasa (HF:

carbohidratos:proteína:grasa; ratio de 16:23:61%) que contenía 61% de grasas y en el tercer grupo fue añadido resveratrol (1 g/kg) a la dieta grasa (HF+resveratrol). Durante el tratamiento el grupo de SAMP8-HF presentó un incremento de peso progresivo en comparación con los de dieta normal, sin embargo, no hubo diferencia con el grupo SAMP8-HF+resveratrol. Estos resultados fueron similares a los de otros autores donde se administró HF y resveratrol en la dieta y tampoco observaron reducción en el peso de los ratones tratados con resveratrol (Baur y col., 2006; Ohara y col., 2015; Fernández-Quintela y col., 2016). SAMP8 es una cepa de ratón que además de presentar una deficiencia cognitiva relacionada con la senescencia se ha comprobado que presenta alteraciones en los procesos metabólicos (Wang y col., 2014; Ohta y col., 1996). Por ejemplo, Mehla y col (2014) demostraron la relación entre el deterioro del metabolismo de la glucosa y los déficits de aprendizaje en SAMP8 que fueron alimentados con dieta grasa. En nuestro modelo los resultados mostraron niveles altos de glucosa entre el minuto 20 y 90 de la curva de tolerancia a la glucosa en los tres grupos, y se observó una reversión parcial de tolerancia a la glucosa en el grupo con resveratrol a la dieta grasa.

El análisis del estado conductual y cognitivo realizado con las pruebas (NORT, *Novel Object Recognition Test* y MWM, *Morris Water Maze*) demostraron un deterioro cognitivo en SAMP8-HF, resultados que también fueron similares a otros trabajos (Mehla y col., 2014). Además, el aumento del Índice de Discriminación en la prueba NORT y los parámetros evaluados en la prueba MWM demostraron una mejora en las capacidades cognitivas relacionadas con el hipocampo cuando los SAMP8-HF fueron tratados también con resveratrol, mejorando el aprendizaje y la memoria, datos que fueron apoyados con las pruebas de comportamiento (EPM, *Elevated Plus Maze* y OF, *Open Field*).

El envejecimiento y el estrés metabólico se asocian con una disminución de la función mitocondrial y una acumulación de mitocondrias aberrantes (López-Otín y col., 2013; Sebastián y col., 2017). Por tanto, la disfunción mitocondrial tiene un papel importante en los trastornos neurodegenerativos como la EA (Federico y col., 2012; Wang y col., 2009). Se ha demostrado que la regulación de los componentes de la dinámica mitocondrial como la fusión y fisión así como la biogénesis tienen un papel importante en la función neuronal y la supervivencia. Se había descrito al resveratrol como un compuesto que mejora la función mitocondrial (Price y col., 2012), por ello evaluamos dos importantes proteínas mediadoras de fusión OPA1 y MFN2, además de la proteína de fisión DRP1. Encontramos que el estrés metabólico ocasionado por la dieta grasa cambió los niveles proteicos de OPA1 y MFN2, pero no indujo cambios en el marcador de fisión DRP1. El resveratrol, en nuestras condiciones, aumentó la expresión de OPA1 y MFN2 respecto a los SAMP8-HF, esto indica un aumento en el proceso de fusión. Por otro lado, la disminución de los niveles proteicos de OPA1 en SAMP8-HF es similar a lo que sucede en la EA, ya que se han visto niveles significativamente disminuidos de esta proteína en cerebros de pacientes con la EA (Wang y col., 2009; Wang y col., 2014).

La microscopía electrónica de las mitocondrias en el hipocampo mostró diferencias significativas en el número y la morfología mitocondrial entre los SAMP8-HF y SAMP8-HF+resveratrol. Las mitocondrias de los ratones SAMP8-HF+resveratrol fueron más grandes con una morfología y crestas mejor definidas. Estos resultados son consistentes con el trabajo de Martins y col (2017) en ratones 3xTgAD, donde se demostró una reducción en número y cambios en la longitud mitocondrial en el hipocampo después de la alimentación con una dieta alta en grasa. Otros estudios experimentales en los

que se utilizó una alimentación con alto contenido en grasa observaron mitocondrias hinchadas con una matriz densa y la pérdida de la integridad de las crestas en las neuronas y otros tejidos (Bonnard y col., 2008; Du y col., 2012; Pipatpiboon y col., 2012). Se ha propuesto que dicho daño mitocondrial ocasionado como respuesta a una dieta alta en grasa es debido al EO y a la producción de ROS (Bonnard y col., 2008; Du y col., 2012). En consecuencia con lo anterior, se encontraron incrementos significativos en ratones tratados con resveratrol en los complejos I-NDUFB8, II-SDNB, III-UQCRC2, y V-ATPasa de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) destacando el papel protector del resveratrol en el funcionamiento mitocondrial. Además, observamos una disminución de la proteína VDCA1 en SAMP8-HF lo que indica una reducción en la biogénesis mitocondrial, ya que VDCA1 se considera junto con PGC1- α un marcador de biogénesis mitocondrial (Pulliam y col., 2004).

Nuestros resultados confirman que los efectos de la dieta grasa provocan un deterioro en la morfología mitocondrial (Martins y col., 2017), además alteran los procesos de fusión de las mitocondrias en el hipocampo de ratones SAMP8. Sin embargo, el resveratrol mejora estos daños mitocondriales causados por la dieta grasa incrementando los niveles de proteínas de fusión y fosforilación oxidativa, y por consiguiente se generan mitocondrias más sanas.

Se han descrito los efectos beneficiosos del resveratrol sobre el deterioro cognitivo, (Pallàs y col., 2013; Vingtdoux y col., 2008), estos efectos están mediados en parte por el eje SIRT1 - PGC1- α - AMPK (Fullerton y Steinberg, 2010; Price y col., 2012). Sin embargo, aún existe controversia acerca de la actividad del resveratrol sobre el eje ya que se ha visto que depende del sistema y de los tejidos experimentales. Menzies y col (2013) demostraron que el resveratrol aumenta la masa mitocondrial y el contenido del complejo V,

mediante el aumento de AMPK y de SIRT1 pero no de PGC1- α . Nuestros resultados no mostraron modificaciones en los niveles proteicos de SIRT1 ni de PGC1- α pero si observamos un incremento significativo en la expresión de AMPK, lo cual está ligado a la mejora cognitiva que mostraron los ratones con resveratrol en la dieta.

Como ya se conoce, cuando hay un daño mitocondrial se genera en el organismo un aumento en la producción de RONS y el uso de un compuesto como el resveratrol el cual es antioxidante y anti-inflamatorio puede prevenir el daño. Los resultados de la expresión génica de las citocinas pro-inflamatoria *Il-6* y *Tnf- α* disminuyó en el grupo SAMP8 tratado con resveratrol, junto con cambios en los niveles de la enzima antioxidante SOD1.

Está descrito que TNF- α actúa de manera estrecha con la vía de la Wnt para controlar una serie de funciones celulares, desde el desarrollo de hueso hasta la hematopoyesis (Almeida y col., 2011; Hiyama y col., 2013; Stock y col., 2013). La vía de señalización Wnt además de ser una vía importante para la neurogénesis y los procesos cancerígenos, también está implicada en la neurodegeneración (Arrázola y col., 2015). Debido a la disminución de la expresión génica de TNF- α en SAMP8-HF y teniendo en cuenta estudios previos que demuestran alteraciones específicas en la vía Wnt en el cerebro del modelo SAMP8 (Bayod y col., 2014) decidimos profundizar en la detección de los niveles de proteínas implicadas en la vía de señalización de Wnt. Centramos el estudio en la vía canónica de Wnt/ β -catenina y encontramos una disminución significativa de la β -catenina activa en SAMP8-HF, lo que indica una inhibición efectiva de la vía Wnt en SAMP8 bajo estrés metabólico. Cuando los ratones se alimentaron con HF+resveratrol la vía de Wnt se recuperó induciendo cambios en la expresión de Axina1, Dvl3, y GSK-3 β , pero

sobre todo aumentó los niveles de β -catenina activa. La recuperación de la β -catenina activa en el hipocampo de SAMP8 por el resveratrol demuestra una nueva función benéfica del polifenol en el cerebro, a través de la regulación de la vía de la Wnt. El papel neuroprotector del tratamiento con resveratrol en SAMP8 estresados metabólicamente también se demostró mediante una inhibición de la actividad de la cinasa GSK-3 β y la reducción de la hiperfosforilación de tau.

Los resultados obtenidos en esta primera parte mostraron que el estrés metabólico en SAMP8 que es ocasionado por la dieta grasa (Mehla y col., 2014) conlleva a un declive cognitivo y una disfunción mitocondrial, incluyendo los procesos de la dinámica mitocondrial. Además, el estrés metabólico afecta a la vía de la Wnt en el hipocampo y aumenta la hiperfosforilación de tau, el cual es un marcador de neurodegeneración. Asimismo, se determinó que el resveratrol, administrado a través de la dieta es capaz de prevenir las alteraciones cognitivas y moleculares que se producen durante el estrés metabólico.

Efectos del resveratrol en el envejecimiento de ratones C57BL/6J bajo estrés metabólico

Como se ha descrito envejecer comporta para el organismo un conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas, las cuales suponen una disminución de la capacidad de adaptación frente a los agentes perturbadores o a situaciones y estados adversos. Esta disminución en la respuesta (denominada en determinados campos resiliencia) se refleja sobre todo en la pérdida de memoria y de la capacidad de aprendizaje durante la senectud, fenómenos que se relacionan, a su vez, con el EO y la inflamación que experimenta el

cerebro a esas edades. Por otro lado, se sabe que la alimentación es un factor importante para tener un envejecimiento saludable.

Por lo anterior, en esta segunda parte del proyecto determinamos la importancia del estrés metabólico en animales fisiológicamente envejecidos con respecto a la cognición. Además, determinamos los cambios moleculares subyacentes a la pérdida de las capacidades cognitivas, centrándonos en nuevas posibilidades del efecto beneficioso del resveratrol en ratones viejos.

Para este fin utilizamos ratones de la cepa C57BL/6J con 22 meses de edad y los separamos en cuatro grupos experimentales: el primer grupo fue alimentado con dieta normal (ND), el segundo grupo fue alimentado con resveratrol (RV) con una concentración del polifenol de 1g/kg, el tercer grupo fue alimentado con dieta grasa (HF) que contenía 61% de grasas, y el cuarto grupo tenía dieta grasa más resveratrol (HD+resveratrol). Además, utilizamos un quinto grupo de ratones jóvenes de 8 semanas de edad como controles los cuales fueron alimentados con dieta normal (ND). Los ratones permanecieron con el tratamiento durante 8 semanas.

Al final del tratamiento se realizó una curva de tolerancia a la glucosa. Al igual que en SAMP8, los ratones envejecidos C57BL/6J alimentados con HF mostraron un aumento exponencial en el peso corporal durante las 8 semanas. Esta ganancia de peso estuvo ausente en los animales viejos con ND y fue muy ligera en animales jóvenes. Cuando se añadió resveratrol a la dieta (ND y HF) no se observaron cambios en el peso corporal respecto a los viejos y jóvenes con ND. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por los experimentos de Jeon y col (2012), donde observaron un incremento en el peso corporal de

ratones C57 alimentados con HF pero no en ratones alimentados con resveratrol.

Los niveles elevados persistentes de glucosa en sangre entre los minutos 20 y 90 de la curva de tolerancia después de las 8 semanas de tratamiento de ratones que comieron HF, no disminuyeron, lo que implica una resistencia a la insulina sostenida por la dieta grasa.

En referencia a los parámetros de comportamiento, se observaron mejoras en la cognición con la prueba de NORT en ratones alimentados con ND+resveratrol en comparación con los alimentados con HF quienes presentaron un deterioro cognitivo. Los resultados de la prueba MWM reforzaron el efecto del resveratrol; sin embargo, no se evidenciaron cambios significativos entre los animales no tratados debido, posiblemente, a la condición física de los animales de edad avanzada. También se evaluó la actividad motora y la ansiedad de los ratones mediante la prueba del campo abierto, aunque no observamos diferencias en la actividad locomotora, si obtuvimos una diferencia en la ansiedad de los animales que fueron alimentados con HF en comparación a los alimentados con ND y además el grupo con resveratrol revirtió los efectos ocasionados por HF. Los modelos de EA han mostrado una mayor ansiedad, por lo que la demencia puede estar relacionada estrechamente con este problema (Prior y col., 2014; Currais y col., 2015).

A nivel molecular, primero se analizaron marcadores relacionados con el EO y la neuroinflamación; las enzimas iNOS, CAT y COX2 que están relacionadas con el EO no mostraron diferencias de expresión entre los animales jóvenes y viejos, aunque en una serie de parámetros medidos se puede observar una tendencia, lo que indica que a edades muy avanzadas hay un punto en que

parece que se detiene la progresión de los marcadores de EO en esta cepa. En consecuencia, tampoco se encontraron cambios significativos en la expresión génica de *Nrf1*, descrito como un factor de transcripción que controla la expresión basal e inducida, regulando resultados fisiológicos de la exposición a los oxidantes (Ohtsuji y col., 2008). Debido a que los animales estudiados presentan una condición deteriorada por la edad, podría ser factible plantear la hipótesis de que el envejecimiento redujo la posibilidad de que la HF produjera un alto grado de estrés metabólico, y por consecuencia alto EO, que sí sucede en diferentes modelos animales a edades más tempranas (Petrov y cols., 2015; Price y col., 2012). El resveratrol no indujo cambios importantes en parámetros oxidativos, excepto en la expresión génica de *Aldh2*, la cual es una enzima implicada en la desintoxicación de los aldehídos que se acumulan a través del metabolismo, por tanto, funciona como un protector ante EO (Ohta y col., 2004; Chen y col., 2014; Galer y Grace, 2015). Experimentos en ratas han demostrado que la capacidad de eliminación de 4-HNE (producto aldehídico de peroxidación lipídica que provoca citotoxicidad y su acumulación promueve la muerte celular) por la enzima ALDH2 mitocondrial disminuye con el envejecimiento (Chen y Yu, 1996) por lo tanto la activación de ALDH2 puede hacer más lento, al menos hasta cierto punto, el proceso de envejecimiento (Chen y col., 2014). Además, se ha sugerido que la disfunción de ALDH2 puede contribuir a una variedad de enfermedades humanas incluidas las enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares y cáncer (Chen y col., 2014).

A pesar del débil proceso del EO presente en nuestro modelo, si se ha observado actividad pro-inflamatoria, un proceso que se encuentra estrechamente ligado al EO en animales de edad avanzada (Jeon y col., 2012).

La inflamación comprende una respuesta defensiva a insultos, incluido un entorno oxidativo (Kriz, 2006). Por lo tanto, la presencia de una respuesta inflamatoria confirmó un proceso oxidativo en el hipocampo de ratones alimentados con HF. Además, en este proceso inflamatorio podría basarse en el deterioro cognitivo que fue demostrado por la prueba NORT en animales viejos y en un mayor grado en animales con un estrés metabólico. El resveratrol debido a su papel anti-oxidante y anti-inflamatorio (Tung y col., 2015), evitó el aumento en la mayoría de los marcadores de pro-inflamatorios en este estudio mediante una reducción de la expresión génica de las citocinas *Tnf- α* , *Cxcl10*, *Il-1 β* , *Il-6* y *Ccl3*.

Como ya se ha mencionado, el EO puede producir daño mitocondrial y afectar a la cadena respiratoria mitocondrial (OXPHOS). Cuando se estudiaron los elementos de OXPHOS en animales de 24 meses, no se encontraron cambios en HF en comparación con ND. Sin embargo, si se encontraron diferencias en los complejos CII-SDHB, CIII-UQCRC2 y CIV-MTCO1 con el tratamiento con resveratrol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos (De Oliveira y col., 2016) y demuestra que el resveratrol ejerce una acción consistente sobre la función mitocondrial. El efecto anterior del resveratrol sobre la función mitocondrial fue reforzado mediante la alteración del eje SIRT1-AMPK-PGC1- α . Como ya se mencionó el resveratrol es un activador de SIRT1 (Howits, 2003) que es una sirtuina que está implicada en la resistencia al estrés, el metabolismo energético, la supervivencia neuronal (Cardinale y col., 2015) y en la extensión de vida (Boily y col., 2008). Sirt1 promueve la biogénesis mitocondrial mediante la desacetilación y la activación de PGC1- α (Gerhart-Hines, 2007; Rogers y col., 2005). PGC1- α también es activado por AMPK, otro sensor metabólico importante (Jager y col., 2007). Hay estudios *in vivo* que sugieren que el resveratrol puede activar primero a SIRT1, lo que

conlleva a la activación de AMPK mediante la desacetilación y activación de la cinasa LKB1 (Price y col., 2012). Nosotros encontramos un aumento en la expresión génica de SIRT1 en animales que consumieron resveratrol, pero no en el resto de los grupos experimentales. También, el resveratrol revirtió la fosforilación de AMPK, hasta casi alcanzar los niveles de fosforilación de los animales jóvenes, Demostrando que el resveratrol funciona como un activador directo de AMPK (Fullerton col., 2010; Baur col., 2006). El efecto del resveratrol en SIRT1 y AMPK puede explicar también la reducción en los procesos de inflamación en ratones viejos y estresados metabólicamente.

Por otro lado, en trabajos realizados por Uittenbogaard y col (2010) propusieron la idea de un nuevo concepto NeuroD6-PGC1- α -SIRT1 como un nuevo eje neuroprotector. NeuroD6 desempeña un papel importante en la eliminación de ROS intracelular. Los autores demostraron que NeuroD6 conserva la masa mitocondrial, niveles de ATP intracelular y la expresión de subunidades específicas de los complejos respiratorios bajo condiciones de EO. NeuroD6 también mantiene la expresión génica de *Pgc1- α* , *Sirt1*, *Tfam* y *Nrf1*. La expresión de NeuroD6 fue menor en animales viejos con ND, mientras que los que consumieron resveratrol recuperaron los niveles de NeuroD6. Estos resultados se correlacionan con los efectos observados en el funcionamiento mitocondrial, marcadores oxidativos y la vía de la Wnt, del trabajo anterior en SAMP8 y dieta grasa (Palomera-Ávalos y col., 2016).

Finalmente estudiamos marcadores epigenéticos, ya que se ha descrito que la epigenética está implicada en la iniciación y desarrollo de la senescencia (Fraga y Esteller, 2007; McGowan y col., 2008). Además, se ha descrito que la obesidad inducida por la dieta alta en grasa modifica los patrones de metilación del DNA de genes asociados a la memoria (Heyward y col., 2015).

Específicamente se ha sugerido que la metiltransferasa DNMT3B desempeña un papel importante en el deterioro cognitivo en sujetos con un deterioro cognitivo leve (Chouliaras y col., 2015; Córdova-Palomera y col., 2015). En nuestro estudio los niveles de metilación global se incrementaron en los animales viejos respecto a los jóvenes, y al consumir resveratrol los niveles de metilación se normalizaron. Se ha descrito que las modificaciones de la cromatina, especialmente la acetilación de la cola de histonas inducida por los inhibidores de las histonas deacetilasas (HDACs) facilita el aprendizaje y la memoria tanto en ratones silvestres como en modelos neurodegenerativos (Guan y col., 2009; Penny y Tsai, 2014), específicamente se ha demostrado que la deficiencia de la HDAC2 da como resultado un aumento en el número de sinapsis y facilita la memoria. En nuestros experimentos se observó un incremento de la HDAC2 en los animales viejos respecto a los jóvenes, recuperando los niveles normales con el resveratrol en los animales viejos. Como se señaló anteriormente, SIRT1 es también una deacetilasa de histonas y está descrita como un regulador epigenético (Heyward y col., 2016) y, de acuerdo con ello, observamos un aumento en la expresión génica de *Sirt1* con el resveratrol en ratones viejos.

Como podemos observar el resveratrol es capaz de modificar los niveles de la metilación global y de la metiltransferasa DNMT3B en ratones C57BL/6J envejecidos, además de regular la expresión génica de *Hdac2*, estos marcadores epigenéticos están estrechamente relacionados con el deterioro de la memoria y por consiguiente del EO y la inflamación, apoyando la idea de que el resveratrol tiene un efecto anti-inflamatorio.

El resveratrol aumenta la respuesta en ratones C57BL/6J envejecidos frente a un estímulo inflamatorio agudo

Con la edad, la capacidad de responder de manera eficaz a estímulos nocivos disminuye y el organismo se vuelve más susceptible a infecciones y enfermedades. Durante el proceso de envejecimiento, hay un cambio en el cerebro hacia un estado pro-inflamatorio que conduce a un aumento crónico en la activación de las células microgliales. Varios estudios han informado sobre niveles elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el tejido cerebral y el suero de humanos en ancianos, así como en modelos animales (Uranga y col., 2010; Ye y Johnson, 1999; Terao y col., 2002). Se ha propuesto que la neuroinflamación está en el centro de las alteraciones patológicas que ocurren casi en todas las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como la EA o el EP, así como el envejecimiento normal (Mattson y col., 2002; Streit, 2004; Tuppo y Arias, 2005).

Como ya hemos mencionado, el resveratrol es de particular interés en la modulación de enfermedades que conllevan la inflamación, varios estudios han encontrado que inhibe la producción de ROS (Rotondo y col., 1998; Abraham y Johnson, 2009) y activa varios factores de transcripción como NF- κ B. Sin embargo, se conoce muy poco sobre los efectos de pre-condicionamiento del resveratrol frente a daños agudos (Calabrese y col., 2010).

Por lo anterior, nos planteamos estudiar el efecto del resveratrol en ratones ancianos en la potenciación de las defensas cerebrales frente a LPS, que es un lipopolisacárido que se encuentra en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y un principal componente molecular asociado a patógenos (Kallapura y col., 2014) responsables de la mayoría de las reacciones inflamatorias tóxicas por RONS.

Para llevar a cabo el estudio un grupo de ratones fue alimentado con resveratrol durante 8 semanas y otro grupo con ND, al término del tratamiento se hicieron 4 grupos experimentales que consistieron en ratones con ND+solución salina, ND+LPS, RV+solución salina y RV+LPS. La concentración utilizada de LPS fue de 100 µg/kg y fue inyectado intra-peritonealmente, para sacrificar a los ratones 3 h después de su administración.

Como se esperaba la administración del LPS indujo un efecto pro-inflamatorio muy intenso en el hipocampo de los ratones C57BL/6J de 24 meses de edad, con un aumento en los niveles de expresión de las citocinas *Il-6*, *Tnf-α*, *Il-1β* y *Cxcl10*. Tateda y col (1996) observó un incremento en citocinas pro-inflamatorias en ratones viejos respecto a ratones jóvenes después de administrar LPS a 100 µg por ratón. Otros autores como Campbell y col (2014) observaron diferencias en los niveles de TNF-α después de la exposición al LPS; posiblemente las diferencias encontradas se deban a una mayor sensibilidad a los estímulos inflamatorios debido a la edad (Escames y col., 2006). Por otro lado, también se han estudiado los niveles en la expresión de varios receptores de citocinas (IL-1R, IL-6R, TNF-α, IFN-γ) en el cerebro, después de la administración de LPS, los cuales variaron dependiendo de la edad de los ratones, encontrándose más expresados en ratones viejos (Utsuyama e Hirokawa, 2002).

Los resultados obtenidos en este estudio fueron concluyentes con un aumento en la respuesta inflamatoria obtenida después de la administración de LPS. El aumento en los niveles de expresión de las citocinas en los animales con resveratrol indica una posible respuesta de pre-acondicionamiento inducida por la administración del polifenol en la dieta sobre los mecanismos activados por LPS en ratones envejecidos. Con la respuesta inflamatoria obtenida por el

resveratrol, nos planteamos determinar marcadores específicos de EO, estrés del retículo endoplasmático y la vía mTOR, todos éstos relacionados con vías en las que se ha descrito que interviene el resveratrol.

Los marcadores de EO mostraron cambios discretos en el hipocampo, obteniendo una mayor expresión en el grupo de resveratrol con LPS, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Otro estudio llevado a cabo por Campbell y col (2014) tampoco encontró diferencias después de la administración de LPS, sugiriendo que no se esperaba que estos índices respondieran rápidamente a la inflamación aguda. Por otro lado, se observaron cambios en la expresión proteica del factor de transcripción NF- κ B, el cual está implicado en la expresión de una amplia gama de genes que regulan la inflamación, la proliferación celular, la migración y la supervivencia celular y el EO (Sharif y col., 2007), como se esperaba NF- κ B se incrementó en los animales con resveratrol y LPS, además el LPS indujo un aumento significativo en la expresión génica de iNOS en animales que consumieron resveratrol, iNOS está estrechamente ligado a NF- κ B que generalmente se asocia con las células del sistema inmune y produce NO• durante periodos de tiempo prolongado (Kallapura y col., 2014) también observamos un incremento en la expresión del factor de transcripción NRF1 que está implicado en la expresión de varias enzimas antioxidantes (Ohtsuji y col., 2008) en el grupo de resveratrol y LPS. Con los cambios discretos obtenidos en los marcadores de EO y apoyados por los resultados de Campbell y col (2014) no se puede descartar la idea de que la exposición aguda del LPS induzca a largo plazo EO y que el resveratrol pueda ejercer una actividad beneficiosa. Como consecuencia del EO se ve afectado el retículo endoplasmático encargado de controlar la cantidad y calidad de las proteínas. En nuestro estudio vimos afectados algunos componentes del retículo endoplasmático, entre ellos cambios en la

fosforilación de eIF2 α . La activación de cinasas de eIF2 α , como PERK, puede ser iniciada por factores de estrés (Donnelly y col., 2013). Se ha descrito que la generación de NO• puede inducir a la expresión de cinasas que fosforilan a eIF2 α (Tong y col., 2011). La fosforilación de eIF2 α reduce la síntesis de proteínas pero aumenta la transcripción de genes específicos en respuesta a los factores estresantes (Liu y col., 2007; Woo y col., 2009; Nakayama y col., 2010). Nuestros resultados mostraron niveles de fosforilación eIF2 α mayor en animales con resveratrol y LPS, determinando una mayor respuesta al estímulo inflamatorio en los ratones alimentados con resveratrol.

Otra proteína que se vio afectada fue p-70S6K1 que junto con la proteína de unión eIF4E son dos sustratos de la vía mTOR. Los resultados mostraron niveles de mTOR reducidos igual que la fosforilación de p-70S6K1 en los animales que se inyectaron con LPS y consumieron resveratrol, ello refuerza publicaciones previas que describen que el resveratrol regula la vía mTOR, reduciendo la señalización de mTOR; nuestro modelo demuestra que resveratrol está ajustando la respuesta celular frente a factores estresantes como LPS, a través de la modificación de la vía mTOR.

Para finalizar, indicar que la fosforilación de eIF2 α está relacionada con la expresión de citocinas inducidas por infección (Shrestha y col., 2011); como hemos discutido previamente, se observaron niveles muy altos de la fosforilación de eIF2 α con el resveratrol y el LPS, activando la producción de citocinas después de la inyección aguda de LPS. Así el resveratrol actúa estimulado la producción de citocinas y la modificación de la vía mTOR para hacer frente a estímulos agudos pro-inflamatorios y predispone a los ratones a tener una mayor eficacia de defensa celular en caso de edad muy avanzada.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La conclusión general de los estudios realizados en esta tesis doctoral es que el resveratrol promueve el envejecimiento saludable mediante la modulación de diferentes vías metabólicas implicadas en la neurodegeneración afectadas por el estrés metabólico.

De manera específica, las principales conclusiones son las siguientes:

1. El estrés metabólico inducido por la dieta grasa en ratones SAMP8 provoca un deterioro de las capacidades cognitivas, aumentando el EO y la disfunción mitocondrial (biogénesis, fusión/fisión y fosforilación oxidativa).
2. El resveratrol previene la disfunción mitocondrial, reduciendo el EO y los marcadores neurodegenerativos como la hiperfosforilación de tau en ratones SAMP8 estresados metabólicamente.
3. El resveratrol ejerce un efecto neuroprotector en el cerebro de ratones SAMP8 alimentados con dieta grasa, a través de la modulación de la vía de la Wnt, debido al incremento de actividad de β -catenina.
4. El estrés metabólico inducido por la dieta grasa en ratones envejecidos C57BL/6J conduce a alteraciones cognitivas que fueron reducidas por el resveratrol.
5. El resveratrol disminuye los marcadores inflamatorios (TNF- α , CXCL10, IL-1 β , IL-6 y CCL3) y marcadores implicados en la senescencia y rejuvenecimiento (SIRT1-AMPK-PGC1- α) en el hipocampo de ratones C57BL6J envejecidos y metabólicamente estresados.

-
6. El resveratrol modifica los niveles de metilación global (5-mC) de DNA y la expresión génica de las enzimas epigenéticas metiltransferasa Dnmt3b y deacetilasa Hdac2 que son moduladas por los niveles de EO en el hipocampo de ratones C57BL/6J envejecidos y alimentados con dieta grasa.
 7. El tratamiento agudo con LPS en ratones C57BL/6J envejecidos produce un incremento de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , CXCL10, IL-1 β e IL-6) que fue significativamente mayor en el grupo tratado con resveratrol.
 8. El tratamiento con resveratrol modifica los marcadores del RE (eIF2 α , BiP y ATF4) e inhibe la vía mTOR en el hipocampo de ratones envejecidos después de la administración de LPS.

6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

A

- Abraham J, Johnson RW (2009) Consuming a Diet Supplemented with Resveratrol Reduced Infection-Related Neuroinflammation and Deficits in Working Memory in Aged Mice. *Rejuvenation Res.* 12(6): 445-453.
- Albasanz JL, Castillo CA, Barrachina M, Ferrer I, Martín M (2011) Modulation of Signal Transduction Pathways in Senescence-Accelerated Mice P8 Strain: A Useful Tool for Alzheimer's Disease Research. The Clinical Spectrum of Alzheimer's disease -The Charge Toward Comprehensive Diagnostic and Therapeutic Strategies. Dr. Suzanne De La Monte (Ed.). ISBN: 978-953-307-993-6, InTech.
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, et al. (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 26(2): 211–215.
- Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC (2011) Glucocorticoids and tumor necrosis factor (TNF) α increase oxidative stress and suppress WNT signaling in osteoblasts. *J Biol Chem.* 286(52): 44326–44335.
- Alvarez-Garcia O, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, Tomas-Zapico C, Camins A, Garcia JJ, Pallàs M, Coto-Montes A (2006) Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age. *Biogerontology.* 7(1): 43-52.
- Alzheimer's Association (2016) Alzheimer's disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia.* 12(4).
- Alzoubi KH, Khabour OF, Salah HA, Hasan Z (2013) Vitamin e prevents high-fat high-carbohydrates diet-induced memory impairment: the role of oxidative stress. *Physiol Behav.* 119C: 72–78.

Anand R, Gill KD, Mahdi AA (2014) Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future. *Neuropharmacology*. 76: 27–50.

Anastas JN, Moon RT (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat Rev Cancer*. 13: 11–26.

Annabi B, Lord-Dufour S, Vézina A, Béliveau R (2012) Resveratrol Targeting of Carcinogen-Induced Brain Endothelial Cell Inflammation Biomarkers MMP-9 and COX-2 is Sirt1-Independent. *Drug Target Insights*. 6:1-11.

Anstey KJ, Kingston A, Kiely KM, Luszcz MA, Mitchell P, Jagger C (2014) The influence of smoking, sedentary lifestyle and obesity on cognitive impairment-free life expectancy. *Int J Epidemiol*. 43:1874-1883

Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, Carlson GC, Browne CA, Kazi H, Bang S, Choi B-R, Chen Y, McMullen MF, Kim SF (2014) High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis*. 67: 79-87.

Arrázola MS, Silva-Alvarez C, Inestrosa NC (2015) How the Wnt signaling pathway protects from neurodegeneration: the mitochondrial scenario. *Front Cell Neurosci*. 9:166. doi:10.3389/fncel.2015.00166.

Austin S, St-Pierre J (2012) PGC1 α and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *Journal of Cell Science*. 125: 4963-4971.

B

Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, et al. (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*. 278: 17190-17197.

Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM (2011) Clearance of p16Ink4a-positive

senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 479: 232–236.

Barron AM, Rosario ER, Elteriefi R, Pike CJ (2013) Sex-specific effects of high fat diet on indices of metabolic syndrome in 3xTg-AD mice: Implications for Alzheimer's disease. *PLoS One*. 8:e78554.

Barzilai N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A (2012) The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes*. 61: 1315–1322.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444: 337–342.

Bayod S, Felice P, Andrés P, Rosa P, Camins A, Pallàs M, Canudas AM (2014) Downregulation of canonical Wnt signaling in hippocampus of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging*. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.017.

Bazinet RP, Layè S (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. doi:10.1038/nrn3820.

Beydoun MA, Lhotsky A, Wang Y, Dal Forno G, An Y, Metter EJ, Ferrucci L, O'Brien R, Zonderman AB (2008) Association of adiposity status and changes in early to mid-adulthood with incidence of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol*. 168: 1179-1189.

Beydoun MA, Beydoun HA, Wang Y (2008) Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 9: 204–218.

Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 16: 6–21.

-
- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW (2006) Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med.* 12: 1133–1138.
- Boily G, Seifert EL, Bevilacqua L, He XH, Sabourin G, Estey C, Moffat C, Crawford S, Saliba S, Jardine K, et al. (2008) SirT1 regulates energy metabolism and response to caloric restriction in mice. *PLoS One.* 3:e1759. doi.10.1371/journal.pone.0001759.
- Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Laye S, Ferreira G (2014) Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun.* 40: 9-17.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseaux E, Chauvin M-A, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest.* 118: 789-800.
- Bossy B, Petrilli A, Klinglmayr E, Chen J, Lutz-Meindl U, Knott AB, Masliah E, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2010) S-Nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 20(2): S513–526.
- Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Mérei A, Halmai R, et al. (2011) Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr.* 106: 383–9.
- Brion JP, Smith C, Couck AM, Gallo JM, Anderton BH (1993) Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 61: 2071–2080.
- Brooks SJ, Benedict C, Burgos J, Kempton MJ, Kullberg J, Nordenskjöld R, Kilander L, Nylander R, Larsson EM, Johansson L, Ahlstrom H, Lind L, Schioth HB (2013) Late-life obesity is associated with smaller global and

regional gray matter volumes: a voxel-based morphometric study. *Int J Obes.* 37:230-236.

Brown MK, Naidoo N (2010) The UPR and the anti-oxidant response: relevance to sleep and sleep loss. *Mol Neurobiol.* 42: 103–113.

Brown MK, Naidoo N (2012) The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related disease. *Frontiers in Physiology.* doi:10.3389/fphys.2012.00263.

Brown VA, Patel KR, Viskaduraki M, Crowell JA, Perloff M, Booth TD, Vasilinin G, Sen A, Schinas AM, Piccirilli G, et al. (2010) Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. *Cancer Res.* 70: 9003–11.

Brownlee M (1991) Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Annu Rev Med.* 42: 159-66.

Brunet A, Berger L (2014) Epigenetics of Aging and Aging-related Disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69(1): S17-S20.

Bruce-Keller AJ, Keller JN, Morrison CD (2009) Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochem Biophys Acta.* 1792: 395-400.

C

Calabrese EJ, Mattson MP, Calabrese V (2010) Resveratrol Commonly displays hormesis: occurrence and biomedical significance. *Hum Exp Toxicol.* 29(12): 980-1015.

Campbell A, Sharman E, Bondy SC (2014) Age-related differences in the response of the brain to dietary melatonin. *Age (Dordr)* 36(1): 49–55.

Canudas AM, Gutierrez-Cuesta J, Rodriguez MI, Acuna-Castroviejo D, Sureda FX, Camins A, Pallàs M (2005) Hyperphosphorylation of microtubule-

associated protein tau in senescence-accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev.* 126(12): 1300-1304.

Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P (2012) Resveratrol mitigates lipopolysaccharide and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J Neurochem.* 120: 461–472.

Cardinale A, de Stefano MC, Mollinari C, Racaniello M, Garaci E, Merlo D (2015) Biochemical characterization of sirtuin 6 in the brain and its involvement in oxidative stress response. *Neurochem Res.* 40: 59–69.

Caricasole A, Copani A, Caraci F, et al. (2004) Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's brain. *J Neurosci.* 24: 6021–6027.

Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, et al. (2013) Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol.* 61: 215–226.

Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A, et al. (2005) Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol.* 567: 349-358.

Centeno-Baez C, Dallaire P, Marette A (2011) Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301: E922-30.

Chakrabarti S, Mohanakumar KP (2016) Aging and Neurodegeneration: A Tangle of Models and Mechanisms. *Aging and Disease.* 7(2): 111-113.

Chang RC, Suen KC, Ma CH, Elyaman W, Ng HK, Hugon J (2002) Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α in neuronal degeneration. *J Neurochem.* 83: 1215–1225.

- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol.* 160: 189–200.
- Chen H, Chan DC (2004) Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol.* 59: 119-144.
- Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 280: 26185-26192.
- Chen JJ, Yu BP (1996) Detoxification of reactive aldehydes in mitochondria: effects of age and dietary restriction. *Aging.* 8: 334–340,
- Chen CH, Batista JB, Gross ER, Mochly-Rosen D (2014) Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities. *Physiol Rev.* 94(1): 1-34.
- Chouliaras L, Kenis G, Visser PJ, Scheltens P, Tsolaki M, Jones RW, Kehoe PG, Graff C, Girtler NG, Wallin A ° K, Rikkert MO, Spuru L, Elias-Sonnenschein LS, Ramakers IH, Pishva E, van Os J, Steinbusch HW, Verhey FR, van den Hove DL, Rutten BP (2015) DNMT3A moderates cognitive decline in subjects with mild cognitive impairment: Replicated evidence from two mild cognitive impairment cohorts. *Epigenomics.* 7: 533–537.
- Chow HH, Garland LL, Hsu CH, Vining DR, Chew WM, Miller JA, Perloff M, Crowell JA, Alberts DS (2010) Resveratrol modulates drug and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study. *Cancer Prev Res (Phila).* 3: 1168–75.
- Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 149: 1192–1205.
- Córdoba-Palomera A, Fatjó-Vilas M, Kebir O, Gastó C, Krebs MO, Fananás L (2015) Polymorphic variation in the epigenetic gene DNMT3B modulates

the environmental impact on cognitive ability: A twin study. *Eur Psychiatry*. 30: 303–308.

Correas I, Díaz NJ, Avila J (1992) Microtubule-associated protein tau is phosphorylated by protein kinase C on its tubulin binding domain. *J Biol Chem*. 267: 15721-15728.

Cullinan SB, Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 279: 20108–17.

Currais A, Goldberg J, Farrokhi C, Chang M, Prior M, Dargusch R, Daugherty D, Armando A, Quehenberger O, Maher P, Schubert D (2015) A comprehensive multiomics approach toward understanding the relationship between aging and dementia. *Aging*. 7: 937–955.

Craft S (2009) The role of metabolic disorders in Alzheimer disease and vascular dementia: two roads converged. *Arch Neurol*. 66: 300–5.

Cristòfol R, Porquet D, Corpas R, Coto-Montes A, Serret J, Camins A, et al. (2012) Neurons from senescence-accelerated SAMP8 mice are protected against frailty by the sirtuin 1 promoting agents melatonin and resveratrol. *J Pineal Res*. 52: 271–281.

D

Davidson TL, Monnot A, Neal AU, Martin AA, Horton JJ, Zheng W (2012) The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol Behav*. 107: 26–33.

DeBette S, Seshadri S, Beiser A, Au R, Himali JJ, Palumbo C, Wolf PA, DeCarli C (2011) Midlife vascular risk factor exposure accelerates structural brain aging and cognitive decline. *Neurology*. 77:461-468.

- Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet.* 109(6): 584–591.
- Del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich G, Casadesus G, Smith MA, Camins A, Pallàs M, Pelegri C, Vilaplana J (2010) Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis.* 19(4): 1303-1315.
- De Ferrari GV, Inestrosa NC (2000) Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.* 33: 1–12.
- De Ferrari GV, Papassotiropoulos A, Biechele T, et al. (2007) Common genetic variation within the low-density lipoprotein receptor-related protein 6 and late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci.* 104: 9434–9439.
- De Oliveira MR, Nabavi SF, Manayi A, Daglia M, Hajheydari Z, Nabavi SM (2016) Resveratrol and the mitochondria: From triggerin the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogénesis, a mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1860: 727-745.
- Dimitri P, Pedrós I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, Casadesús G, Beas-Zarate C, Carro E, Ferrer I, Vazquez-Carrera M, Folch J, Camins A (2015) High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochimica et Biophysica Acta.* doi:10.1016/j.bbadis.2015.05.004.
- Donnelly N, Gorman AM, Gupta S, Samali A (2013) The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell Mol Life Sci.* 70(19): 3493-511.
- Donmez G (2013) Aging and Neurodegeneration. *J Mol Genet Med.* 7: 071. doi:10.4172/1747-0862.1000071.
- Drewes G, Ebnet A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.* 89: 297-308.

Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol.* 103: 2739-46.

Du Z, Yang Y, Hu Y, Sun Y, Zhang S, Peng W, Zhong Y, Huang X, Kong W (2012) A long-term high-fat diet increases oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the inner ear of D-galactose-induced aging rats. *Hear Res.* 287: 15-24.

Duran-Aniotz C, Cornejo VH, Espinoza S, Ardiles AO, Medinas DB, Salazar C, et al. (2017) IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* doi:10.1007/s00401-017-1694-x.

Durieux J, Wolff S, Dillin A (2011) The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell.* 144: 79–91.

E

Elias MF, Beiser A, Wolf PA, Au R, White RF, D'Agostino RB (2000) The preclinical phase of alzheimer disease: A 22-year prospective study of the framingham cohort. *Archives of Neurology.* 57: 808-813.

Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB (2003) Lower cognitive function in the presence of obesity and hypertension: the framingham heart study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 27: 260–8.

Elias MF, Elias PK, Sullivan LM, Wolf PA, D'Agostino RB (2005) Obesity, diabetes and cognitive deficit: the Framingham Heart Study. *Neurobiol Aging.* 26(1): 11–16.

Escames G, López LC, Ortiz F, Ros E, Acuña-Castroviejo D (2006) Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: effects of melatonin treatment. *Exp Gerontol.* 41 (11): 1165–11673.

Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K (2003) Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem.* 134: 333-344.

Eura Y, Ishihara N, Oka T, Mihara K (2006) Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci.* 119: 4913–4925.

Enzinger C, Fazekas F, Matthews PM, Ropele S, Schmidt H, Smith S, Schmidt R (2005) Risk factors for progression of brain atrophy in aging: Six-year follow-up of normal subjects. *Neurology.* 64: 1704-1711.

F

Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO, Hoppel CL (1999) Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Biochem Biophys.* 372: 399–407.

Fajemiroye JO, Rodríguez RS, Mourão AA, da Silva EF, Williams NE, Rebelo ACS, Reis AA, Santos R, Ferreira-Neto ML, Pedrino GR (2017) Aging-induced biological changes and health conditions. *Frontiers in Aging Neuroscience.*

Federico A, Cardaioli E, DaPozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci.* 322: 254–262.

Fenn AM, Norden DM, Godbout JP (2015) Neuroinflammation: New Insights into Beneficial and Detrimental Functions. First Edition. Edited by Samuel David. © John Wiley & Sons, Inc. Published by John Wiley & Sons, Inc.

Fernández-Quintela A, Carpéne C, Fernández M, Aguirre L, Milton-Laskibar I, Contreras J, Portillo MP (2016) Anti-obesity effects of resveratrol: comparison between animal models and humans. *J Physiol Biochem.* doi:10.1007/s13105-016-0544-y.

Feser J, Tyler J (2011) Chromatin structure as a mediator of aging. *FEBS Lett.* 585(13): 2041–2048.

-
- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W (2011) Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. 473(7347): 398-402.
- Fitzpatrick AL, Kuller LH, Lopez OL, Diehr P, O'Meara ES, Longstreth WT, Luchsinger JA (2009) Midlife and late-life obesity and the risk of dementia: Cardiovascular health study. *Arch Neurol*. 66: 336-342.
- Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, Scheibye-Knudsen M, Stevnsner TV, Nilsen H, Bohr VA, Fang EF (2017) Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochemistry International*. doi:10.1016/j.neuint.2017.02.007.
- Fjell AM, McEvoy LMc, Holland D, Dale AM, Walhovd KB (2014) What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Prog Neurobiol*. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.02.004.
- Flodin NW (1984) The senescence of postmitotic mammalian cells: a cell-clock hypothesis. *Mech Ageing Dev*. 27(1): 15-27.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span—from yeast to humans. *Science*. 328: 321–326.
- Fotuhi M, Do D, Jack C (2012) Modifiable factors that alter the size of the hippocampus with ageing. *Nature Reviews Neurology*. 8:189-202.
- Fraga MF, Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet*. 23: 413–418.
- Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 66: 137–147.
- Freeman LR, Haley-Zitlin V, Stevens C, Granholm AC (2011) Diet-induced effects on neuronal and glial elements in the middle-aged rat hippocampus. *Nutr Neurosci*. 14: 32–44.

Freeman LR, Zhang L, Nair A, Dasuri K, Francis J, Fernandez-Kim SO, et al. (2013) Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med.* 56: 226–33.

Freeman LR, Haley-Zitlin V, Rosenberg DS, Granholm AC (2014) Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: A review of proposed mechanisms. *Nutritional Neuroscience.* 17(6): 241- 251.

Fullerton MD, Steinberg GR (2010) SIRT1 takes a backseat to AMPK in the regulation of insulin sensitivity by resveratrol. *Diabetes.* 59: 551–553.

Fumagalli M, Rossiello F, Clerici M, Barozzi S, Cittaro D, Kaplunov JM, Bucci G, Dobrev M, Matti V, Beausejour CM, et al. (2012) Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. *Nat Cell Biol.* 14: 355–365.

G

Gandy S (2005) The role of cerebral amyloid β accumulation in common forms of Alzheimer disease. *Journal of Clinical Investigation.* 115: 1121-1129.

Gazdzinski S, Kornak J, Weiner MW, Meyerhoff DJ (2008) Body mass index and magnetic resonance markers of brain integrity in adults. *Ann Neurol.* 63: 652–657.

Gambini J, López-Grueso R, Olaso-González G, Inglés M, Abdelazid K, Alami ME, Bonet-Costa V, Borrás C, Viña J (2013) Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Rev Esp Geriatr y Gerontol.* 48(2): 79-88.

Gardner KE, Allis CD, Strahl BD (2011) Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol.* 409: 36–46.

Garrido JL, Godoy JA, Alvarez A, et al. (2002) Protein kinase C inhibits amyloid β peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway. *FASEB J.* 16: 1982–1984.

-
- Gavrilov LA, Grailova NS (2006) Reliability Theory of Aging and Longevity. In Handbook of the Biology of Aging. Masoro EJ, Austad SN, eds., 3-42. San Diego: Academic Press.
- Gentili M, Mazoit JX, Bouaziz H, Fletcher D, Casper RF, Benhamou D, Savouret JF (2001) Resveratrol decreases hyperalgesia induced by carrageenan in the rat hind paw. *Life Sci.* 2:68(11): 1317-21.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J.* 26: 1913-1923.
- Gordon MD, Nusse R (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 281: 22429-22433.
- Götz J, Ittner LM, Kins S (2006) Do axonal defects in tau and amyloid precursor protein transgenic animals model axonopathy in Alzheimer's disease? *J Neurochem.* 98: 993-1006.
- Greenwood CE, Winocur G (1990) Learning and memory impairment in rats fed a high saturated fat diet. *Behav Neural Biol.* 53: 74-87.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G (2011) Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* 333: 1109-12.
- Grimm A, Friedland K, Eckert A (2016) Mitochondrial dysfunction: the missing link between aging and sporadic Alzheimer's disease. *Biogerontology.* 17: 281-296.
- Grimm A, Eckert A (2017) Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem.* doi:10.1111/jnc.14037.
- Grundy SM (2005) A constellation of complications: the metabolic syndrome. *Clinical Cornerstone.* 7: 36-45.

Gu TP, Guo F, Yang H, Wu H-P, Xu G-F, Liu W, Xie Z-G, Shi L, He X, Jin S-G, et al. (2011) The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*. 477: 606–610.

Guan JS, Haggarty S, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, Nieland TJJ, Zhou Y, Wang X, Mazitschek R, Bradner JE, DePinho RA, Jaenisch R, Tsai LH (2009) HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. doi:10.1038/nature07925.

Guo C, Sun L, Chen X, Zhang D (2013) Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. 8(21): 2003-2014.

Gustafson DR (2012) Adiposity and cognitive decline: Underlying mechanisms. *J Alzheimers Dis*. 30(2): S97-112.

Gutierrez-Cuesta J, Sureda FX, Romeu M, Canudas AM, Caballero B, Coto-Montes A, Camins A, Pallas M (2007) Chronic administration of melatonin reduces cerebral injury biomarkers in SAMP8. *J Pineal Res*. 42(4): 394-402.

H

Hamos JE, Oblas B, Pulaski-Salo D, Welch WJ, Bole DG, Drachman DA (1991) Expression of heat shock proteins in Alzheimer's disease. *Neurology*. 41: 345–350.

Harman D (1956) Aging: a theory based of free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 11: 298-300.

Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8: 101–112. doi:10.1038/nrm2101.

Hassing LB, Dahl AK, Thorvaldsson V, Berg S, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B (2009) Overweight in midlife and risk of dementia: A 40-year follow-up study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 33: 893-898.

-
- Harrison JR, Owen MJ (2016) Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis on trial. *The British Journal of Psychiatry*. 208: 1–3. doi:10.1192/bjp.bp.115.167569.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297: 353–6.
- Haslam DW, James WP (2005) Obesity. *Lancet*. 366: 1197–1209.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25: 585–621.
- Hebert LE, Scherr PA, Bienias JL, Bennett DA, Evans DA (2003) Alzheimer disease in the us population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch Neurol*. 60: 1119–22.
- Hebert SS, Horre K, Nicolai L, et al. (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 6415–6420.
- Hemming ML, Selkoe DJ (2005) Amyloid β -protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem*. 280: 37644–50.
- Hekimi S, Lapointe J, Wen Y (2011) Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol*. 21: 569–576.
- Hernandez F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ (2002) Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem*. 83: 1529–1533.
- Hetz C, Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 15: 233–249. doi:10.1038/nrn3689.

Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD (2012) Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem.* 98: 25-32.

Heyward FD, Gilliam D, Coleman MA, Gavin CF, Wang J, Kaas G, Trieu R, Lewis XJ, Moulden J, Sweatt JD (2016) Obesity weighs down memory through a mechanism involving the neuroepigenetic dysregulation of Sirt1. *J Neurosci.* 36: 1324–1335.

Hewitt G, Jurk D, Marques FD, Correia-Melo C, Hardy T, Gackowska A, Anderson R, Taschuk M, Mann J, Passos JF (2012) Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. *Nat Commun.* 3:708.

Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, Johnson AB, Kress Y, Vinters HV, Tabaton M, Shimohama S, Cash AD, Siedlak SL, Harris PL, Jones PK, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2001) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 21: 3017–3023.

Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T, Sakai D, Mochida J (2013) A complex interaction between Wnt signaling and TNF- α in nucleus pulposus cells. *Arthritis Res Ther.* 15(6): R189. doi:10.1186/ar4379.

Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 361: 1475–1485.

Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, Rozemuller JM, Baas F, Eikelenboom P, Scheper W (2005) The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 110: 165–172.

Hoozemans JJ, Van Haastert ES, Nijholt DA, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, Scheper W (2009) The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol.* 174: 1241–1251. doi:10.2353/ajpath.2009.080814.

Hosoi T, Uchiyama M, Okumura E, Saito T, Ishiguro K, Uchida T, Okuyama A, Kishimoto T, Hisanaga S (1995) Evidence for cdk5 as a major activity phosphorylating tau protein in porcine brain extract. *J Biochem (Tokyo)* 117: 741-749.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, et al. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425: 191–196.

Hroudová J, Sing N, Fišar Z (2014) Mitochondrial Dysfunctions in Neurodegenerative Diseases: Relevance to Alzheimer's disease. *Biomed Research International*. doi.org/10.1155/2014/175062.

Huang TC, Lu KT, Wo YYP, Wu YJ, Yang YL (2011) Resveratrol protects rats from A β -induced neurotoxicity by the reduction of iNOS expression and lipid peroxidation. *PLoS ONE*. 6:e29102. doi: 10.1371/journal.pone.0029102.

Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin S (2017) The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nature Reviews Neuroscience*. 18: 347- 361. doi:10.1038/nrn.2017.46.

I

Inestrosa NC, Alvarez A, Godoy J, et al. (2000) Acetylcholinesterase- amyloid- β -peptide interaction and Wnt signaling involvement in Ab neurotoxicity. *Acta Neurol Scand Suppl*. 176: 53–59.

Inestrosa N, De Ferrari GV, Garrido JL, et al. (2002) Wnt signaling involvement in b-amyloid-dependent neurodegeneration. *Neurochem Int*. 41: 341–344.

Inestrosa NC, Arenas E (2010) Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 11: 77–86.

Inestrosa NC, Montecinos-Oliva C, Fuenzalida M (2012) Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *J Neuroimmune Pharmacol.* 7: 788–807.

Inukai S, de Lencastre A, Turner M, Slack F (2012) Novel microRNAs differentially expressed during aging in the mouse brain. *PLoS ONE.* 7:e40028.

Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 117: 6535–6546.

Ishiguro K, Takamatsu M, Tomizawa K, Omori A, Takahashi M, Arioka M, Uchida T, Imah K (1992). Tau Protein Kinase I Converts Normal Tau Protein into A68-like Component of Paired Helical Filamen. *Biological Chemistry.* 267: 10897-10901

Ittner LM, Götz J (2011) Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience.* 12: 67-72.

J

Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 12017–12022.

Jakovcevski M, Akbarian S (2012) Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med.* 18: 1194–1204.

Jang JH, Surh YJ (2003) Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radic Biol Med.* 34: 1100–1110.

Jeon BT, Jeong EA, Shin HJ, Lee Y, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS (2012) Resveratrol Attenuates Obesity-Associated Peripheral and Central Inflammation and Improves Memory Deficit in Mice Fed a High-Fat Diet. *Diabetes.* 61: 1444–1454.

Jeong SK, Nam HS, Son MH, Son EJ, Cho KH (2005) Interactive effect of obesity indexes on cognition. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 19:91e96.

Johnson JA, Johnson A, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Vargas MR, Chen PC. (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci*. 1147: 61–69.

Johnson AA, Akman K, Calimport SRG, Wuttke D, Stolzing A, de Magalhães JP (2012) The Role of DNA Methylation in Aging, Rejuvenation, and Age-Related Disease. *Rejuvenation Res*. 15(5): 483–494.

K

Kallapura G, Pumford NR, Hernandez-Velasco X, Hargis BM, Tellez G (2014) Mechanisms Involved in Lipopolysaccharide Derived ROS and RNS Oxidative Stress and Septic Shock. *J of Microbiol Res and Rev*. 2(1): 6-11.

Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D (1997) Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am J Epidemiol*. 145: 33–41.

Kalmijn S, Launer LJ, Ott A, Witteman JC, Hofman A, Breteler MM (1997) Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann Neurol*. 42:776e782.

Knight EM, Martinis IVA, Gümüşgöz S, Allan SM, Lawrence CB (2014) High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging*. 35: 1821-1832.

Kaufman RJ (2002) Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*. 110: 1389–1398.

Kanoski SE, Davidson TL (2011) Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*. 103: 59-68.

- Kelsey NA, Wilkins HM, Linseman DA (2010) Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Mol Basel Switz.* 15: 7792–7814.
- Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, Franceschi C, Lithgow GJ, Morimoto RI, Pessin JE, Rando TA, Richardson A, Schadt EE, Wyss-Coray T, Sierra F (2014) Aging: a common driver of chronic diseases and a target for novel interventions. *Cell.* 159(4): 709-713.
- Koga H, Kaushik S, Cuervo AM (2011) Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev.* 10: 205–215.
- Kothari V, Luo Y, Tornaberne T, O'Neill AM, Greene MW, Thangiah G, Babu JR (2016) High fat diet induced brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Molecular Basis of Disease.* doi:10.1016/j.bbadis.2016.10.006.
- Kramer JM, Kochinke K, Oortveld MA, Marks H, Kramer D, de Jong EK, Asztalos Z, Westwood JT, Stunnenberg HG, Sokolowski MB (2011) Epigenetic regulation of learning and memory by Drosophila EHMT/G9a. *PLoS Biol.* 9:e1000569.
- Kriaucionis S, Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science.* 324: 929–930.
- Kriz J (2006) Inflammation in ischemic brain injury: Timing is important. *Crit Rev Neurobiol.* 18: 145–157.
- Kumar VB, Franko M, Banks WA, Kasinadhuni P, Farr SA, Vyas K, Choudhuri V, Morley JE (2009) Increase in presenilin 1 (PS1) levels in senescence-accelerated mice (SAMP8) may indirectly impair memory by affecting amyloid precursor protein (APP) processing. *J Exp Biol.* 212(4): 494-498.
- Kumar VB, Farr SA, Flood JF, Kamlesh V, Franko M, Banks WA, Morley JE (2000) Site-directed antisense oligonucleotide decreases the expression of amyloid precursor protein and reverses deficits in learning and memory in aged SAMP8 mice. *Peptides.* 21(12): 1769-1775.

L

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*. 12:735.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, et al. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 127: 1109–1122.
- LaPlant Q, Vialou V, Covington HE III, Dumitriu D, Feng J, Warren BL, Maze I, Dietz DM, Watts EL, Iñiguez SD, Koo JW, Mouzon E, Renthal W, Hollis F, Wang H, Noonan M, Ren Y, Eisch AJ, Bolaós CA, Kabbaj M, Xiao G, Neve RL, Hurd YL, Oosting RS, Fan G (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*. 13: 1137-1143.
- Lavasani M, Robinson AR, Lu A, Song M, Feduska JM, Ahani B, Tilstra JS, Feldman CH, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Huard J (2012) Muscle-derived stem/progenitor cell dysfunction limits healthspan and lifespan in a murine progeria model. *Nat Commun*. 3:608.
- Lepeule J, Baccarelli A, Motta V, Cantone L, Litonjua AA, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J (2012) Gene promoter methylation is associated with lung function in the elderly: the Normative Aging Study. *Epigenetics*. 7(3): 261-9.
- Liao JW, Hsu CK, Wang MF, Hsu WM, Chan YC (2006) Beneficial effect of *Toona sinensis* Roemor on improving cognitive performance and brain degeneration in senescence-accelerated mice. *Br J Nutr*. 96(2): 400- 407.
- Liesa M, Palacin M, Zorzano A (2009) Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*. 89:799-845.
- Lindquist SL, Kelly JW (2011) Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases:

progress and prognosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a004507. doi:10.1101/cshperspect.a004507.

Liu S, Suragani RN, Wang F, Han A, Zhao W, Andrews NC, Chen JJ (2007) The function of heme-regulated eIF2 α kinase in murine iron homeostasis and macrophage maturation. *J Clin Invest.* 117: 3296–3305.

Liu W, Liu C, Zhu J, Shu P, Yin B, Gong Y, Qiango B, Yuan J, Peng X (2012) MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiol Aging.* 33(3): 522-534.

Logan CY, Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20: 781–810.

López-Otín C, Blasco MA, Patrige L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell.* 153(6): 1194-217.

Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF, et al. (2013) TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab.* 18: 831–843. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.002.

Lu L, Li J, Yew DT, Rudd JA, Mak YT (2008) Oxidative stress on the astrocytes in culture derived from a senescence accelerated mouse strain. *Neurochem Int.* 52(1-2): 282-289.

Lucas JJ, Hernandez F, Gomez-Ramos P, Moran MA, Hen R, Avila J (2001) Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3 β conditional transgenic mice. *EMBO J.* 20: 27–39.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R (2002) Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 59: 1258–63.

Luchsinger JA, Tang MX, Shea S, Mayeux R (2002) Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 59:1258e1263.

M

McGowana PO, Meaneya MJ, Szyf M (2008) Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain Res.* 1237: 12-24.

McNeilly AD, Williamson R, Sutherland C, Balfour DJ, Stewart CA (2011) High fat feeding promotes simultaneous decline in insulin sensitivity and cognitive performance in a delayed matching and non-matching to position task. *Behav Brain Res.* 217: 134–41.

Maccioni RB, Farías G, Morales I, Navarrete L (2010) The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research.* 41: 226-231.

Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Shimohama S, Kihara T, Kinoshita A (2012) Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol Aging.* 33: 11-23.

McNeilly AD, Williamson R, Balfour DJ, Stewart CA, Sutherland C (2012) A high-fat-diet-induced cognitive deficit in rats that is not prevented by improving insulin sensitivity with metformin. *Diabetologia.* 55: 3061–70.

Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B (2009) Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry.* 51(1): 55–61.

Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet.* 20: 2495–2509.

- Makioka K, Yamazaki T, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K (2010) Involvement of endoplasmic reticulum stress defined by activated unfolded protein response in multiple system atrophy. *J Neurol Sci.* 297: 60–65.
- Marinou K, Christodoulides C, Antoniadis C, et al. (2012) Wnt signaling in cardiovascular physiology. *Trends Endocrinol Metab.* 23: 628–636.
- Martin I, Dawson VL, Dawson TM (2011) Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 12: 301–325.
- Martins IVA, Rivers-Auty J, Allan SM, Lawrence CB (2017) Mitochondrial Abnormalities and Synaptic Loss Underlie Memory Deficits Seen in Mouse Models of Obesity and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 55: 915-932.
- Martínez G, Duran-Aniotz C, Cabral-Miranda, Vivar JP, Hetz C (2017) Endoplasmic reticulum proteostasis impairment in aging. *Aging Cell.* doi:10.1111/accel.12599.
- Mattson MP (2004) Secreted forms of β -amyloid precursor protein modulate dendritic outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. *Journal of Neurobiology.* 25: 439–50.
- Mattson MP, Chan SL, Duan W (2002) Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet, and behavior. *Physiol Rev.* 82: 637–72.
- Ma Q, Qiang J, Gu P, Wang Y, Geng Y, Wang M (2011) Age-related autophagy alterations in the brain of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Exp Gerontol.* 46: 533-541.
- Ma Q (2013) Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53: 401-426.

-
- Ma T, Trinh MA, Wexler AJ, Bourbon C, Gatti E, Pierre P, et al. (2013) Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat Neurosci*. 16: 1299–1305.
- Maze I, et al. (2015) Critical role of histone turnover in neuronal transcription and plasticity. *Neuron*. 87: 77–94.
- Mehla J, Chauhan BC, Chauhan NB (2014) Experimental induction of type 2 diabetes in aging-accelerated mice triggered Alzheimer-like pathology and memory deficits. *J Alzheimers Dis*. 39(1): 145–162.
- Menzies KJ, Singh K, Saleem A, Hood DA (2013) Sirtuin 1-mediated effects of exercise and resveratrol on mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem*. 288(10): 6968–6979.
- Miller CA, Sweatt JD (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*. 53: 857–869.
- Miquel J, Economos JA, Fleming J, Johnson-JR JE (1980) Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol*. 15:575-591.
- Miyamoto M, Kiyota Y, Yamazaki N, et al. (1986) Age-related changes in learning and memory in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Physiology and Behavior*. 38(3): 399–406.
- Morley JE, Armbrecht HJ, Farr SA, Kumar VB (2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822: 650-656.
- Mo S, Cui Z (2012) Regulation of Canonical Wnt Signaling During Development and Diseases. Embryogenesis. Dr. Ken-Ichi Sato (Ed.), ISBN: 978-953-51-0466-7, InTech, pp 67-110.
- Montini TJ, Morrow JD (2005) Fatty Acid Oxidation in the Pathogenesis of Alzheimer's disease. *American Journal of Pathology*. 166(5): 1283-1289.

- Moore AH, O'Banion MK (2002) Neuroinflammation and anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 54: 1627–56.
- Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N, et al. (2004) Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 6570-6575.
- Morley JE, Kumar VB, Bernardo AE, Farr SA, Uezu K, Tumosa N, Flood JF (2000) Beta-amyloid precursor polypeptide in SAMP8 mice affects learning and memory. *Peptides.* 21(12): 1761-1767.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Wilson RS (2004) Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology.* 62: 1573–9.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Aggarwal N, et al. (2003) Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 60: 194–200.
- Morris MJ, Monteggia LM (2014) Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues in Clinical Neuroscience.* 16(3): 359-371.
- Morrison CD, Pistell PJ, Ingram DK, Johnson WD, Liu Y, Fernandez-Kim SO, et al. (2010) High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased nrf2 signaling. *J Neurochem.* 114: 1581–9.
- Moskalev AA, Shaposhnikov MV, Plyusnina EN, Zhavoronkov A, Budovsky A, Yanai H, Fraifeld VE (2012) The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001.

Mueller K, Sacher J, Arelin K, Holiga S, Kratzsch J, Villringer A, Schroeter ML (2012) Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Transl Psychiatry*. 2:e200.

Mudher M, Lovestone S (2002) Alzheimer's disease do tauists and Baptists finally shake hands? *Trends Neurosci*. 25: 22–6.

Muñoz-Najar U, Sedivy JM (2011) Epigenetic Control of Aging. *Antioxid Redox Signal*. 14(2): 241–259.

Murr R (2010) Interplay between different epigenetic modifications and mechanisms. *Adv Genet*. 70: 101-41.

N

Naderali EK, Ratcliffe SH, Dale MC (2009) Obesity and Alzheimer's disease: A link between body weight and cognitive function in old age. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*. 24: 445-449.

Najjar S, Pearlman DM, Alper K, Najjar A, Devinsky O (2013) Neuroinflammation and psychiatric illness. *J Neuroinflammation*. doi: 10.1186/1742-2094-10-43.

Nakayama Y, Endo M, Tsukano H, Mori M, Oike Y, Gotoh T (2010) Molecular mechanisms of the LPS-induced non-apoptotic ER stress-CHOP pathway. *J Biochem*. 147: 471–483.

Nusse R, Varmus H (2012) Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *EMBO J*. 31: 2670–2684.

O

Ohara K, Kusano K, Kitao S, Yanai T, Takata R, Kanauchi O (2015) ϵ -Viniferin, a resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 468: 877–882.

- Ohta H, Nishikawa H, Hirai K, Kato K, Miyamoto M (1996) Relationship of impaired brain glucose metabolism to learning deficit in the senescence-accelerated mouse. *Neurosci Lett.* 217(1): 37–40.
- Ohta S, Ohsawa I, Kamino K, Ando F, Shimokata H (2004) Mitochondrial ALDH2 deficiency as an oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.* 1011: 36–44.
- Ohtsuji M, Katsuoka F, Kobayashi A, Aburatani H, Hayes JD, Yamamoto M (2008) Nrf1 and Nrf2 Play Distinct Roles in Activation of Antioxidant Response Element-dependent Genes. *Journal of Biological Chemistry.* 283(48): 33554-33562.
- Oliva CA, Vargas JY, Inestrosa NC (2013) Wnt signaling: role in neural networks and memory. *Ageing Res Rev.* 12: 786–800.
- Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Miyahara Y (2002) Melatonin reduces oxidative damage of neural lipids and proteins in senescence-accelerated mouse. *Neurobiol Aging.* 23(4): 639-644.
- Orgel LE (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci.* 49: 517-21.
- Ortega RM, Requejo AM, Andres P, Lopez-Sobaler AM, Quintas ME, Redondo MR, et al. (1997) Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *Am J Clin Nutr.* 66: 803–9.
- Oyenihi OR, Oyenihi AB, Adeyanju AA, Oguntibeju OO (2016) Antidiabetic Effects of Resveratrol: The Way Forward in Its Clinical Utility. *Journal of Diabetes Research.* doi.org/10.1155/2016/9737483.

P

- Pai SG, Carneiro BA, Mota JM, Costa R, Leite CA, Barroso-Sousa R, Kaplan JB, Chae YK, Giles FJ (2017) Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology.* 10:101 doi:10.1186/s13045-017-0471-6.

-
- Pallàs M (2012) Senescence-Accelerated Mice P8: A Tool to Study Brain Aging and Alzheimer's disease in a Mouse Model. *Cell Biology*. doi:10.5402/2012/917167.
- Pallàs M, Porquet D, Vicente A, Sanfeliu C (2013) Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des*. 19: 6726–6731.
- Palomera-Avalos V, Griñán-Ferré C, Puigoriol-Ilamola D, Camins A, Sanfeliu C, Canudas AM, Pallàs M (2016) Resveratrol Protects SAMP8 Brain Under Metabolic Stress: Focus on Mitochondrial Function and Wnt Pathway. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-016-9770-0.
- Pannacciulli N, Del Parigi A, Chen K, Le DS, Reiman EM, Tataranni PA (2006) Brain abnormalities in human obesity: a voxel-based morphometric study. *Neuroimage*. 31: 1419-1425.
- Pakaski M, Kalman J (2008) Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 53: 103–11.
- Pardo-Andreu G (2003) Consideraciones generales sobre algunas teorías del envejecimiento. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 22(1).
- Parrott MD, Greenwood CE (2007) Dietary influences on cognitive function with aging: from high-fat diets to healthful eating. *Ann N Y Acad Sci*. 1114: 389–97.
- Patel KR, Scott E, Brown VA, Gescher AJ, Steward WP, Brown K (2011) Clinical trials of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 1215: 161–9.
- Plaza-Zabala A, Sierra-Torre V, Sierra A (2017) Autophagy and Microglia: Novel Partners in Neurodegeneration and Aging. *Int J Mol Sci*. 18:598. doi:10.3390/ijms18030598.
- Pei JJ, Braak E, Braak H, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Winblad B, Cowburn RF (1999) Distribution of active glycogen synthase kinase 3beta (GSK-3beta)

in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. *J Neuropathol Exp Neurol.* 58(9): 1010-9

Penney J, Tsai LH (2014) Histone deacetylases in memory and cognition. *Sci Signal.* 7:re12.

Petersen KS, Smith C (2016) Ageing-Associated Oxidative Stress and Inflammation Are Alleviated by Products from Grapes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* doi:10.1155/2016/6236309.

Petrov D, Pedros I, Artiach G, Sureda FX, Barroso E, Pallàs M, Casadesus G, Beas-Zarate C, Carro E, Ferrer I, Vazquez-Carrera M, Folch J, Camins A (2015) High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. *Biochim Biophys Acta.* 1852: 1687–1699.

Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet.* 14: 1405-1415.

Pipatpiboon N, Pratchayasakul W, Chattipakorn N, Chattipakorn SC (2012) PPAR γ agonist improves neuronal insulin receptor function in hippocampus and brain mitochondria function in rats with insulin resistance induced by long term high-fat diets. *Endocrinology.* 153: 329-338.

Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A, Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA (2012) SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab.* 15: 675–69.

Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA, Morley JE, Klein JB, Butterfield DA (2004a) Quantitative proteomics analysis of

specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience*. 126(4): 915-926.

Porquet D, Casadesús G, Bayod S, Vicente A, Canudas AM, Vilaplana J, et al. (2013) Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age (Dordr)*. 3: 1851–1865.

Prior M, Chiruta C, Currais A, Goldberg J, Ramsey J, Dargusch R, Maher PA, Schubert D (2014) Back to the future with phenotypic screening. *ACS Chem Neurosci*. 5: 503–513.

Puig KL, Floden AM, Adhikari R, Golovko MY, Combs CK (2012) Amyloid Precursor Protein and Proinflammatory Changes Are Regulated in Brain and Adipose Tissue in a Murine Model of High Fat Diet- Induced Obesity. *PLoS ONE*. 7:e30378. doi: 10.1371/journal.pone.0030378.

Pulliam DA, Deepa SS, Liu Y, Hill S, Lin AL, Bhattacharya A, Shi Y, Sloane L et al. (2014) Complex IV-deficient Surf1 (–/–) mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem J*. 462(2): 359–371.

Q

Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Mechanisms of Disease Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 362: 329-344.

Qiang W, Weiqiang K, Qing Z, Pengju Z, Yi L (2007) Aging impairs insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle via suppressing AMPKalpha. *Exp Mol Med*. 39: 535-543.

Quincozes-Santos A, Bobermin LD, Latini A, Wajner M, Souza DO, Gonçalves CA, et al. (2013) Resveratrol protects C6 astrocyte cell line against hydrogen peroxide-induced oxidative stress through heme oxygenase 1. *PLoS ONE*. 8:e64372. doi:10.1371/journal.pone.0064372.

R

- Rando TA, Chang HY (2012) Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell*. 148: 46–57.
- Razin A, Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. *Science*. 210(4470): 604-10.
- Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR (2014) Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 6:218 doi:10.3389/fnagi.2014.00218.
- Remondelli P, Renna M (2017) The Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Disorders and Its Potential Therapeutic Significance. *Front Mol Neurosci*. 10:187. doi:10.3389/fnmol.2017.00187
- Reznick RM, Zong H, Li J, Morino K, Moore IK, Yu HJ, Liu ZX, Dong J, Mustard KJ, Hawley SA, et al. (2007) Aging-associated reductions in AMP-activated protein kinase activity and mitochondrial biogenesis. *Cell Metab*. 5: 151-156.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. 434: 113–118.
- Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ (2015) MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart*. 101(12): 921-8.
- Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*. 115: 1663-1674.
- Rosi MC, Luccarini I, Grossi C, et al. (2010) Increased Dickkopf-1 expression in transgenic mouse models of neurodegenerative disease. *J Neurochem*. 112: 1539–1551.

Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC (2005) Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci.* 8:34–42.

Rosso SB, Inestrosa NC (2013) WNT signaling in neuronal maturation and synaptogenesis. *Front Cell Neurosci.* 7:103. doi: 10.3389/fncel.2013.00103.

Rotondo S, Rajtar G, Manarini S, Celardo A, Rotillo D, de Gaetano G, Evangelista V, Cerletti C (1998) Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. *Br J Pharmacol.* 123: 1691–1699.

Roussel BD, Kruppa AJ, Miranda E, Crowther DC, Lomas DA, Marciniak SJ, et al. (2013) Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurol.* 12: 105–118.

Rowbotham DA, Marshall EA, Vucic EA, Kennett JY, Lam WL, et al. (2015) Epigenetic Changes in Aging and Age-related Disease. *JASC.* 3:130. doi:10.4172/2329-8847.1000130.

S

Sanchez-Mut JV, Gräff J (2015) Epigenetic Alterations in Alzheimer's disease. *Front Behav Neurosci.* 9:347. doi:10.3389/fnbeh.2015.00347.

Sato E, Kurokawa T, Oda N, Ishibashi S (1996a) Early appearance of abnormality of microperoxisomal enzymes in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev.* 92(2-3): 175-184.

Sato E, Oda N, Ozaki N, Hashimoto S, Kurokawa T, Ishibashi S (1996b) Early and transient increase in oxidative stress in the cerebral cortex of senescence-accelerated mouse. *Mech Ageing Dev.* 86(2): 105-114.

Scarpulla RC (2008) Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann NY Acad Sci.* 1147: 321-334.

- Sesaki H, Jensen RE (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol.* 147: 699-706.
- Sesaki H, Jensen RE (2004) Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem.* 279: 28298–28303.
- Shrestha N, Bahnan W, Wiley DJ, Barber G, Fields, KA Schesser K, Speciale A, Chirafisi J, Saija A, Cimino F (2011) Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. *Curr Mol Med.* 11(9): 770-89.
- Sironi JJ, Yen SH, Gondal JA, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (1998) Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK. *FEBS Lett* 436: 471-475.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell.* 12: 2245–2256.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 298: 789–791. doi: 10.1126/science.1074069.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine.* 8(6): 595-608.
- Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JCY, Aris JP, Leeuwenburgh C (2010) New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Journal of Cell Science.* 123(15): 2533-2542.
- Sebastián D, Palacín M, Zorzano A (2017) Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging. *Trends in Molecular Medicine.* doi:10.1016/j.molmed.2017.01.003.
- Scheper W, Hoozemans JJ (2015) The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol.* 130: 315-331.

-
- Stutzbach LD, Xie SX, Naj AC, Albin R, Gilman S, Lee VM, Trojanowski JQ, Devlin B, Schellenberg GD (2013) The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 1-31. doi:10.1186/2051-5960-1-31.
- Stewart R, Masaki K, Xue QL, Peila R, Petrovitch H, White LR, Launer LJ (2005) A 32-year prospective study of change in body weight and incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Arch Neurol.* 62:55e60.
- Stock M, Böhm C, Scholtysek C, Englbrecht M, Fürnrohr BG, Klinger P, Gelse K, Gayetskyy S et al. (2013) Wnt inhibitory factor 1 deficiency uncouples cartilage and bone destruction in tumor necrosis factor α -mediated experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 65(9): 2310–2322.
- Streit WJ (2004) Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res.* 77: 1–8.
- Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND (2007) Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunology* 8:1 doi:10.1186/1471-2172-8-1.
- Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM (2010) Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol.* 22: 507–513.
- Sheldrake AR (1974) The aging, growth, and death of cells. *Nature.* 250: 381-5.
- Sierra MI, Fernández AF, Fraga MF (2015) Epigenetics of Aging. *Curr Genomics.* 16(6): 435–440.
- Sobesky JL, Barrientos RM, De May HS, Thompson BM, Weber MD, Watkins LR, Maier SF (2014) High-fat diet consumption disrupts memory and primes elevations in hippocampal IL-1 β , an effect that can be prevented with dietary reversal or IL-1 receptor antagonism. *Brain Behav Immun.* 42: 22-32.

Soriano FX, Liesa M, Bach D, Chan DC, Palacin M, Zorzano A (2006) Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2. *Diabetes*. 55: 1783-1791.

Solfrizzi V, Panza F, Capurso A (2003) The role of diet in cognitive decline. *J Neural Transm*. 110: 95–110.

Spiegel AM, Sewal AS, Rapp PR (2014) Epigenetic contributions to cognitive aging: disentangling mindspan and lifespan. *Learn Mem*. 21(10): 569–74.

Sprenkle NT, Sims SG, Sánchez CL, Meares GP (2017) Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular Neurodegeneration*. 12:42. doi:10.1186/s13024-017-0183-y.

Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, et al. (2008) Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 18: 1085–8.

Sugiyama S, Takasawa M, Hayakawa M, Ozawa T (1993) Changes in skeletal muscle, heart and liver mitochondrial electron transport activities in rats and dogs of various ages. *Biochem Mol Biol Int*. 30: 937-944.

Szilard L (1959) On the nature of the aging process. *Proc Natl Acad Sci USA*. 45: 30-45.

T

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 324: 930–935.

Tajes M, Gutierrez-Cuesta J, Folch J, Ferrer I, Caballero B, Smith MA, Casadesus G, Camins A, Pallàs M (2008) Lithium treatment decreases activities of tau kinases in a murine model of senescence. *J Neuropathol Exp Neurol*. 67(6): 612-623.

-
- Takashima A, et al. (1998) Activation of tau protein kinase I glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25–35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neurosci Res.* 31: 317–323.
- Takeda T, Josokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi M, Matsushita T, Tomita Y, Yasushira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev.* 17: 183–194.
- Takeda T, Matsushita T, Kurozumi M, Takemura K, Higuchi K, Hosokawa M, (1997) Pathobiology of the Senescence-accelerated Mouse (SAM). *Exp Gerontol.* 32(1-2): 117–127.
- Takeda T (1999) Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiology of Aging.* 20(2):105–110.
- Takeda T (2009) Senescence-Accelerated Mouse (SAM) with Special References to Neurodegeneration Models, SAMP8 and SAMP10 Mice. *Neurochem Res.* 34: 639-659.
- Taki Y, Kinomura S, Sato K, Inoue K, Goto R, Okada K, Uchida S, Kawashima R, Fukuda H (2008) Relationship Between Body Mass Index and Gray Matter Volume in 1,428 Healthy Individuals. *Obesity.* 16:119-124.
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, et al. (2001) Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature.* 414(6861): 313–7.
- Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K (1996) Lipopolysaccharide-Induced Lethality and Cytokine Production in Aged Mice. *Infection and Immunity.* 64(3): 769-774.
- Terao A, Apte-Deshpande A, Dousman L, Morairty S, Eynon BP, Kilduff TS, Freund YR (2002) Immune response gene expression increases in the aging murine hippocampus. *J Neuroimmunol.* 132:99–112.

- Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT (2010) Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal*, 12: 503-535.
- Thirumangalakudi L, Prakasam A, Zhang R, Bimonte-Nelson H, Sambamurti K, Kindy MS, et al. (2008) High cholesterol-induced neuroinflammation and amyloid precursor protein processing correlate with loss of working memory in mice. *J Neurochem*. 106: 475–85.
- Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC (2008) Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog Neurobiol*. 86: 281–296.
- Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A., Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM, et al. (2008) Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*. 135: 609–622.
- Tong L, Heim RA, Wu S (2011) Nitric Oxide: A Regulator of Eukaryotic Initiation Factor 2 Kinases. *Free Radic Biol Med*. 50(12): 1717–1725.
- Tucsek Z, Toth P, Tarantini S, Sosnowska D, Gautam T, Warrington JP, Giles CB, Wren JD, Koller A, Ballabh P, Sonntag WE, Ungvari Z, Csiszar A (2014) Aging exacerbates obesity-induced cerebrovascular rarefaction, neurovascular uncoupling, and cognitive decline in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 69: 1339-1352.
- Tung BT, Rodríguez-Bies E, Talero E, Gamero-Estévez E, Motilva V, Navas P, López-Lluch G (2015) Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Exp Gerontol*. 64: 1–7.
- Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 37: 289–305.

U

- Uittenbogaard U, Baxter KK, Chiaramello A (2010) The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 confers tolerance to oxidative stress by triggering an antioxidant response and sustaining the mitochondrial biomass. *ASN Neuro*. 2: e00034.
- Unterberger U, Hoftberger R, Gelpi E, Flicker H, Budka H, Voigtlander T (2006) Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*. 65: 348–357.
- Uranga RM, Bruce-Keller AJ, Morrison CD, Fernandez-Kim SO, Ebenezer PJ, Zhang L, Dasuri K, Keller JN (2010) Intersection Between Metabolic Dysfunction, High Fat Diet Consumption, And Brain Aging. *J Neurochem*. 114(2): 344–361.
- Utsuyama M, Hirokawa K (2002) Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice. *Exp Gerontol*. 37: 411-420.
- Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *J Neurochem*. 103: 17–37.

V

- Vandal M, White PJ, Tremblay C, St-Amour I, Chevrier G, Emond V, Lefrancois D, Virgili J, Planel E, Giguere Y, Marette A, Calon F (2014) Insulin reverses the high-fat diet-induced increase in brain A β and improves memory in an animal model of Alzheimer disease. *Diabetes*. 63: 4291-4301.
- Valastyan JS, Lindquist S (2014) Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. *Dis Model Mech*. 7:9–14.
- Valladolid-Acebes I, Stucchi P, Cano V, Fernández- Alfonso MS, Merino B, Gil-Ortega M, Fole A, Morales L, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N (2011) High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 95: 80-85.

van Ham TJ, Holmberg MA, van der Goot AT, Teuling E, Garcia-Arencibia M, Kim HE, Du D, Thijssen KL, Wiersma M, Burggraaff R, et al. (2010) Identification of MOAG-4/SERF as a regulator of age-related proteotoxicity. *Cell*. 142: 601–612.

van der Blik AM, Shen Q, Kawajiri S (2013) Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. doi:10.1101/cshperspect.a011072.

W

Waldstein SR, Katzel LI (2006) Interactive relations of central versus total obesity and blood pressure to cognitive function. *Int J Obes (Lond)*. 30: 201-207.

Wang X, Su B, Fujioka H, Zhu X (2008) Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *Am J Pathol*. 173: 470–482.

Wang S, Song J, Tan M, Albers KM, Jia J (2012) Mitochondrial fission proteins in peripheral blood lymphocytes are potential biomarkers for Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 19: 1015–1022.

Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y, Casadesus G, Zhu X, (2008) Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 19318–19323.

Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 29: 9090–9103.

Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 1842(8): 1240–1247.

-
- Ward MA, Carlsson CM, Trivedi MA, Sager MA, Johnson SC (2005) The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. *BMC Neurol.* 2:5-23.
- Wei X, Zhang Y, Zhou J (1999) Alzheimer's disease-related gene expression in the brain of senescence accelerated mouse. *Neurosci Lett.* 268(3): 139-142.
- Weiskirchen S, Weiskirchen R (2016) Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv Nutr.* 7: 706-18.
- Woo CW, Cui D, Arellano J, Dorweiler B, Harding H, Fitzgerald KA, Ron D, Tabas I (2009) Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by Toll-like receptor signaling. *Nat Cell Biol.* 11: 1473–1480.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, et al. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 98: 115-124.
- Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci.* 19: 1699–707.
- Wu B, Ueno M, Onodera M, Kusaka T, Huang CL, Hosomi N, Kanenishi K, Sakamoto H (2009) RAGE, LDL receptor, and LRP1 Expression in the brain of SAMP8. *Neurosci Lett.* 461 (2): 100-5.
- Wyss-Coray T (2016) Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation. *Nature.* 539: 180-186.

www.alz.org

X

Xu WL, Atti AR, Gatz M, Pedersen NL, Johansson B, Fratiglioni L (2011) Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: A population-based twin study. *Neurology*. 76: 1568-1574.

Y

Ye SM, Johnson RW (1999) Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *J Neuroimmunol*. 93: 139–148.

Yoon SO, Park DJ, Ryu JC, Ozer HG, Tep C, Shin YJ, et al. (2012) JNK3 perpetuates metabolic stress induced by A β peptides. *Neuron*. 75: 824–837.

Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Gerald R Crabtree (2009) MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature*. 460: 642-646.

Z

Zardo G, Ciolfi A, Vian L, Billi M, Racanicchi S, Grignani F, Nervi C (2012) Transcriptional targeting by microRNA-polycomb complexes: a novel route in cell fate determination. *Cell Cycle*. 11: 3543–3549.

Zhang J, McKeown RE, Muldoon MF, Tang S (2006) Cognitive performance is associated with macronutrient intake in healthy young and middle-aged adults. *Nutr Neurosci*. 9: 179–87.

Zhang Y, He JS, Wang X, Wang J, Bao FX, Pang SY, Yin F, Hu HG, Peng XL, Sun WM, Zheng YP, Hou LL, Hong T (2011) Administration of Amyloid-beta42 Oligomer-Specific Monoclonal Antibody Improved Memory Performance in SAMP8 Mice. *J Alzheimers Dis*. 23(3): 551-561.

Zhang Y, McLaughlin R, Goodyear C, LeBlanc A (2002) Selective cytotoxicity of intracellular amyloid-b peptide 1–42 through p53 and Bax in cultured primary human neurons. *J Cell Biol*. 156: 519–29.

Zhang Z, Hartmann H, Do VM, et al. (1998) Destabilization of b-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*. 395: 698–702.

Zovkic IB, Paulukaitis BS, Day JJ, Etikala DM, Sweatt JD (2014) Histone H2A.Z subunit exchange controls consolidation of recent and remote memory. *Nature*. 515: 582–586.